



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 829**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08716162 .6**  
96 Fecha de presentación : **01.03.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2126121**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Método para la detección del cáncer hepático, del riesgo de cáncer hepático, del riesgo de recurrencia del cáncer hepático, de la malignidad del cáncer hepático y de la progresión en el tiempo del cáncer hepático basado en la citosina metilada del gen BSP1.**

30 Prioridad: **02.03.2007 JP 2007-53312**  
**31.01.2008 JP 2008-21438**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.10.2011**

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Moribe, Toyoki;**  
**Miura, Toshiaki;**  
**Tamatsukuri, Shigeru;**  
**Iizuka, Norio;**  
**Oka, Masaaki y**  
**Hamamoto, Yoshihiko**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 365 829 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

Método para la detección del cáncer hepático, del riesgo de cáncer hepático, del riesgo de recurrencia del cáncer hepático, de la malignidad del cáncer hepático y de la progresión en el tiempo del cáncer hepático basado en la citosina metilada del gen *BASP1*.

### SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer un método, un kit y un reactivo para detectar el cáncer hepático, el riesgo de cáncer hepático, el riesgo de recurrencia del cáncer hepático, y la malignidad del cáncer hepático, y para monitorizar la progresión en el tiempo del cáncer hepático mediante la identificación y/o cuantificación de la metilación de genes concretos y/o de sus fragmentos de ADN en muestras clínicas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer hepático se desarrolla a partir de las enfermedades hepáticas crónicas (hepatitis crónica y cirrosis hepática), y en la mayoría de casos en aquellos pacientes con infección persistente por virus de la hepatitis. En Japón más del 95% de los pacientes con cáncer hepático presentan una infección mantenida por el virus de la hepatitis B (VHB) y hepatitis C (VHC), especialmente más del 80% de los casos derivan de enfermedades asociadas con el VHC. Generalmente, los pacientes con hepatitis alcanzan fases más graves 20-30 años después de la aparición de la hepatitis, y desarrollan el cáncer hepático tras la progresión a cirrosis hepática. Especialmente, la fase de pre-cirrosis hepática (fibrosis grado F3) y la cirrosis hepática (fibrosis grado F4) se asocian con tasas elevadas de cáncer hepático, y se dice que estos pacientes desarrollarán cáncer hepático en un período de 10 años.

La edad de inicio es a los 60 años o más, con más casos en generaciones ancianas. Existen casos que se desarrollan en fases relativamente precoces y en generaciones más jóvenes tras la aparición de la hepatitis. Pero la causa es hasta la fecha desconocida. En el pasado, para detectar el cáncer hepático en pacientes de alto riesgo se realizaba periódicamente un cribado utilizando un ensayo inmunológico de los marcadores tumorales existentes, AFP (alfafetoproteína) y PIVKA-II (proteína inducida por la ausencia de vitamina K-II), y la monitorización mediante ecografía (ultrasonografía).

Para los pacientes con sospecha de presentar un cáncer hepático mediante estas pruebas, la ubicación, tamaño y número de cánceres hepáticos se confirman mediante técnicas de diagnóstico por la imagen, ecografía más detallada, TC (tomografía computarizada) o RNM (resonancia nuclear magnética). Además, el cáncer hepático se diagnostica finalmente utilizando una prueba anatomopatológica mediante biopsia, si es necesario. Una vez diagnosticado definitivamente, el cáncer hepático se somete a tratamiento: hepatectomía, embolización trans-arterial (TAE), tratamiento por punción (terapia con inyección de etanol percutánea (PEIT), ablación con radiofrecuencia (RFA) o terapia de coagulación con microondas (MCT). Sin embargo, las tasas de recurrencia del cáncer hepático son extremadamente elevadas, dado que no se ha eliminado el virus y las enfermedades hepáticas no se han curado, aunque se hayan tratado.

Si el cáncer hepático se detecta en una fase precoz (inferior a 3 cm de diámetro, inferior a 5 cm de diámetro y único o tumores bien diferenciados) mediante los ensayos inmunológicos y la ecografía actualmente utilizados, y se trata adecuadamente, el pronóstico es relativamente bueno. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad de los marcadores tumorales existentes, AFP y PIVKA-II, utilizados para el ensayo inmunológico, son insuficientes. Especialmente, en el caso de carcinomas hepáticos de fases precoces ambos marcadores poseen una sensibilidad remarcablemente baja (ver literatura no patente 1, 2, 3 y 4). Por lo tanto, es difícil detectar el cáncer hepático en una fase precoz, la mayoría de casos ya han progresado a un cáncer avanzado cuando se detectan, y la tasa relativa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con cáncer hepático es muy mala en comparación con otros cánceres (ver literatura no patente 5).

Por otro lado, mejoras recientes en los instrumentos de ecografía nos han permitido detectar el cáncer hepático en fases precoces, pero no es adecuada para el cribado de pacientes de alto riesgo de cáncer hepático debido a algunos problemas como la necesidad de alrededor de 30 minutos para prueba, la necesidad de habilidades técnicas, la dependencia de las cualidades técnicas de los instrumentos, y que sigue teniendo una tasa de penetración baja en los hospitales generales. Además, dado que es difícil examinar todo el hígado, especialmente las partes ocultas por otros órganos y completamente dentro del hígado, existe el riesgo de pasar por alto un cáncer hepático. Por lo tanto, no existen métodos suficientemente satisfactorios para la detección del cáncer hepático, especialmente en fases precoces.

Los avances recientes de la biología molecular están clarificando las características de las modificaciones del ADN sin cambios genéticos y las alteraciones de las secuencias de nucleótidos en las células cancerosas humanas. Son bien conocidos, como ejemplos representativos, las características de los cambios, las mutaciones, la amplificación y la pérdida de genes. En estudios epigenéticos recientes, se ha notificado que genes concretos están altamente y anómalamente metilados en células variables, especialmente células cancerosas. En los eucariotas superiores, el ADN genómico está solamente metilado en los residuos citosina en dinucleótidos

CpG, la región CpG se denomina "isla CpG" y es conocido que existe en aproximadamente la mitad del genoma humano total. Generalmente, la isla CpG se encuentra en la región promotor, y en dicho caso la metilación está muy relacionada con la regulación de la expresión génica. Brevemente, en los casos no metilados los genes se expresan (el ARNm se transcribe), pero en los casos metilados está, por el contrario suprimida a través de algunos procesos

5 del sistema de regulación. Es conocido que esta regulación de la expresión génica mediante la metilación es específica de tejido, desarrollo, diferenciación, enfermedad, sexo o edad. Especialmente, dado que la supresión de la expresión génica debida a una metilación anómala elevada de la isla CpG se observa frecuentemente en las células cancerosas o transformadas, se considera que está relacionada con la carcinogénesis.

10 En base a estas evidencias de estudios básicos, hasta la fecha se han realizado estudios clínicos en diversos cánceres sobre la asociación entre la metilación anómala elevada de la isla CpG y la carcinogénesis. En el cáncer hepático se han realizado estudios clínicos similares, y se ha notificado que se observa una metilación anómala elevada de ciertos genes en tejidos tumorales de pacientes con cáncer hepático (ver literatura no patente 6, 7, y 8). La mayoría de desarrollos recientes, por ejemplo, la correlación positiva entre el fenotipo metilador de la isla CpG

15 (CIMP) y los niveles de AFP en el carcinoma hepatocelular (HCC) sugieren que la CIMP puede servir como marcador molecular del desarrollo de HCC avanzado (ver literatura no patente 16) y que la hipermetilación de genes, por ejemplo, HAI-2/PB, se produce frecuentemente en tumores HCC primarios (ver literatura no patente 17).

20 En consecuencia, se infiere que la utilización de la identificación de la metilación de genes concretos en células cancerosas o sus fragmentos de ADN como método diagnóstico es muy útil para la detección del cáncer en fases precoces. Además, la metilación que se considera uno de los factores directamente relacionados con la carcinogénesis, se supone que se desarrolla antes de la aparición del cáncer para alterar la progresión o alteración maligna del cáncer, y que muestra perfiles diferentes en diferentes pacientes o condiciones clínicas. Por lo tanto, la identificación de la metilación tiene posibilidades para permitir su utilización para la detección de lesiones precancerosas, la predicción de la recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático.

25

Sin embargo, los resultados anteriores de estudios clínicos se han obtenido utilizando ADN del tejido tumoral tras confirmación del diagnóstico en la muestra a analizar, y no puede cumplir con el uso como cribado para la detección del cáncer hepático en fases precoces o del riesgo de la aparición del cáncer hepático. Un ensayo que utiliza tejido no es adecuado para el análisis rutinario debido a que es de manipulación compleja y a la baja capacidad de procesamiento de muestras. Además, la sensibilidad y especificidad son insuficientes debido a una selección inadecuada de los genes a analizar y a la utilización de un solo gen en el análisis. Por lo tanto, en la práctica ha sido muy difícil utilizar la metilación de fragmentos de ADN en el diagnóstico del cáncer.

30

35 Por otro lado, cantidades diminutas de ADN circulan por la sangre, y especialmente es conocido que la cantidad de ADN en sangre aumenta en los pacientes con cáncer (ver literatura no patente 9 y 10). Se considera que es debido a que las células viejas se destruyen mediante muerte programada (apoptosis) o necrosis y que desde las mismas se liberan grandes cantidades de ADN a la sangre, mientras que el tejido tumoral sigue proliferando a una velocidad anómala. Dado que en la sangre, además del ADN del tejido tumoral, se encuentra ADN de diferentes tejidos o de las células sanguíneas, ha sido difícil discriminar el ADN derivado de un tejido concreto mediante tecnologías convencionales. Pero, la utilización del ADN de la sangre para el diagnóstico del cáncer es muy prometedora como diagnóstico de aplicación práctica.

40

#### 45 REFERENCIAS

- [Literatura patente 1] Tetzner R y otros, WO 2004/113567:24-25, 2004
- [Literatura no patente 1] Nomura F y otros Am J Gastroenterol 94:650-4, 1999
- [Literatura no patente 2] Martinez Cerezo FJ y otros Rev Esp Enferm Dig 84:311-4, 1993
- 50 [Literatura no patente 3] He YM y otros Hepatobiliary Pancreat Dis Int 4:50-4, 2005
- [Literatura no patente 4] Han SL y otros Hepatogastroenterology 52:348-51 2005
- [Literatura no patente 5] Osaka Cancer Registry, Annual report ("Informe anual del registro de cáncer de Osaka) 2006
- [Literatura no patente 6] Yu J y otros Cell Res 13:319-33, 2003
- 55 [Literatura no patente 7] Kanai Y y otros Hepatology 29:703-9, 1999
- [Literatura no patente 8] Kondo Y y otros Hepatology 32:970-9, 2000
- [Literatura no patente 9] Leon SA y otros J Immunol Methods 9:157-64, 1975
- [Literatura no patente 10] Ren N y otros World J Gastroenterol 12:3911-4, 2006
- [Literatura no patente 11] Herman JG y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 93:9821-6, 1996.
- 60 [Literatura no patente 12] Cottrell SE y otros, Nucleic Acids Res 32:e10, 2004.
- [Literatura no patente 13] Eads CA y otros, Nucleic Acids Res 28:e32, 2000.
- [Literatura no patente 14] Iizuka N y otros, Lancet 361:923-929, 2003
- [Literatura no patente 15] The General Rules for the Clinical and Pathologic Study of Primary Liver Cancer Liver Cancer Study Group of Japan ("Reglas generales para el estudio clínico y patológico del cáncer hepático primario. Grupo de estudio del cáncer hepático") 2ª ed. Tokio: Kanehara&CO., LTD, 2003.
- 65 [Literatura no patente 16] Zhang C y otros, Clin Cancer Res 13(3): 944-952 (2007)

[Literatura no patente 17] Fukai K y otros, Cancer Res 63: 8674-8679 (2003)

[Literatura no patente 18] Carpenter B y otros, Mol Cell Biol 24(2): 537-549 (2004)

## RESUMEN DE LA INVENCION

5 El objeto de la presente invención es solucionar los problemas del cribado o monitorización del cáncer hepático mediante ensayos inmunológicos con marcadores tumorales convencionales y ecografía en pacientes de alto riesgo de cáncer hepático, descubrir nuevos marcadores tumorales detectables con alta sensibilidad y especificidad, incluso en el cáncer hepático en fases precoces que es difícil de detectar mediante métodos convencionales, y dar a  
10 conocer un método sencillo, preciso y de alto rendimiento utilizando dichos marcadores, y un kit y un reactivo con los mismos. La presente invención también tiene el objetivo de presentar un método para la detección del cáncer hepático que puede automatizarse fácilmente utilizando muestras de sangre como dianas de la detección. Además, utilizando nuevos marcadores tumorales, también es un objeto de la presente invención hacer real la posibilidad de detectar lesiones precancerosas y predecir la recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático en pacientes de alto  
15 riesgo de cáncer hepático, y la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático en pacientes con cáncer hepático.

En consecuencia, los inventores han descubierto que es sorprendentemente posible detectar el cáncer hepático, especialmente el de fases precoces, con alta sensibilidad y especificidad, fácilmente y de forma precisa identificando  
20 y/o cuantificando la metilación de dos o más genes concretos, o de sus correspondientes fragmentos de ADN en muestras clínicas, que es posible detectar fácilmente el riesgo de cáncer hepático, el riesgo de recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático y la malignidad del cáncer hepático, que es posible monitorizar fácilmente la progresión en el tiempo del cáncer hepático, y han logrado la presente invención.

25 Brevemente, el punto principal de la presente invención es un método para la detección del cáncer hepático, la detección del riesgo de cáncer hepático, la detección de la recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático. De forma más específica, la presente invención versa sobre los siguientes procesos:

30 Un método para detectar la presencia y/o cantidad de citosina metilada específica del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG en el gen *BASP1* u opcionalmente en el gen *SRD5A2* que comprende las etapas (a) a (d) mencionadas más adelante, en el que la presencia y/o cantidad de citosina metilada específica del cáncer hepático en el gen *BASP1* y opcionalmente en el gen *SRD5A2* en una muestra de un paciente es indicativa de que el paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo  
35 de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta una cáncer hepático que está progresando en el tiempo, siendo las etapas a realizar las siguientes:

(a) aislar el ADN genómico de una muestra del paciente;

40 (b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químico o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas;

(c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas del gen *BASP1* y opcionalmente del gen *SRD5A2* en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y

45 (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y opcionalmente del gen *SRD5A2* en la muestra del paciente, lo que indica que el paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta una cáncer hepático que está progresando en el  
50 tiempo.

Otro objeto de la presente invención es un método para indicar que un paciente está afecto de cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer  
55 hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta una cáncer hepático que está progresando en el tiempo detectando la presencia y/o cantidad de citosina metilada específica de cáncer hepático en regiones que contienen secuencias CpG en al menos el gen *BASP1* y el gen *SPINT2*, opcionalmente en un gen adicional de los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra del paciente mediante el método que comprende las siguientes etapas (a) a (d) y mediante el uso en combinación con dicha presencia y/o cantidad de citosina metilada:

60 (a) aislar el ADN genómico de una muestra del paciente;

(b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químicos o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas;

65 (c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*,

opcionalmente de un gen adicional entre los genes SRD5A2, CFTR, CCND2, APC y RASSF1 en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y

- 5 (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*, y opcionalmente de un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra del paciente,

10 lo que indica que el paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta un cáncer hepático que está progresando en el tiempo.

15 Un objeto más específico de la presente invención es un método según cualquiera de los procesos mencionados previamente, en el que al menos una secuencia de nucleótidos de un par de cebadores es complementaria a una secuencia de nucleótidos del ADN genómico de una región que contiene residuos de citosina que pueden metilarse, y que puede hibridarse específicamente a dicha secuencia de nucleótidos de ADN genómico cuando dichas citosinas están metiladas.

20 Alternativamente, una realización preferente de la presente invención es un método según los procesos mencionados previamente, en el que al menos una secuencia de nucleótidos de un par de cebadores de PCR puede hibridarse específicamente a una región que no contiene ningún residuo citosina que pueda metilarse y se utiliza simultáneamente con oligonucleótidos para bloquear la amplificación por dichos cebadores de PCR, en el que dichas secuencias de nucleótidos de dichos oligonucleótidos se superponen parcialmente con las secuencias de nucleótidos de dichos cebadores de PCR, son complementarias a secuencias de nucleótidos en otras partes del ADN genómico en una región que contiene residuos que pueden metilarse y en el que dichos oligonucleótidos puede hibridarse específicamente a dichas secuencias de nucleótidos del ADN genómico cuando dichas citosinas no están metiladas.

30 Es una realización preferente de cualquiera de los procesos descritos, aquella en la que como tratamiento químico en la etapa (b) se añade al ADN genómico un reactivo para la conversión de la citosina no metilada en uracilo, de manera que esencialmente todas las citosinas no metiladas de dicho ADN se convierten en uracilo. Preferentemente, el reactivo para la conversión de las citosinas no metiladas en uracilo en dicho ADN es un reactivo que contiene bisulfito, por ejemplo, el bisulfito sódico y/o el sulfito sódico y/o el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

35 Es otra realización preferente de cualquiera de los procesos descritos, aquella en la que como tratamiento enzimático en la etapa (b) se añade al ADN genómico un enzima de restricción que es incapaz de digerir los sitios de restricción que contienen citosinas metiladas y puede digerir los sitios de restricción que no contienen citosinas metiladas.

40 Son preferentes las muestras sanguíneas, a las que se aplican simultáneamente las concentraciones de las proteínas marcador tumoral utilizadas convencionalmente, por ejemplo AFP y/o PIVKA-II, y/o la cantidad de ADN libre circulante, por ejemplo, la cantidad de gen *GSTP1*.

45 Los métodos de la presente invención son preferentes para determinar el cáncer hepático en fases precoces.

Las muestras a utilizar, según la presente invención, derivan del suero, plasma, sangre total, tejidos, células sanguíneas, excreciones o secreciones internas/externas humanas.

50 Además, son realizaciones preferentes, según la presente invención, aquellas en las que en la etapa (c) se realiza una amplificación, mediante PCR en tiempo real utilizando una sonda fluorescente.

55 La invención también versa sobre un método, en el que un par de cebadores de PCR pueden hibridarse específicamente a secuencias de del ADN genómico que no contienen ningún residuo de citosina que pueda metilarse en al menos su extremo 3', y en el que se determina la presencia y/o cantidad de citosina metilada en productos amplificados por dichos cebadores de PCR mediante análisis de secuenciación o espectrometría de masas en la etapa (d).

60 Según la presente invención, son preferentes los siguientes pares de cebadores que comprenden cebadores de dos ácidos nucleicos:

- 1) *BASP1\_MS*F (Identificador de secuencia nº: 1) Y *BASP1\_MS*R (Identificador de secuencia nº: 2), y opcionalmente al menos un par de cebadores seleccionados del grupo de pares de cebadores siguiente:
- 65 2) *SPINT2\_MS*F (Identificador de secuencia nº: 3) y *SPINT2\_MS*R (Identificador de secuencia nº: 4),

- 3) APC\_MSF (Identificador de secuencia nº: 5) y APC\_MSR (Identificador de secuencia nº: 6),
- 4) CCND2\_MSF (Identificador de secuencia nº: 7) y CCND2\_MSR (Identificador de secuencia nº: 8),
- 5) CFTR\_MSF (Identificador de secuencia nº: 9) y CFTR\_MSR (Identificador de secuencia nº: 10),
- 6) RASSF1\_MSF (Identificador de secuencia nº: 11) y RASSF1\_MSR (Identificador de secuencia nº: 12),  
y
- 7) SRD5A2\_MSF (Identificador de secuencia nº: 13) y SRD5A2\_MSR (Identificador de secuencia nº: 14).

Las siguientes sondas preferentes según la invención se seleccionan del grupo formado por:

- 1) BASP1\_TMP (Identificador de secuencia nº: 31), y opcionalmente al menos una sonda seleccionada del grupo de sondas siguiente:
- 2) SPINT2\_TMP (Identificador de secuencia nº: 32),
- 3) APC\_TMP (Identificador de secuencia nº: 33),
- 4) CCND2\_TMP (Identificador de secuencia nº: 34),
- 5) CFTR\_TMP (Identificador de secuencia nº: 35),
- 6) RASSF1\_TMP (Identificador de secuencia nº: 36), y
- 7) SRD5A2\_TMP (Identificador de secuencia nº: 37).

Otro objeto de la presente invención es un kit, para ser utilizado para cualquiera de los métodos de detección de la presencia y/o cantidad de bases citosina metiladas específicas del cáncer hepático o para indicar que un paciente está afecto de cáncer hepático o puede padecer un cáncer hepático en el futuro, comprendiendo dicho kit:

- (a) al menos uno de los pares de cebadores que comprenden el Identificador de secuencia nº: 1 y el Identificador de secuencia nº: 2 y opcionalmente al menos uno de los otros pares de cebadores especificados previamente, y/o
- (b) al menos una de las sondas comprendiendo el Identificador de secuencia nº: 31 y opcionalmente al menos otra de las sondas especificadas previamente.

Un objeto adicional de la presente invención es un reactivo, para ser utilizado con cualquiera de los métodos para detectar la presencia y/o cantidad de bases citosinas metiladas específicas del cáncer hepático o para indicar que un paciente está afecto de cáncer hepático o puede padecer un cáncer hepático en el futuro, comprendiendo dicho reactivo:

- (a) al menos uno de los pares de cebadores que comprenden el Identificador de secuencia nº: 1 y el Identificador de secuencia nº: 2 y opcionalmente al menos uno de los otros pares de cebadores especificados previamente, y/o
- (b) al menos una de las sondas comprendiendo el Identificador de secuencia nº: 31 y opcionalmente al menos otra de las sondas especificadas previamente.

La presente invención se refiere además a un sistema instrumental, para ser utilizado en cualquiera de los métodos descritos previamente, que comprende:

- (a) al menos uno de los pares de cebadores especificados previamente, y/o
- (b) al menos una de las sondas especificadas previamente.

La presente invención también versa sobre la utilización de un par de cebadores o una sonda especificados previamente, en particular el Identificador de secuencia nº: 1 y el Identificador de secuencia nº: 2 y/o el Identificador de secuencia nº: 31, para detectar la presencia y/o cantidad de bases citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contienen secuencias CpG en un gen relacionado con el HCC en una muestra de un paciente, o para detectar en un paciente un cáncer hepático, un riesgo de cáncer hepático, un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, un cáncer hepático maligno o un cáncer hepático que progresa en el tiempo.

Es posible detectar el cáncer hepático, especialmente aquél en fases precoces, en muestras clínicas fácilmente y de

forma precisa mediante el método de análisis de la presente invención, y se espera que contribuya a mejorar el resultado del tratamiento de los pacientes con cáncer hepático mediante la detección de antemano del riesgo de cáncer hepático y de recurrencia tras tratamiento del mismo. Como otra utilización, se espera proporcionar una indicación para decidir el régimen de tratamiento del cáncer hepático mediante la detección de su malignidad y la monitorización de su progresión en el tiempo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### (1) Genes metilados específicos de cáncer hepático

Los inventores seleccionaron los genes cuyo nivel de expresión está específicamente reducido en los tejidos tumorales, es decir, aquellos en los que es más probable que sus islas CpG estén altamente metiladas, comparando los niveles de expresión génica de setenta y seis casos de tejido tumoral y dieciséis casos de tejido no tumoral extirpados de pacientes con cáncer hepático mediante cirugía, además, escogieron veintitrés genes metilados candidatos específicos de cáncer hepático que presentan, de hecho, islas CpG en sus regiones promotor. A continuación, se seleccionaron dos genes metilados candidato específicos de cáncer hepático, mediante la realización de un análisis de la metilación para dichos genes candidato del ADN genómico derivado de tejidos tumorales extirpados de pacientes con cáncer hepático de fases precoces. Además, al confirmar la detección de fragmentos de ADN metilado derivado de cáncer hepático específicos de dichos dos genes en la sangre de pacientes con cáncer hepático, se han identificado finalmente estos dos genes (el gen *BASP1* (Proteína de señal unida a membrana, abundante en el cerebro 1) y el gen *SRD5A2* (Polipéptido alfa 2 de la esteroide-2-alfa-reductasa)) como genes metilados específicos de cáncer hepático.

Ambos genes, el gen *BASP1* y el gen *SRD5A2*, ya han sido clonados y sus secuencias ADNc (ARNm) han sido registradas en GenBank (*BASP1*: NM\_006317, *SRD5A2*: NM\_000348). Sin embargo, jamás se ha indicado que las islas CpG de dichos dos genes estén altamente metiladas de forma específica en el cáncer. El gen *BASP1*, por ejemplo, se ha asociado con la regulación de la función de transcripción durante el desarrollo renal (ver literatura no patente 18). Los inventores de la presente invención son los primeros que sorprendentemente han evidenciado experimentalmente que dichos dos genes están altamente metilados en los tejidos de cáncer hepático pero raramente en tejidos hepáticos no tumorales. Es decir, han hallado que dichos dos genes están altamente metilados de forma específica en el cáncer hepático y son marcadores adecuados para la detección del mismo.

Por otro lado, de los doce genes de los cuales se ha notificado su metilación anómala específica del cáncer hepático en referencias previamente publicadas, se seleccionaron nueve genes metilados candidatos específicos de carcinoma hepático, mediante la realización de análisis de la metilación del ADN genómico derivado de tejidos tumorales extirpados de pacientes con cáncer hepático en fases precoces. Además, al confirmar la detección de fragmentos de ADN metilado derivado de cáncer hepático específicos de cinco de dichos nueve genes en la sangre de pacientes con cáncer hepático, se han identificado finalmente dichos cinco genes (gen *SPINT2* (gen Inhibidor de serín proteasas, tipo kunitz 2), gen *APC* (Poliposis adenomatosa del colon), gen *CCND2* (Ciclina D2), gen *CFTR* (Casete de unión a ATP, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística) y gen *RASSF1* (Familia dominio 1 de asociación a Ras (RaIGDS/AF-6))).

Todos estos cinco genes, los genes *SPINT*, *APC*, *CCND2*, *CFTR* y *RASSF1*, ya han sido clonados y sus secuencias ADNc (ARNm) han sido registradas en GenBank (*SPINT2*: NM\_021102, *APC*: NM\_000038, *CND2*: NM\_001759, *CFTR*: NM-000492, *RASSF1*: NM\_007182). Existen algunas notificaciones que indican que las islas CpG de dichos cinco genes estén altamente metiladas de forma específica en el cáncer hepático, pero su frecuencia de metilación ha sido variable y no existen notificaciones en pacientes con cáncer hepático positivos para VHC. El hecho de que estos cinco genes están altamente metilados en tejidos tumorales de cáncer hepático positivo para VHC pero raramente en tejidos hepáticos no tumorales, ha sido objetivado por primera vez por los inventores. Es decir, han hallado que dichos cinco genes están altamente metilados de forma específica en el cáncer hepático positivo para VHC y son marcadores adecuados para la detección del cáncer hepático, especialmente en el cáncer hepático positivo para VHC.

La presente invención versa en particular sobre un método para la detección de la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del carcinoma hepático en una región que contiene secuencias CpG en el gen *BASP1* y opcionalmente en el gen *SRD5A2* que comprende las siguientes etapas (a) a (d):

- (a) aislar el ADN genómico de una muestra de un paciente;
- (b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químico o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre las citosinas metiladas y no metiladas;
- (c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas en el gen *BASP1* y opcionalmente en el gen *SRD5A2* en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y
- (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una

región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y opcionalmente del gen *SRD5A2* en la muestra de dicho paciente,

5 de forma que la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en el gen *BASP1* y opcionalmente en el gen *SRD5A2* en una muestra de dicho paciente es indicativa de que dicho paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático o presenta un cáncer hepático maligno o presenta un cáncer hepático que está progresando en el tiempo.

10 Además, la presente invención versa sobre un método para indicar que un paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático o presenta un cáncer hepático maligno o presenta un cáncer hepático que está progresando en el tiempo detectando la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en regiones que contienen secuencias CpG de la menos el gen *BASP1* y *SPINT2*, opcionalmente en un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra de dicho paciente comprendiendo dicho método las etapas siguientes (a) a (d):

- 15 (a) aislar el ADN genómico de la muestra del paciente;
- 20 (b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químico o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas;
- 25 (c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*, opcionalmente de un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y
- 30 (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*, y opcionalmente de un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra de dicho paciente.

Un cáncer detectable por la presente invención es preferentemente un cáncer hepático, más preferentemente un carcinoma hepatocelular (HCC) y de forma más preferente un HCC positivo para VHC. En la presente invención, la detección del cáncer hepático significa juzgar si se sospecha que un individuo presenta o no un cáncer hepático. Cuando se sospecha que un individuo presenta un cáncer hepático, éste se diagnostica definitivamente mediante técnicas de diagnóstico por la imagen y pruebas anatómopatológicas.

Según la presente invención, la detección del riesgo de cáncer hepático significa juzgar si es altamente posible o no que un individuo desarrolle un cáncer hepático en el futuro próximo.

40 Según la presente invención, la detección de la recurrencia del cáncer hepático significa juzgar si existe una probabilidad o no de recidiva el cáncer hepático en un individuo tras el tratamiento del mismo.

Según la presente invención, la detección de la malignidad de un cáncer hepático significa juzgar si el cáncer hepático que se está desarrollando en un individuo es altamente maligno o no.

45 Según la presente invención, monitorizar la progresión del cáncer hepático en el tiempo significa juzgar si el cáncer hepático que se está desarrollando en un individuo está progresando en el tiempo o no.

50 Además, la presente invención versa sobre un método que utiliza muestras clínicas y detecta el cáncer hepático mediante la identificación y/o cuantificación de la metilación del gen *BASP1* y opcionalmente el gen *SRD5A2*, o sus fragmentos de ADN en dichas muestras, o del gen *BASP1* y el gen *SRD5A2* y al menos uno de los genes siguientes: gen *SPINT2*, gen *APC*, gen *CCND2*, gen *CFTR* y gen *RASSF1*, o sus fragmentos de ADN en dichas muestras. Se utilizan preferentemente combinaciones que comprenden tres o más genes, siendo más preferente según la presente invención la utilización de los genes *BASP1*, *SRD5A2* y *SPINT2*.

55 Según la presente invención, es posible utilizar la combinación de las concentraciones en sangre de las proteínas marcador tumoral utilizadas convencionalmente y/o la cantidad de ADN libre circulante en sangre con los resultados identificados y/o los valores cuantificados de citosina metilada en dichos siete genes. Las proteínas marcador tumoral utilizadas convencionalmente son preferentemente AFP y/o PIVKA-II, en particular AFP. La cantidad de ADN libre circulante es preferentemente el determinado para el gen *GSTP1*. Para determinar el ADN, puede utilizarse ADN antes o después del tratamiento con bisulfito (BIS), siendo preferente la utilización del ADN tras el tratamiento con bisulfito.

65 En principio las muestras clínicas no presentan limitación alguna, siempre y cuando se obtengan de individuos. Por ejemplo, según la presente invención son aplicables suero, plasma, sangre total, células sanguíneas, excreciones o secreciones internas/externas. Son preferentes el suero, plasma y sangre total, y es particularmente preferente la

utilización de suero. Como tejidos son adecuados las biopsias y el tejido extraído quirúrgicamente, son adecuadas como excreciones, las heces y la orina, y como muestras de secreciones internas/externas son adecuados la bilis y el líquido pancreático.

5 Tampoco los individuos o pacientes presentan limitaciones, siempre y cuando sean humanos. La presente invención se aplica preferentemente a pacientes de alto riesgo de cáncer hepático (hepatitis crónica o cirrosis hepática), y en particular a pacientes de alto riesgo de cáncer hepático positivos para VHC o pacientes con cáncer hepático. Los pacientes que han padecido un cáncer hepático y que han recibido los tratamientos adecuados pueden incluirse como pacientes de alto riesgo de cáncer hepático,

10

## **(2) identificación y/o cuantificación de la metilación**

Según la presente invención la "identificación y/o cuantificación de la metilación de genes concretos" significa identificar la metilación de los residuos citosina contenidos en dinucleótidos CpG o isla CpG en regiones promotor de genes concretos en muestras clínicas y/o cuantificar el nivel de dicha metilación.

15

Los métodos para la identificación y/o cuantificación de la metilación son preferentemente la PCR específica de la metilación (MSP) (ver literatura no patente 11) y/o la PCR-HM (HeavyMethyl PCR) (ver literatura no patente 12) y la TaqMan-MSP y/o la TaqMan-PCR-HM (ver literatura no patente 13) siendo las sondas TaqMan particularmente preferentes según la presente invención. Como reactivos de amplificación, puede utilizarse un reactivo de preparación propia según métodos públicos, utilizándose preferentemente el kit LightCycler- TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH).

20

MSP significa un método según la presente invención, en el que al menos una de las secuencias de un par de cebadores de PCR es complementaria a una secuencia del ADN genómico en una región que contiene residuos citosina que pueden metilarse, y puede hibridarse específicamente a dicha secuencia de nucleótidos del ADN genómico cuando dichas citosinas están metiladas. En concreto, se produce la amplificación mediante PCR con cebadores de PCR que pueden hibridarse específicamente a la secuencia de nucleótidos que contiene dichas citosinas metiladas, cuando las citosinas que pueden metilarse están metiladas. PCR-HM significa un método según la presente invención, en el que al menos uno de un par de cebadores puede hibridarse específicamente a una región que no contiene ningún residuo citosina que pueda metilarse y se utiliza simultáneamente con oligonucleótidos para bloquear la amplificación por dichos cebadores de PCR, en el que dichas secuencias de nucleótidos de dichos oligonucleótidos, se superponen parcialmente con las secuencias de nucleótidos de dichos cebadores de PCR, son complementarias a secuencias de nucleótidos de otras partes del ADN genómico en una región que contiene residuos que pueden metilarse y en el que dichos oligonucleótidos puede hibridarse específicamente a dichas secuencias de nucleótidos del ADN genómico cuando dichas citosinas no están metiladas. En concreto, se utilizan simultáneamente cebadores de PCR pueden hibridarse específicamente a secuencias de nucleótidos que no contienen citosinas que puedan metilarse, es decir, cebadores de PCR no específicos de la metilación, independientes de la metilación de las citosinas, y oligonucleótidos (sondas bloqueantes) adecuadas para bloquear la amplificación por dichos cebadores.

25

30

35

40

Dichas sondas bloqueantes se superponen parcialmente con dichos cebadores de PCR. Por lo tanto, cuando dichas sondas bloqueantes se hibridan a las secuencias de nucleótidos diana, se bloquea la amplificación porque dichos cebadores de PCR no son capaces de hibridarse. Dichas sondas bloqueantes son complementarias de secuencias que contienen citosinas que pueden metilarse de otras parte y pueden hibridarse específicamente a secuencias de nucleótidos que contienen dichas citosinas no metiladas cuando dichas citosinas no están metiladas. En consecuencia, se realiza la amplificación con dichos cebadores y la ausencia o presencia de metilación puede detectarse dependiendo de la ausencia o presencia de dicha amplificación con dichos cebadores, solamente cuando las citosinas están metiladas.

50

Además, es posible aplicar otros métodos para la identificación y/o cuantificación de la metilación de acuerdo con la invención, por ejemplo, análisis de secuenciación o espectrofotometría de masas, siendo preferente el análisis de secuenciación utilizando el Pyrosequencer (Biotage AG).

55

Según la presente invención, es necesario extraer el ADN de las muestras clínicas para su tratamiento previo a la identificación y/o cuantificación de la metilación de genes concretos. Por ejemplo, para la extracción del ADN pueden utilizarse kits comercializados como el MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH) o el QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN GmbH) o reactivos preparados según métodos conocidos. Se utiliza preferentemente la extracción de ADN utilizando el kit Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

60

El ADN extraído se trata con un reactivo bisulfito convirtiéndose las citosinas no metiladas del ADN en uracilos (tratamiento BIS). Para el tratamiento BIS pueden utilizarse kits comercializados como el EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN GmbH), el EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research Corporation) o el DNA Modification Kit (Chemicon• International, Inc.), o reactivos preparados según métodos conocidos.

65

El ADN cuyas citosinas no metiladas se han convertido en uracilos mediante dicho tratamiento BIS se amplifica en regiones que incluyen islas CpG mediante un método de amplificación de ácidos nucleicos como la PCR, y se confirma que las citosinas no metiladas se han convertido con regularidad a uracilos utilizando dichos productos amplificados.

5 En concreto, se realiza mediante la amplificación de ácido nucleicos utilizando cebadores para amplificar secuencias de nucleótidos de citosinas metiladas que no son convertidas a uracilos por el tratamiento BIS y de citosinas no metiladas que son convertidas a uracilos, y confirmando dichos productos amplificados mediante electroforesis y/o análisis de secuenciación de dichos productos amplificados.

10 La longitud de dichos productos amplificados puede ser normalmente inferior a las 1.000 bp, preferentemente es inferior a la 180 bp y de forma particularmente preferente está alrededor de las 100 bp.

15 En la tabla 1 se muestran los grupos de cebadores preferentes y la longitud de los productos amplificados por dichos grupos de cebadores de la presente invención.

**Tabla1: Grupos de cebadores para la amplificación MSP de genes metilados específicos del cáncer hepático**

Grupo de cebadores	Cebador directo	Cebador inverso	Longitud de los productos (bp)
1	BASP1_MS (Identificador de secuencia nº 1)	BASP1_MS (Identificador de secuencia nº 2)	96
2	SPINT2_MS (Identificador de secuencia nº 3)	SPINT2_MS (Identificador de secuencia nº 4)	118
3	APC_MS (Identificador de secuencia nº 5)	APC_MS (Identificador de secuencia nº 6)	127
4	CCND2_MS (Identificador de secuencia nº 7)	CCND2_MS (Identificador de secuencia nº 8)	85
5	CFTR_MS (Identificador de secuencia nº 9)	CFTR_MS (Identificador de secuencia nº 10)	139
6	RASSF1_MS (Identificador de secuencia nº 11)	RASSF1_MS (Identificador de secuencia nº 12)	75
7	SRD5A2_MS (Identificador de secuencia nº13)	SRD5A2_MS (Identificador de secuencia nº14)	93
8	BASP1_F (Identificador de secuencia nº 15)	BASP1_R (Identificador de secuencia nº 16)	458
9	SPINT2_F (Identificador de secuencia nº 17)	SPINT2_R (Identificador de secuencia nº 18)	361
10	APC_F (Identificador de secuencia nº 19)	APC_R (Identificador de secuencia nº 20)	479
11	CCND2_F (Identificador de secuencia nº 21)	CCND2_R (Identificador de secuencia nº 22)	427
12	CFTR_F (Identificador de secuencia nº 23)	CFTR_R (Identificador de secuencia nº 24)	445
13	RASSF1_F (Identificador de secuencia nº 25)	RASSF1_R (Identificador de secuencia nº 26)	410
14	SRD5A2_F (Identificador de secuencia nº 27)	SRD5A2_R (Identificador de secuencia nº 28)	465
15	SPINT2_HMF (Identificador de secuencia nº 29)	SPINT2_HMR (Identificador de secuencia nº 30)	162

20 De la amplificación de ácidos nucleicos anterior, se muestran en la tabla 2 las sondas TaqMan que permiten identificar específicamente y/o cuantificar las citosinas metiladas mediante PCR en tiempo real con la utilización simultánea de los grupos de cebadores 1 a 7 descritos en la tabla 1. Estas sondas se marcan con dos substancias fluorescentes diferentes en sus extremos 5' y 3'. La utilización de substancias fluorescentes no está limitada, siempre y cuando sean dos substancias fluorescentes diferentes. El extremo 5' se marca preferentemente, por ejemplo, con FAM y el extremo 3' particularmente con TAMRA.

**Tabla 2: Sondas TaqMan para identificar los productos amplificados por MSP de genes metilados específicos del cáncer hepático**

Grupo de cebadores	Sonda TaqMan	Marcador fluorescente en el extremo 5'	Marcador fluorescente en el extremo 3'
1	BASP1_TMP (Identificador de secuencia nº 31)	FAM	TAMRA
2	SPINT2_TMP (Identificador de secuencia nº 32)	FAM	TAMRA
3	APC_TMP (Identificador de secuencia nº 33)	FAM	TAMRA
4	CCND2_TMP (Identificador de secuencia nº 34)	FAM	TAMRA
5	CFTR_TMP (Identificador de secuencia nº 35)	FAM	TAMRA
6	RASSF1_TMP (Identificador de secuencia nº 36)	FAM	TAMRA
7	SRD5A2_TMP (Identificador de secuencia nº 37)	FAM	TAMRA
15	SPINT2_TMP (Identificador de secuencia nº 32)	FAM	TAMRA

- 5 De la amplificación de ácidos nucleicos anterior, se muestran en la tabla 3 las sondas bloqueantes que permiten identificar específicamente y/o cuantificar las citosinas metiladas mediante una reacción PCR-HM con la utilización simultánea del grupo de cebadores 15 descrito en la tabla 1. Estas sondas bloqueantes están protegidas con una sustancia marcada. La sustancia marcada en principio no está limitada, siempre y cuando pueda bloquearse la reacción de extensión desde dicha sonda bloqueante, y está preferentemente marcada con fosfato. Además, dichas sondas bloqueantes pueden utilizarse como reactivo único y preferentemente se utilizan ambas sondas a la vez.
- 10

**Tabla 3: Sondas bloqueantes para la PCR-HM de genes metilados específicos del cáncer hepático**

Grupo de cebadores	Sonda TaqMan	Marcador en el extremo 3'
15	SPINT2_HMBF (Identificador de secuencia nº 38)	Fosfato
15	SPINT2_HMBR (Identificador de secuencia nº 39)	Fosfato

- 15 La presente invención versa sobre los cebadores y sondas anteriores, así como sobre un método para la detección del cáncer hepático, la detección del riesgo de cáncer hepático, la detección de la recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático. Además, la presente invención incluye un kit y un reactivo para la detección del cáncer hepático, el reactivo puede incluir cebadores y sondas y el kit puede contener reactivos para la extracción del ADN, tratamiento BIS y la amplificación de ácidos nucleicos. Esta invención incluye un sistema instrumental para la
- 20 detección del cáncer hepático, la detección del riesgo de cáncer hepático, la detección de la recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático que utiliza un, método, un kit, un reactivo, cebadores y sondas para la detección del cáncer hepático, la detección del riesgo de cáncer hepático, la detección de la recurrencia tras
- 25 tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático.

- 30 Como los expertos en la técnica entenderán fácilmente, pueden eliminarse o añadirse algunas bases al extremo 5' de los identificadores de secuencia nº 1 a 14 de dichos cebadores con la condición de que puedan amplificar dichos siete genes con metilación específica de las citosinas. En consecuencia, los cebadores de la presente invención incluyen cebadores en los que se han eliminado o añadido algunas bases a los identificadores de secuencia nº 1 a 30, siempre y cuando cumplan dicha condición. Pueden eliminarse o añadirse algunas bases de los extremos de dichas sondas con la condición de que puedan hibridarse con secuencias de nucleótidos que incluyen citosinas

metiladas en productos amplificados utilizando los identificadores de secuencia nº 1 a 14 en dichos cebadores, es decir, que retengan la especificidad de hibridación original específica de dichas sondas.

5 En consecuencia, las sondas de la presente invención incluyen sondas en las que se han eliminado o añadido algunas bases a los identificadores de secuencia nº 31 a 37, siempre y cuando cumplan dicha condición. Además, comprenden cadenas complementarias de dichas sondas. Pueden eliminarse o añadirse algunas bases a los extremos de dichas sondas bloqueantes con la condición de que pueden bloquear la amplificación utilizando el grupo de cebadores 15. En consecuencia, las sondas bloqueantes de la presente invención incluyen sondas  
10 bloqueantes en las que se han eliminado o añadido algunas bases a los identificadores de secuencia nº 38 y 39, siempre y cuando cumplan dicha condición.

A continuación, la presente invención se explicará con mayor detalle mostrando ejemplos que se realizarán en la práctica utilizando muestras conocidas. No obstante, el alcance al que se extiende esta invención no está limitado a estos ejemplos totalmente.  
15

### **Ejemplo 1. Identificación de genes metilados específicos del cáncer hepático**

Utilizando "Affymetrix Human Genome U95A DNA Chips®", se seleccionaron ciento un genes cuyo nivel de expresión estaba específica y significativamente reducido dos veces o más en los tejidos tumorales, es decir, en los  
20 que era más probable que sus islas CpG estuvieran altamente metiladas, comparando los niveles de expresión entre setenta y seis casos de tejidos tumorales y dieciséis casos de tejidos no tumorales extirpados de pacientes con cáncer hepático mediante cirugía. Además, de dichos genes se seleccionaron veintitrés genes metilados candidato específicos del cáncer hepático que realmente poseen islas CpG en sus regiones promotor.

25 A continuación se trató con BIS 1 µg de ADN genómico de tejido tumoral obtenido de veinte casos de pacientes con cáncer hepático en fases precoces (cáncer hepático cuyo estadio de clasificación es estadio I o II, y el tamaño tumoral es inferior a entre 1,3 y 3,6 cm), se amplificaron mediante PCR las regiones que incluyen islas CpG de los veintitrés genes candidato anteriores utilizando dicho ADN tratado con BIS como molde y se examinó el estado de metilación mediante secuenciación directa. También se analizó simultáneamente el estado de metilación de los ADN  
30 genómicos de tejidos hepáticos normales y leucocitos como muestras control. En concreto, como resultado del análisis de la metilación se seleccionaron cuatro genes que estaban altamente metilados en los tejidos tumorales pero que no lo estaban en los tejidos hepáticos normales y los leucocitos.

Además, el análisis de la metilación con el mismo procedimiento de ADNs genómicos de pares de tejido tumoral y  
35 tejido no tumoral extraídos del hígado de veinte nuevos casos de pacientes con cáncer hepático diferentes de los pacientes con cáncer hepático anteriores, se determinaron dos genes metilados candidato específicos del cáncer hepático que estaban altamente metilados en dichos tejidos tumorales pero no en los tejidos no tumorales. Además, al confirmarse la detección en sangre de pacientes con cáncer hepático de fragmentos de ADN metilado derivado del cáncer hepático específicos para dichos dos genes, finalmente se identificaron dichos dos genes (genes BASP1 i  
40 SRD5A2) como genes metilados específicos del cáncer hepático.

Por otro lado, se seleccionaron doce genes, cuya metilación específica del cáncer hepático había sido notificada en referencias previamente publicadas. A continuación, se trató con BIS 1 µg de ADN genómico de tejido tumoral  
45 obtenido de veinte casos de pacientes con cáncer hepático en fases precoces (cáncer hepático cuyo estadio de clasificación es estadio I o II, y el tamaño tumoral es inferior a entre 1,3 y 3,6 cm), se amplificaron mediante PCR las regiones que incluyen islas CpG de dichos doce genes candidato utilizando dicho ADN tratado con BIS como molde, y se examinó el estado de metilación mediante secuenciación directa. También se analizó simultáneamente el estado de metilación de los ADNs genómicos de tejidos hepáticos normales y leucocitos como muestras control. Como resultado del análisis de la metilación, se seleccionaron nueve genes que estaban altamente metilados en los  
50 tejidos tumorales pero que no lo estaban en los tejidos hepáticos normales y los leucocitos.

Además el análisis de la metilación de dichos nueve genes con el mismo procedimiento en los ADN genómicos de pares de tejido tumoral y tejido no tumoral extraídos del hígado de veinte nuevos casos de pacientes con cáncer  
55 hepático diferentes de los pacientes con cáncer hepático anteriores, se determinaron nueve genes metilados candidato específicos del cáncer hepático que estaban altamente metilados en dichos tejidos tumorales pero no en los tejidos no tumorales. Además, al confirmarse la detección en sangre de pacientes con cáncer hepático de fragmentos de ADN metilado derivado del cáncer hepático específicos para cinco de dichos nueve genes, se identificaron finalmente dichos cinco genes (genes SPINT2, APC, CCND2, CFTR y RASSF1) como genes metilados  
60 específicos del cáncer hepático.

### **Ejemplo 2. Evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático en un pequeño número de casos**

Se extrajo el ADN total de 1 mL de suero obtenido de nueve casos de cáncer hepático positivo para VHC en fases  
65 precoces (cáncer hepático bien diferenciado) y de diecinueve casos de pacientes de alto riesgo de cáncer hepático

(hepatitis crónica y cirrosis hepática) positivos para VHC utilizando el kit Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µL de solución de ADN.

Se trató dicha solución con BIS utilizando un reactivo de preparación propia preparando 50 µL de solución de ADN tratado con BIS. A continuación, se realizó la PCR específica de metilación (MSP) de cada uno de los siete genes metilados específicos del cáncer hepático (genes *BASP1*, *SPINT2*, *APC*, *CCND2*, *CFTR*, *RASSF1* y *SRD5A2*) con 5 µL de dicha solución de ADN tratado con BIS. En dichas MSP, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real añadiendo concomitantemente sondas TaqMan específicas para cada gen. La cuantificación del ADN se realizó realmente mediante el procedimiento siguiente.

#### Genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2*, *CFTR* y *RASSF1*

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler® TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler® II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µL de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR que contenía cada grupo de cebadores y cada sonda TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µL.

Para los genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2* y *RASSF1*, la amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 63 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos. Para el gen *CFTR*, la amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 64 °C durante 60 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos. Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl para los genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2* y *RASSF1* y a 200, 50 y 20 pg/µl para el gen *CFTR*). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

**Tabla 4: Composición de la mezcla de la reacción MSP para genes metilados específicos del cáncer hepático**

Gen	Grupo de cebadores		Sonda TaqMan	
		Conc. (µM)		Conc. (µM)
<i>BASP1</i>	1	0,25	<i>BASP1_TMP</i> (Identificador de secuencia nº 31)	0,1
<i>SPINT2</i>	2	0,25	<i>SPINT2_TMP</i> (Identificador de secuencia nº 32)	0,1
<i>CCND2</i>	4	0,25	<i>CCND2_TMP</i> (Identificador de secuencia nº 34)	0,1
<i>CFTR</i>	5	0,6	<i>CFTR_TMP</i> (Identificador de secuencia nº 35)	0,1
<i>RASSF1</i>	6	0,25	<i>RASSF1_TMP</i> (Identificador de secuencia nº 36)	0,1

#### Genes *APC* y *SRD5A2*

La PCR en tiempo real se realizó utilizando un reactivo de preparación propia como reactivo de amplificación y el LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS tras añadir el grupo de cebadores, la sonda TaqMan, el acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones o cantidades mostradas en la tabla 5 en la mezcla de reacción de la PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol al 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en volumen total de 20 µL. Para el gen *APC* la amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 64 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

Para el gen *SRD5A2*, la amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 66 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos. La amplificación del gen diana se monitorizó mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 50, 20 y 4 pg/µl para el gen *APC*, y a 200, 40, 10 y 4 pg/µl para el gen *SRD5A2*). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

**Tabla 5: Composición de la mezcla de la reacción MSP para genes metilados específicos del cáncer hepático**

Gen	Grupo de cebadores		Sonda TaqMan		Acetato potásico 2M	Aptamer48
		Conc. (µM)		Conc. (µM)	Cantidad (µL)	Cantidad (µL)
APC	3	0,5	APC_TMP (Identificador de secuencia nº 33)	0,25	1	0
SRD5A2	7	0,4	SRDSA2_TMP (Identificador de secuencia nº 37)	0,05	0,2	0,04

Se calculó el coeficiente de Fisher para cada gen mediante el método notificado por Iizuka y otros (ver literatura no patente 14) utilizando la cantidad de ADN metilado de dichos siete genes en los nueve casos anteriores de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC en fases precoces y diecinueve casos de pacientes de alto riesgo de cáncer hepático positivos para VHC. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Cuanto mayor es el coeficiente de Fisher, más prometedor es el gen del resultado analizado. Por lo tanto, se demostró que particularmente el gen BASP1 era un gen prometedor.

**Tabla 6: Clasificación de la capacidad de discriminación entre pacientes con cáncer hepático en fases precoces y pacientes portadores de VHC de alto riesgo de cáncer hepático mediante el coeficiente de Fisher**

Clasificación	Gen	Coeficiente de Fisher
1	BASP1	1,10
2	SPINT2	0,58
3	CCND2	0,44
4	SRD5A2	0,37
5	APC	0,31
6	RASSF1	0,26
7	CFTR	0,12

En los cuatro mejores genes de la clasificación, según el coeficiente de Fisher mediante análisis ROC (característica operativa del receptor), se evaluó el rendimiento diagnóstico examinando la capacidad de dichos genes de detectar el cáncer hepático en fases precoces. También se evaluaron a la vez el rendimiento diagnóstico de la combinación de los dos genes mejores, genes BASP1 y SPINT2, y la combinación de tres genes con los dos mejores y el cuarto gen, genes BASP1, SPINT2 y SRD5A2. En concreto, el análisis ROC de cada gen individual se realizó directamente utilizando la cantidad de ADN metilado de cada gen (la cantidad de ADN metilado del gen BASP1 se denomina valor BASP1, denominando el resto de genes del mismo modo), y se realizó utilizando respectivamente los valores que se calcularon introduciendo dicha cantidad de ADN metilado en la fórmula: valor BASP1 + valor SPINT2 para la combinación de dos genes, y en la fórmula: 0,1 X valor BASP1 + valor SPINT2 + valor SRD5A2 para la combinación de tres genes.

Los resultados se muestran en la figura 1. Como resultado del análisis ROC anterior, mientras que no había ningún gen con un rendimiento diagnóstico suficiente para detectar el cáncer hepático en fases precoces utilizando un solo gen, se demostró un rendimiento diagnóstico lo suficientemente alto como para detectar el cáncer hepático en fases precoces combinando dos o tres genes. En concreto, fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 78 % y una especificidad del 95 % con la combinación de los genes BASP1 y SPINT2 y con una sensibilidad del 89 % y una especificidad del 90 % con la combinación de los genes BASP1, SPINT2 y SRD5A2. Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención es útil para la detección del cáncer hepático en fases precoces.

### **Ejemplo 3: Evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático con un número elevado de casos**

Se extrajo el ADN total de 1 ml de suero extraído de ciento diecinueve casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (incluyendo veinticinco casos de cáncer hepático en fase precoz cuya clasificación por estadios corresponde al estadio I (estadio basado en The General Rules for the Clinical ADN Pathologic Study of Primary Liver Cancer ("Normas generales para el estudio clínico y patológico del cáncer hepático primario, ver literatura no patente 15) y tamaño tumoral inferior a los 3 cm, y veintitrés casos de cáncer hepático en fase precoz bien diferenciado) y ochenta casos de pacientes de alto riesgo de cáncer hepático (hepatitis crónica y cirrosis hepática) positivos para VHC, utilizando el kit DNA Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µl de solución de ADN. Dicha solución se trató con BIS utilizando un reactivo de preparación propia y se prepararon 50 µl de ADN tratado con BIS.

A continuación, se realizaron las PCR específicas de metilación (MSP) de los siete genes metilados específicos del cáncer hepático (genes BASP1, SPINT2, APC, CCND2, CFTR, RASSF1 y SRD5A2) con 5 µl de dicha solución de

ADN tratado con BIS. En dicha MSP, añadiendo la sonda TaqMan específica de cada gen concomitantemente, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real. Por otro lado, de acuerdo con el método descrito en la literatura no patente 1, se determinó al mismo tiempo la cantidad de ADN total del suero con 1 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. La cuantificación del ADN metilado se realizó en realidad según el protocolo siguiente.

Genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2*, *CFTR* y *RASSF1*

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler• TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler• II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR en la que se habían mezclado los grupos de cebadores y las sondas TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. Para los genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2* y *RASSF1*, la amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 63 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos. Para el gen *CFTR*, la amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 64 °C durante 60 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl para los genes *BASP1*, *SPINT2*, *CCND2* y *RASSF1* y a 200, 50 y 20 pg/µl para el gen *CFTR*). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

Genes *APC* y *SRD5A2*

La PCR en tiempo real se realizó utilizando un reactivo de preparación propia como reactivo de amplificación y el LightCycler•2.0 (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µL de solución de ADN tratado con BIS tras añadir el grupo de cebadores, la sonda TaqMan, el acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones o cantidades mostradas en la tabla 5 en la mezcla de reacción de la PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol al 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en volumen total de 20 µl. Para el gen *APC* la amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 64 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

Para el gen *SRD5A2*, la amplificación se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 66 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos. La amplificación del gen diana se monitorizó mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 50, 20 y 4 pg/µl para el gen *APC*, y a 200, 40, 10 y 4 pg/µl para el gen *SRD5A2*). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

Se calculó el coeficiente de Fisher para cada gen mediante el método notificado por Iizuka y otros (ver literatura no patente 14) utilizando la cantidad de ADN metilado de dichos siete genes en los anteriores ciento diecinueve casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC y los ochenta casos de pacientes de alto riesgo de cáncer hepático. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Cuanto mayor es el coeficiente de Fisher más prometedor es el gen del resultado analizado. Por lo tanto se demostró que el gen *BASP1* y el gen *SPINT2* eran genes prometedores, y que particularmente el gen *BASP1* era un gen prometedor.

se realizó un análisis ROC utilizando la cantidad de ADN metilado de dichos genes *BASP1* y *SPINT2*. Por consiguiente, fue posible detectar el cáncer hepático con una sensibilidad del 50 % y una especificidad del 95 % o una sensibilidad del 62 % y una especificidad del 80 % con el gen *BASP1* solamente, y con una sensibilidad del 38% y una especificidad del 96 % con el gen *SPINT2* solamente. Por consiguiente se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado del gen *BASP1* y/o *SPINT2* de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos por la presente invención es útil para la detección del cáncer hepático.

**Tabla 7: Clasificación de la capacidad de discriminación entre pacientes con cáncer hepático en fases precoces y pacientes portadores de VHC de alto riesgo de cáncer hepático mediante el coeficiente de Fisher**

Clasificación	Gen	Coefficiente de Fisher
1	BASP1	0,0704
2	CFTR	0,0412
3	SPINT2	0,0365
4	RASSF1	0,0344
5	CCND2	0,0155
6	SRD5A2	0,0145
7	APC	0,0110

- 5 A continuación, se evaluó el rendimiento diagnóstico de la combinación de dichos genes examinando su capacidad para detectar el cáncer hepático combinando tres de los siete genes utilizando el análisis FLC (clasificador lineal de Fisher) en ciento diecinueve casos de pacientes con cáncer hepático, veintitrés casos de cáncer hepático en fase precoz cuya clasificación por estadios es estadio I y un tamaño tumoral inferior a 3 cm, o veintiún casos de cáncer hepático en fase precoz bien diferenciados. En concreto, se estableció un algoritmo de reducción de datos utilizando la cantidad de ADN metilado de cada gen mediante el método notificado por Iizuka y otros (ver literatura no patente 14), la sensibilidad, la especificidad y la tasa de reconocimiento para la detección del cáncer hepático se calcularon utilizando el mismo algoritmo, y se realizó un análisis RPC en base a los resultados de dicho análisis FLC. Los resultados se muestran en las figuras 2 a 4.
- 10
- 15 Como resultado de dichos análisis FLC y ROC, fue posible detectar el cáncer hepático con una sensibilidad del 70%, una especificidad del 80% y una tasa de reconocimiento del 74% utilizando la fórmula:  $0,9586 \times \text{valor BASP1} + 0,2843 \times \text{valor SPINT2} - 0,0078 \times \text{valor CFTR} + 0,3180$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos tres genes, BASP1, SPINT2 y CFTR, en ciento diecinueve casos de pacientes con cáncer hepático.
- 20
- 25 Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 52%, una especificidad del 88% y una tasa de reconocimiento del 79% utilizando la fórmula:  $- 0,003091 \times \text{valor BASP1} - 0,006448 \times \text{valor SPINT2} - 0,000655 \times \text{valor CCND2} + 0,350734$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos tres genes, BASP1, SPINT2 y CCND2, en veinticinco casos de pacientes con cáncer hepático en fases precoces cuya clasificación en estadios es estadio I con un tumor del tumor inferior a 3 cm. Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 67%, una especificidad del 80% y una tasa de reconocimiento del 77% utilizando la fórmula:  $- 0,009564 \times \text{valor BASP1} - 0,004042 \times \text{valor SPINT2} - 0,001373 \times \text{valor RASSF1} + 0,595593$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos tres genes, BASP1, SPINT2 y RASSF1, en veintiún pacientes con cáncer hepático en fases precoces bien diferenciado (tablas 8 a 10).
- 30
- 35 Tal como se muestra en las figuras 2 a 4, dicha capacidad de detectar el cáncer hepático excede la de AFP o PIVKAll (por ejemplo, HCC (n = 115) vs. Portador VHC (n = 57); AFP (valor de corte 200); sensibilidad 30 %, especificidad 100 %, tasa de reconocimiento 53%; PIVKAll (valor de corte 40%); sensibilidad 60 %, especificidad 85 %, tasa de reconocimiento 68%), marcadores tumorales convencionales determinados simultáneamente. Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención es útil para la detección del cáncer hepático, especialmente el cáncer hepático en fases precoces.
- 40
- 45 Además, se combinaron la AFP y PIVKAll determinadas simultáneamente, con los siete genes anteriores dando lugar a nueve factores, y se evaluó el rendimiento diagnóstico de dichos nueve factores examinando la capacidad para detectar el cáncer hepático de combinaciones de dos o tres de dichos nueve factores. Como resultado, fue posible detectar el cáncer hepático con una sensibilidad del 75 %, una especificidad del 82 % y una tasa de reconocimiento del 78 % utilizando la fórmula:  $- 0,000478 \times \text{valor BASP1} - 0,000011 \times \text{valor AFP} + 0,001089$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos dos factores, gen BASP1 y AFP. También fue posible detectar el cáncer hepático con una sensibilidad del 79 %, una especificidad del 82 % y una tasa de reconocimiento del 80 % utilizando la fórmula:  $- 0,000476 \times \text{valor BASP1} - 0,000017 \times \text{valor SPINT2} - 0,000010 \times \text{valor AFP} + 0,001789$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando, el gen BASP1, el gen SPINT2 y AFP.
- 50
- 55 Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 60%, una especificidad del 82 % y una tasa de reconocimiento del 74 % utilizando la fórmula:  $- 0,002106 \times \text{valor BASP1} - 0,005210 \times \text{valor SPINT2} + 0,000069 \times \text{valor PIVKAll} + 0,001390$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos tres genes, BASP1, SPINT2 y PIVKAll, en veinticinco casos de pacientes con cáncer hepático en fases precoces cuya clasificación en estadios es estadio I con un tumor del tumor inferior a 3 cm. Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 67%, una especificidad del 88 % y una tasa de reconocimiento del 81% utilizando la fórmula:  $- 0,002538 \times \text{valor APC} - 0,003626 \times \text{valor SPINT2} - 0,013544 \times \text{valor AFP} + 0,852581$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos 3 marcadores, gen APC, gen SPINT2 y AFP, en

veintiún pacientes con cáncer hepático en fases precoces bien diferenciado (tablas 8 a 10). Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado en genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención, y la combinación de la determinación de dichos valores con los marcadores convencionales AFP o PIVKAll puede incrementar adicionalmente la capacidad de detectar el cáncer hepático, especialmente en el cáncer hepático en fases precoces.

Además, se combinó la cantidad de ADN en suero determinada simultáneamente con la AFP, la PIVKAll y los siete genes anteriores, dando lugar a diez factores, se evaluó el rendimiento diagnóstico de dicha combinación de factores examinando la capacidad para detectar el cáncer hepático de combinaciones de tres de dichos diez factores. Como resultado, fue posible detectar el cáncer hepático con una sensibilidad del 87 %, una especificidad del 80 % y una tasa de reconocimiento del 85 % utilizando la fórmula:  $- 0,000219 \times \text{valor BASP1} - 0,000016 \times \text{valor SPINT2} - 0,015627 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 0,618672$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando el gen BASP1, el gen SPINT2 y la cantidad de ADN en suero, con la fórmula:  $- 0,000220 \times \text{valor BASP1} - 0,000564 \times \text{valor SRD5A2} - 0,015633 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 0,613763$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando, el gen BASP1, el gen SRD5A2 y la cantidad de ADN en suero, y con la fórmula:  $- 0,000224 \times \text{valor BASP1} - 0,000010 \times \text{valor AFP} - 0,015610 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 0,617716$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático), combinando el gen BASP1, la AFP y la cantidad de ADN en suero.

Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 84 %, una especificidad del 88 % y una tasa de reconocimiento del 86 % utilizando la fórmula:  $- 0,021150 \times \text{valor SRD5A2} - 0,007102 \times \text{valor SPINT2} - 0,052594 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 2,091284$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando estos tres marcadores, gen SRD5A2, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero, en veinticinco casos de pacientes con cáncer hepático en fases precoces cuya clasificación en estadios es estadio I con un tumor del tumor inferior a 3 cm. Fue posible detectar el cáncer hepático en fases precoces con una sensibilidad del 86 %, una especificidad del 90 % y una tasa de reconocimiento del 89 % utilizando la fórmula:  $- 0,001553 \times \text{valor SRD5A2} - 0,002923 \times \text{valor SPINT2} - 0,029064 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 1,305493$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático), la fórmula:  $- 0,003378 \times \text{valor SPINT2} - 0,009112 \times \text{valor AFP} - 0,027178 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 1,393957$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) y la fórmula:  $- 0,002833 \times \text{valor SPINT2} + 0,000061 \times \text{valor PIVKAll} - 0,029513 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 1,384308$  (si el valor calculado es  $< 0$ , indica cáncer hepático) combinando los tres marcadores, gen SRD5A2, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero, los tres marcadores gen SPINT2, AFP y cantidad de ADN en suero y los tres marcadores gen SPINT2, PIVKAll y cantidad de ADN en suero en veintiún pacientes con cáncer hepático en fases precoces bien diferenciado (tablas 8 a 10).

Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado en genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención, y la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero, de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero y los valores de AFP o la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero y PIVKAll puede incrementar adicionalmente la capacidad de detectar el cáncer hepático, especialmente en el cáncer hepático en fases precoces.

**Tabla 8: Capacidad de detectar el cáncer hepático combinando los genes metilados específicos del cáncer hepático, con marcadores tumorales utilizados convencionalmente y con la cantidad de ADN en el suero**

HCC119 casos				
7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 7 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
CFTR BASP1 SPINT2	70	80	74	- 0,958600 x BASP1 - 0,284300 x SPINT2 + 0,007800 x CFTR + 0,318000 Si $< 0$ , indica HCC
2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 9 marcadores)				

(continúa)

Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
AFP BASP1 SPINT2	79	82	80	- 0,000476 x BASP1 - 0,000017 x SPINT2 - 0,000010 x AFP + 0,001789 Si <0, indica HCC
AFP BASP1	75	82	78	- 0,000478 x BASP1 - 0,000011 x AFP + 0,001089 Si <0, indica HCC
Cantidad de ADN + 2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 10 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
ADN BASP1 SPINT2	87	80	85	-0,000291 x BASP1 - 0,000016 x SPINT2 - 0,015627 x ADN + 0,618672 Si <0, indica HCC
ADN BASP1 SRD5A2	87	80	85	- 0,000220 x BASP1 - 0,000564 x SRD5A2 - 0,015633 x ADN + 0,613763 Si <0, indica HCC
ADN AFP BASP1	81	80	85	-0,000224 x BASP1 - 0,000010 x AFP - 0,015610 x ADN + 0,617716 Si <0, indica HCC

5 **Tabla 9:** Capacidad de detectar el cáncer hepático combinando los genes metilados específicos del cáncer hepático, con marcadores tumorales utilizados convencionalmente y con la cantidad de ADN en el suero

HCC precoz (clasificación TNM estadio I y tamaño tumoral inferior a 3 cm) 25 casos				
7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 7 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
CCND2 BASP1 SPINT2	70	80	74	- 0,003091 x BASP1 - 0,006448 x SP1NTT2 - 0,000655 x CCND2 + 0,350734 Si <0, indica HCC
2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 9 marcadores)				

(continúa)

Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
PIVKA BASP1 SPINT2	60	82	74	+ 0,000069 x PIVKA - 0,002106 x BASP1 - 0,005210 x SPINT2 + 0,001390 Si <0, indica HCC
Cantidad de ADN + 2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 10 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
ADN SRD5A2 SPINT2	87	80	85	- 0,052594 x ADN + 0,021150 x SRD5A2 - 0,007102 x SPINT2 + 2,09128 Si <0, indica HCC

**Tabla 10:** Capacidad de detectar el cáncer hepático combinando los genes metilados específicos del cáncer hepático, con marcadores tumorales utilizados convencionalmente y con la cantidad de ADN en el suero

5

HCC precoz (bien diferenciado) 21 casos				
7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 7 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
RASSFI BASP1 SPINT2	67	80	77	- 0,009564 x BASP1 - 0,004042 x SPINT2 - 0,001313 x RASSFI + 0,595593 Si <0, indica HCC
2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 9 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
AFP APC SPINT2	67	88	81	- 0,013644 x AFP - 0,002538 x APC - 0,003626 x SPINT2 + 0,852581 Si <0, indica HCC
Cantidad de ADN + 2 marcadores convencionales + 7 marcadores ADN metilados (selección a partir de los 10 marcadores)				
Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
ADN SRD5A2 SPINT2	86	90	89	- 0,029064 x ADN - 0,001553 x SRD5A2 - 0,002923 x SPINT2 + 1,305493 Si <0, indica HCC

(continúa)

Combinación de factores	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Tasa de reconocimiento (%)	Clasificador
ADN AFP SPINT2	86	90	89	- 0,009112 x AFP - 0,027118 x ADN - 0,003378 x SPINT2 + 1,393957 Si <0, indica HCC
ADN PIVKA SPINT2	86	90	89	+0,000061 x PIVK4 - 0,029513 x ADN - 0,002833 x SPINT2 + 1,3243087 Si <0, indica HCC

**Ejemplo 4: Cuantificación del ADN metilado mediante secuenciación directa cuantitativa**

5 En los siete genes metilados específicos del cáncer hepático anteriores, los genes *BASP1*, *SRD5A2*, *SPINT2*, *APC*, *CCND2*, *CFTR* y *RASSF1*, se realizó un análisis de la metilación mediante secuenciación directa cuantitativa de las regiones que incluyen islas CpG en un par de ADNs de tejido tumoral y no tumoral extraídos de hígados de veinte casos de pacientes con cáncer hepático.

10 En concreto, se trató con BIS 1 µg de ADN genómico extraído de los tejidos y se amplificaron las regiones que incluyen islas CpG de los siete genes anteriores con los cebadores descritos en la tabla 11 utilizando como molde dicho ADN tratado con BIS. La solución de la reacción de PCR estaba compuesta por 26,7 ng de ADN tratado con BIS, dos unidades de ADN polimerasa termoestable (TOYOBO CO., LTD) tratada previamente con un volumen igual del anticuerpo TaqStart™ (Clontech Laboratories, Inc.) durante 5 minutos a temperatura ambiente, Tirs-HCl (pH 8,8) 67 mM, sulfato amónico 16,6 mM, Tween 20 0,01 %, dNTPs 200 µM, 1 µM de cada cebador, y cloruro magnésico 1,5 o 3 mM en un volumen final de 100 µl.

20 La amplificación del ADN se realizó utilizando el sistema GeneAmp PCR system 9600 (Applied Biosystems) como instrumento de amplificación de la PCR mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 5 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 25 segundos, hibridación a 70 °C durante 45 segundos, extensión a 72 °C durante 45 segundos, y seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 25 segundos, hibridación a 65 °C durante 50 segundos, extensión a 72 °C durante 45 segundos. Los productos de la PCR se concentraron y sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Se cortaron del gel las bandas diana de los productos amplificados y se aislaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH). A continuación, se examinó el estado de metilación de las regiones con CpGs mediante secuenciación directa cuantitativa utilizando el pirosecuenciador PSQ96MA y los reactivos Pyro gold Reagents (Biotage AG) utilizando como molde dichos productos aislados.

30 **Tabla 11: Composición de la reacción de PCR para amplificar regiones que incluyen islas CpG de genes metilados específicos del cáncer hepático**

Gen	Grupo de cebadores	Concentración de cloruro magnésico (mM)
BASP1	8	1,5
SPINT2	9	1,5
APC	10	1,5
CCND2	11	1,5
CFTR	12	1,5
RASSF1	13	1,5
SRD5A2	14	3

35 Los resultados del análisis mediante secuenciación directa cuantitativa se muestran en las tablas 12 a 14. La cantidad de metilación se muestra añadiendo "\*\*\*\* (3 asteriscos)", "\*\*\* (2 asteriscos)", "\*\* (1 asterisco)", y ningún asterisco en los casos más del 75 %, inferior al 75 % y superior al 50 %, inferior al 50 % y superior al 25 %, e inferior al 25 %, respectivamente. Tal como se muestra en las tablas 12 a 14, fue posible distinguir claramente entre los tejidos tumorales y los no tumorales de pacientes con cáncer hepático y los tejidos de portadores de VHC (pacientes

de alto riesgo de cáncer hepático) mediante la realización del análisis de la metilación cuantitativa de regiones que incluyen islas CpG de los siete genes metilados específicos del cáncer hepático anteriores.

5 Es decir, se demostró que el análisis de la metilación de las regiones que incluyen islas CpG en dichos siete genes metilados específicos del cáncer hepático en los ADNs tisulares mediante dicha secuenciación directa es útil para la identificación y discriminación del cáncer hepático.

10 Además, comparando la cantidad de ADN metilado del gen CFTR mostrado en las tablas 12 a 14 entre el HCC bien diferenciado y el HCC mal diferenciado, la diferenciación entre estadios (malignidad) se correlaciona positivamente con la cantidad de ADN metilado ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, se sugiere que el análisis de la metilación cuantitativa sería utilizable como indicador de malignidad del cáncer hepático.

Tabla 12: Resultados del análisis de la metilación mediante secuenciación directa cuantitativa

ID	Tipo de Diferenciación	Infección VHC/VHB	Tamaño del tumor (cm)	Estadio de clasificación TNM	Cantidad de ADN metilado (%)							
					BASP1	SPINT2	APC	CCND2	CFTR	RASSF1	SRD5A2	
1	Bien	VHC	2,4	II	27,6 *	37,2 *	51,1 **	43,8 *	20,3	41,7 *	23,6	
2	Bien	VHC	3,5	III	34,7 *	40,4 *	63,3 **	57,1 **	36,6 *	44,5 *	24,8	
3	Bien	VHC	3,4	II	31,1 *	31,7 *	53,8 **	48,8 *	42,8 *	48,2 *	27,2 *	
4	Moderado	-	16	IV	42,5 *	48,0 *	36,1 *	46,9 *	62,1 **	60,9 **	48,3 *	
5	Moderado	VHC	3	II	36,4 *	9,7	62,1 **	40,3 *	30,9 *	49,1 *	20,1	
6	Moderado	-	2,5	II	34,8 *	16,3	42,1 *	35,4 *	36,6 *	29,8 *	21,4	
7	Moderado	VHC	4,2	II	31,4 *	28,2 *	50,0 **	40,5 *	24,8	39,6 *	35,8 *	
8	Bien	VHC	1,8	I	33,7 *	22,1	61,7 **	49,9	44,9 *	55,0 **	49,5 *	
9	Moderado	VHC/VHB	3,4	*N	42,4 *	39,9 *	68,1 **	67,8 **	29,3 *	64,7 **	48,1 *	
10	Bien	VHC	1,4	I	34,6 *	20,6	14,3	41,3 *	31,3 *	55,9 **	20,6	
11	Bien	VHC	3,7	II	25,7 *	9,0	32,7 *	18,3	22,7	21,4	32,9 *	
12	Bien	VHC	5,4	III	55,6 **	56,0 **	69,4 **	41,5 *	68,8 **	60,3 **	28,7 *	
13	Moderado	VHC	1,2	I	30,3 *	39,4 *	51,4 **	50,6 **	33,4 *	46,9 *	23,7	
14	Moderado	VHC	8,1	II	26,7 *	48,7 *	60,9 **	45,1 *	60,2 **	59,3 **	32,8 *	
15	Moderado	-	3,5	III	18,5	16,5	21,1	30,3 *	16,8	28,8 *	28,8 *	
16	Bien	VHC/VHB	2,4	II	21,1	24,4	33,2 *	39,3 *	32,1 *	37,2 *	36,4 *	
17	Bien	VHB	2,3	III	22,4	23,8	31,6 *	31,4 *	26,8 *	53,7 **	27,4 *	
18	Moderado	VHC	4,5	III	34,3 *	48,7 *	72,2 ***	78,5 ***	45,4 *	66,6 **	19,4	
19	Bien	VHC	3,8	III	41,3 *	44,0 *	57,6 **	60,8 **	43,9 *	54,7 **	47,3 *	
20	Mal	VHC	1,2	III	34,3 *	42,2 *	53,8 **	46,3 *	56,2 **	54,9 **	47,6 *	

Tabla 13: Resultados del análisis de la metilación mediante secuenciación directa cuantitativa

ID	Tipo de Diferenciación	Infección VHC/VHB	Tamaño del tumor (cm)	Estadio de clasificación TNM	Cantidad de ADN metilado (%)						
					BASP1	SPINT2	APC	CCND2	CFTR	RASSF1	SRD5A2
1	Bien	VHC	2,4	II	23,2	8,0	24,3	32,0 *	18,0	19,5	20,8
2	Bien	VHC	3,5	m	28,1 *	7,5	16,1	17,9	20,1	19,3	18,9
3	Bien	VHC	3,4	II	25,6 *	6,3	17,3	30,5 *	22,7	12,5	18,0
4	Moderado	-	16	IV	29,2 *	12,6	31,1 *	25,7 *	17,9	39,7 *	22,2
5	Moderado	VHC	3	II	20,4	6,9	18,6	22,3	15,1	28,2 *	17,4
6	Moderado	-	2,5	II	29,5 *	6,7	15,4	22,1	9,2	23,8	15,9
7	Moderado	VHC	4,2	II	20,8	9,2	17,7	25,7 *	14,1	18,8	23,0
8	Bien	VHC	1,8	I	23,7	9,1	16,6	21,1	16,2	27,8 *	19,2
9	Moderado	VHC/VHB	3,4	IV	24,7	11,2	21,3	36,7 *	23,0	22,9	26,5 *
10	Bien	VHC	1,4	I	29,2 *	10,6	23,8	19,8	14,9	33,3 *	21,9
11	Bien	VHC	3,7	II	27,6 *	6,9	13,3	24,8	17,8	18,5	21,1
12	Bien	VHC	5,4	III	19,6	10,0	14,6	19,0	21,4	19,9	21,8
13	Moderado	VHC	1,2	I	21,0	9,4	18,6	24,8	21,3	19,9	17,5
14	Moderado	VHC	8,1	II	20,8	10,8	19,8	14,9	18,7	40,6 *	23,2
15	Moderado	-	3,5	III	22,8	11,1	15,2	28,5 *	14,4	37,1 *	21,2
16	Bien	VHC/VHB	2,4	II	25,5 *	11,8	14,8	26,1 *	22,9	21,6	27,5 *
17	Bien	VHB	2,3	III	17,8	10,7	18,8	20,7	17,5	19,9	24,8
18	Moderado	VHC	4,5	m	19,7	5,8	13,1	31,9 *	16,8	17,2	18,6
19	Bien	VHC	3,8	III	21,4 *	11,1	11,9	27,8	20,0	16,0	24,7
20	Mal	VHC	1,2	m	19,0	9,4	14,8	42,7 *	15,0	24,7	25,3

**Tabla 14: Resultados del análisis de la metilación mediante secuenciación directa cuantitativa**

Portador VHC (pacientes de alto riesgo de cáncer hepático)/tejidos hepáticos								
ID	Infección VHC/VHB	Cantidad De ADN metilado (%)						
		BASP1	SPINT2	APC	CCND2	CFTR	RKSSF1	SRD5A2
21	VHC	16,9	9,4	13,0	30,7 *	20,1	23,5	19,2
22	VHC	17,4	9,4	16,4	37,2 *	18,3	28,3 *	23,7

**Ejemplo 5. Cuantificación del ADN metilado mediante PCR-HM (heavy-metil)**

5

De los siete genes metilados específicos del cáncer hepático anteriores, se realizó el análisis de la metilación de la región con islas CpG del gen SPINT2 en ADN genómico de tejido tumoral obtenido de diez casos de pacientes con cáncer hepático y en ADN genómica de tejido no tumoral obtenido de nueve casos de pacientes con cáncer hepático, mediante PCR-HM. En concreto, se realizó tratamiento BIS DE 1 µg de ADN extraído de los tejidos y se prepararon 75 µl de ADN tratado con BIS. A continuación, se realizó la PCR-HM utilizando un grupo de cebadores (identificador de secuencia nº 29 y 30) y dos sondas bloqueantes (identificador de secuencia nº 38 y 39) utilizando como molde 1 µl (13,3 ng) de dicha solución de ADN tratado con BIS.

10

15

Durante dicha PCR-HM, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real utilizando la sonda TaqMan (identificador de secuencia nº 32) específica para el gen SPINT2. La PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit LightCycler® TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación. Se añadió 1 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de la PCR que contenía 0,5 µM del grupo de cebadores, 20 µM de sondas bloqueantes y 0,1 µM de sonda TaqMan en mezcla Master 1X, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 60 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

20

25

La señal fluorescente se detectó tras la reacción de extensión de 58 °C de cada ciclo. La amplificación del gen diana se monitorizó con la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se calculó la concentración de ADN metilado en 75 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, y 40 pg/µl. Tal como se muestra en la tabla 15, fue posible discriminar entre los tejidos tumorales y los no tumorales con una sensibilidad del 80%, una especificidad del 88,9 % utilizando un valor de corte de 100 pg/µL. Por consiguiente, se sugiere que el análisis de la metilación de la región que contiene islas CpG del gen metilado específico del cáncer hepático SPINT2, en ADN de tejido hepático mediante PCR-HM es útil para detectar y distinguir el cáncer hepático.

30

**Tabla 15: Resultados del análisis de la metilación mediante PCR-HM**

35

ID	Cp	Conc (pg/µL)	Met (%)
HCC 1	31,91	5,98E+02	60,6
HCC 5	32,55	3,95E+02	40,1
HCC 6	33,51	2,13E+02	21,6
HCC 7	32,09	5,34E+02	54,2
HCC 11	33,35	2,36E+02	23,9
HCC 12			
HCC 27	34,15	1,41 E+02	14,3
HCC 43	34,55	1,09E+02	11,1
HCC 64			
HCC 119	34,27	1,30E+02	13,2
no-HCC	1 39,54	4,32E+00	0,4

(continúa)

no-HCC 5			
no-HCC 6			
no-HCC 7	33,19	2,61E+02	26,5
no-HCC 12			
no-HCC 27			
no-HCC 43			
no-HCC 64			
no-HCC 119			
std 5ng	31,14	9,86E+02	1000
std 1ng	33,57	2,05E+02	200
std 200pg	37,18	1,98E+01	40
CP: Punto de corte Met: Tasa de metilación			

**Ejemplo 6. Detección del riesgo de cáncer hepático mediante la determinación de los genes metilados específicos del cáncer hepático**

5 Se extrajo el ADN total de 1 ml de suero extraído de treinta y un casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes con un seguimiento de más de dos años tras la extracción del suero y la resección curativa del cáncer hepático) utilizando el kit DNA Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µl de solución de ADN. Se trató dicha solución con BIS utilizando un reactivo de preparación propia preparando 50 µl de solución de ADN tratado con BIS.

10 A continuación, se realizó la PCR específica de metilación (MSP) de cada uno de los siete genes metilados específicos del cáncer hepático (genes *BASP1*, *SPINT2*, *APC*, *CCND2*, *CFTR*, *RASSF1* y *SRD5A2*) con 5 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En dichas MSP, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real añadiendo concomitantemente las sondas TaqMan específicas para cada gen. Por otro lado, según el método descrito en la literatura patente 1, se determinó concomitantemente la cantidad de ADN total por 1 ml de suero con 1 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En concreto, la cuantificación del ADN metilado se realizó siguiendo el procedimiento siguiente:

20 Genes *BASP1* y *SPINT2*

25 Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler• TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler• II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR que contenía el grupo de cebadores y la sonda TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 63 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

30 Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl. Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas

35 Gen *SRD5A2*

40 Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler• TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler• II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS tras mezclar el grupo de cebadores, la sonda

TaqMan, acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones y cantidades mostradas en la tabla 5, en una mezcla de reacción de PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 66 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 66 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 40, 10 y 4 pg/µl. Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

En los treinta y un casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes en seguimiento durante más de dos años después de la extracción de la muestra y la resección curativa del cáncer hepático), se implementó la evaluación clínica de la detección del riesgo de cáncer hepático utilizando el algoritmo de reducción de datos establecido durante la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático con un número grande de casos (ejemplo 3). En concreto, tras la transformación logarítmica de la cantidad de ADN metilado de cada gen y de la cantidad de ADN en suero determinada simultáneamente seguida del cálculo del valor de puntuación mediante dicho algoritmo de reducción de datos, se analizó la diferencia de dichos valores de puntuación entre ocho casos que desarrollaron un nuevo cáncer hepático (HCC “*de novo*”) en los dos primeros años después de la intervención quirúrgica (población con hepatocarcinogénesis multicéntrica) y veintitrés casos que no desarrollaron metástasis en ningún órgano en los dos primeros años (población libre de recurrencia) mediante la prueba-t de las medias.

Como resultado, se ha demostrado que la población con hepatocarcinogénesis multicéntrica posee valores de puntuación significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) que la población libre de recurrencia utilizando la fórmula:  $- 0,042965 \times \text{valor BASP1} - 0,187008 \times \text{valor SPINT2} - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen BASP1, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero (tabla 16). Igualmente, se ha demostrado que la población con hepatocarcinogénesis multicéntrica posee valores de puntuación significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ) que la población libre de recurrencia utilizando la fórmula:  $- 0,112025 \times \text{valor SRD5A2} - 0,199992 \times \text{valor SPINT2} - 2,696542 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,867470$  combinando los 3 marcadores gen SRD5A2, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero (tabla 16). No hay diferencias significativas entre el período de seguimiento de ambas poblaciones ( $p = 0,741$ ).

Además, cuando se investigó el riesgo de cáncer hepático de los mismos treinta y un casos de cáncer hepático dividiendo los casos entre aquellos con valores de puntuación de 0 y superior (doce casos) y aquellos con valores de puntuación inferior a 0 (diecinueve casos) según la fórmula:  $< 0,042965 \times \text{valor BASP1} - 0,187008 \times \text{valor SPINT2} - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen BASP1, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero, ninguno de los doce casos con valores de puntuación de 0 o superior desarrolló un nuevo cáncer hepático, mientras que ocho (42,1 %) de los diecinueve casos con valores de puntuación inferiores a 0 desarrollaron un nuevo cáncer hepático ( $p < 0,05$  mediante la prueba exacta de Fisher). Además, se obtuvo el mismo resultado con la fórmula:  $- 0,112025 \times \text{valor SRD5A2} - 0,199992 \times \text{valor SPINT2} - 2,696542 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,867470$  combinando los 3 marcadores gen SRD5A2, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero.

Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención y la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero nos permite detectar el riesgo de desarrollar un nuevo cáncer hepático, un nuevo HCC.

**Tabla 16: Evaluación clínica de la detección del riesgo de cáncer hepático combinando los genes metilados específicos del cáncer hepático y la cantidad de ADN en suero**

Combinación	Hepatocarcinogénesis multicéntrica (HCC "de novo")	N	Media*	Desviación estándar
BASP+SPINT+ADN (transformación logarítmica)	no	23	0,038832	2,0777707
	si	8	-1,635407	1,2643829
* p < 0,05				
Combinación	Hepatocarcinogénesis multicéntrica (HCC "de novo")	N	Media**	Desviación estándar
SRDSA+SPINT+ADN (transformación logarítmica)	no	23	0,138446	1,9552844
	si	8	-1,641973	1,2470458
** p < 0,01				

**Ejemplo 7. Detección del riesgo de recurrencia del cáncer hepático determinando los genes metilados específicos del cáncer hepático**

5

Se extrajo el ADN total de 1 ml de suero extraído de ochenta y un casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes con un seguimiento de más de un año tras la extracción del suero y la resección curativa del cáncer hepático) utilizando el kit DNA Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µl de solución de ADN. Se trató dicha solución con BIS utilizando un reactivo de preparación propia y se preparó una solución de 50 µl de ADN tratado con BIS.

10

A continuación, se realizó la PCR específica de metilación (MSP) de cada uno de los tres genes metilados específicos del cáncer hepático (genes BASP1, SPINT2 y SRD5A2) con 5 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En dichas MSP, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real añadiendo concomitantemente las sondas TaqMan específicas para cada gen. Por otro lado, según el método descrito en la literatura de patente 1, se determinó concomitantemente la cantidad de ADN total por 1 ml de suero con 1 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En concreto, la cuantificación del ADN metilado se realizó siguiendo el procedimiento siguiente.

15

20

Genes BASP1 y SPINT2

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR que contenía el grupo de cebadores y la sonda TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 63 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

25

30

Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

35

Gen SRD5A2

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando un reactivo de preparación propia como reactivo de amplificación y el LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS tras mezclar el grupo de cebadores, la sonda TaqMan, acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones y cantidades mostradas en la tabla 5, en una mezcla de reacción de PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 66 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40 °C durante 30 segundos.

40

45

Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 66 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 40, 10 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

En los ochenta y un casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes en seguimiento durante más de 1 año después de la extracción de la muestra y la resección curativa del cáncer hepático), se implementó la evaluación clínica de la detección del riesgo de cáncer hepático utilizando el algoritmo de reducción de datos establecido durante la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático con un número grande de casos (ejemplo 3). En concreto, tras la transformación logarítmica de la cantidad de ADN metilado de cada gen y de la cantidad de ADN en suero determinada simultáneamente seguida del cálculo del valor de puntuación mediante dicho algoritmo de reducción de datos, se analizó la diferencia de dichos valores de puntuación entre sesenta y ocho casos que no desarrollaron recurrencia en el año siguiente a la intervención quirúrgica del cáncer hepático (población libre de recurrencia de cáncer hepático) y trece casos que desarrollaron recurrencia en el año siguiente a la intervención quirúrgica del cáncer hepático (población con recurrencia precoz del cáncer hepático) mediante la prueba-t de las medias.

Como resultado, se ha demostrado que la población con recurrencia precoz posee unos valores de puntuación significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) que la población libre de recurrencia utilizando la fórmula:  $-0,042965 \times \text{valor BASP1} - 0,187008 \times \text{valor SPINT2} - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen BASP1, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero (tabla 17).

Además, cuando se investigó el riesgo de cáncer hepático de los mismos ochenta y un casos de cáncer hepático dividiendo los casos entre aquellos con valores de puntuación de 0 y superior (diecisiete casos) y aquellos con valores de puntuación inferior a 0 (sesenta y cuatro casos) según la fórmula:  $-0,042965 \times \text{valor BASP1} - 0,187008 \times \text{valor SPINT2} - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen BASP1, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero, ninguno de los diecisiete casos con valores de puntuación de 0 o superior desarrolló un nuevo cáncer hepático, mientras que trece (20,3 %) de los sesenta y cuatro casos con valores de puntuación inferiores a 0 desarrollaron un nuevo cáncer hepático ( $p < 0,06$  mediante la prueba exacta de Fisher). Además, se obtuvo el mismo resultado con la fórmula:  $-0,112025 \times \text{valor SRD5A2} - 0,199992 \times \text{valor SPINT2} - 2,696542 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,867470$  combinando los 3 marcadores gen SRD5A2, gen SPINT2 y cantidad de ADN en suero.

Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención y la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero nos permite detectar el riesgo de recurrencia precoz del cáncer hepático.

**Tabla 17: Evaluación clínica de la detección del riesgo de recurrencia del cáncer hepático combinando los genes metilados específicos del cáncer hepático y la cantidad de ADN en suero**

Combinación	Recurrencia precoz del cáncer hepático	N	Media*	Desviación estándar	Error estándar de la media
BASP+SPINT+ADN (transformación logarítmica)	no	68	-1,622687	2,4166428	0,3003370
	si	13	-3,806198	1,8854819	0,5229403
* $p < 0,005$					

**Ejemplo 8. Monitorización de la tasa de supervivencia en el tiempo del cáncer hepático mediante la determinación de los genes metilados específicos del cáncer hepático**

Se extrajo el ADN total de 1 mL de suero extraído de ochenta y siete casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes con resección curativa del cáncer hepático) utilizando el kit DNA Extractor SP Kit for Serum y Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µl de solución de ADN. Se trató dicha solución con BIS utilizando un reactivo de preparación propia y se preparó una solución de 50 µl de ADN tratado con BIS.

A continuación, se realizó la PCR específica de metilación (MSP) de cada uno de los tres genes metilados específicos del cáncer hepático (genes BASP1, SPINT2 y SRD5A2) con 5 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En dichas MSP, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real añadiendo

concomitantemente las sondas TaqMan específicas para cada gen. Por otro lado, según el método descrito en la literatura de patente 1, se determinó concomitantemente la cantidad de ADN total en 1 ml de suero con 1 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En concreto, la cuantificación del ADN metilado se realizó siguiendo el procedimiento siguiente:

5 Genes *BASP1* y *SPINT2*

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR que contenía el grupo de cebadores y la sonda TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 63°C durante 45 segundos y 72°C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40°C durante 30 segundos.

15 Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72°C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y la evaluación clínica.

25 Gen *SRD5A2*

Se realizó una PCR en tiempo real utilizando un reactivo de preparación propia como reactivo de amplificación y el LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH) para un instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS tras mezclar el grupo de cebadores, la sonda TaqMan, acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones y cantidades mostradas en la tabla 5, en una mezcla de reacción de PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 66°C durante 45 segundos y 72°C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40°C durante 30 segundos.

35 Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 66 °C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 40, 10 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

45 En los ochenta y siete casos anteriores de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC (pacientes con resección curativa del cáncer hepático), la evaluación clínica sobre la monitorización de la tasa de supervivencia en el tiempo se implementó utilizando el algoritmo de reducción de datos establecido durante la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático con un número grande de casos (ejemplo 3). En concreto, tras la transformación logarítmica de la cantidad de ADN metilado de cada gen y de la cantidad de ADN en suero determinada simultáneamente seguida del cálculo del valor de puntuación mediante dicho algoritmo de reducción de datos, se comparó la tasa de supervivencia en el tiempo tras la intervención quirúrgica del cáncer hepático entre los casos con un valor de puntuación de 0 o superior (veintidós casos) y aquellos con un valor de puntuación inferior a 0 (sesenta y cinco casos).

55 Como resultado, tal como se muestra en la figura 5, utilizando la fórmula:  $-0,042965 \times \text{valor } BASP1 - 0,187008 \times \text{valor } SPINT2 - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen *BASP1*, gen *SPINT2* y cantidad de ADN en suero, veintidós casos con valores de puntuación de 0 o superior presentaron una tasa de supervivencia superior a los sesenta y cinco casos con un valor de puntuación inferior a 0 (tasa de supervivencia global:  $p = 0,0289$ ; tasa de supervivencia libre de enfermedad;  $p = 0,0372$ ).

60 La tasa de supervivencia global es un método que expresa la tasa de supervivencia durante el período de seguimiento de los pacientes independientemente de la causa de muerte incluyendo la recurrencia del cáncer hepático (incluyendo pacientes que fallecieron de otras enfermedades, por la edad, rotura de varices esofágicas secundarias a la cirrosis hepática pero sin cáncer hepático, otros cánceres, accidentes de tráfico o suicidio). La tasa de supervivencia libre de enfermedad (tasa de supervivencia libre de recurrencia) es un método que expresa si se han observado o no metástasis o recurrencia del cáncer hepático durante el período de seguimiento de los pacientes supervivientes.

Tasa de supervivencia global: Porcentaje de pacientes supervivientes en un día (momento) determinado tras la intervención quirúrgica.

5 Tasa de supervivencia libre de enfermedad: Porcentaje de pacientes sin metástasis o recurrencia de cáncer hepático en un día (momento) determinado tras la intervención quirúrgica.

10 Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención y la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero es útil para monitorizar la tasa de supervivencia en el tiempo tras la intervención quirúrgica del cáncer hepático.

**Ejemplo 9. Detección de la progresión del cáncer hepático mediante la determinación de los genes metilados específicos del cáncer hepático**

15 Se extrajo el ADN total de 1 mL de suero extraído de ciento cuarenta y nueve casos de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC utilizando el kit DNA Extractor SP Kit for Serum and Plasma (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se prepararon 50 µl de solución de ADN. Se trató dicha solución con BIS utilizando un reactivo de preparación propia y se preparó una solución de 50 µL de ADN tratado con BIS.

20 A continuación, se realizó la PCR específica de metilación (MSP) de cada uno de los 3 genes metilados específicos del cáncer hepático (genes *BASP1*, *SPINT2* y *SRD5A2*) con 5 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En dichas MSP, se realizó la cuantificación del ADN metilado mediante PCR en tiempo real añadiendo concomitantemente las sondas TaqMan específicas para cada gen. Por otro lado, según el método descrito en la literatura patente 1, se determinó concomitantemente la cantidad de ADN total por 1 ml de suero con 1 µl de dicha solución de ADN tratado con BIS. En concreto, la cuantificación del ADN metilado se realizó siguiendo el

25 procedimiento siguiente.

*Genes *BASP1* y *SPINT2**

30 Se realizó una PCR en tiempo real utilizando el kit LightCycler TaqMan Master Kit (Roche Diagnostics GmbH) como reactivo de amplificación y el LightCycler II (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Para cada gen, se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS a una mezcla de reacción de PCR que contenía el grupo de cebadores y la sonda TaqMan a las concentraciones mostradas en la tabla 4 en una mezcla Master 1x, realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos seguida de 50 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 63°C

35 durante 45 segundos y 72°C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40°C durante 30 segundos.

40 Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 72°C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 1.000, 200, 40 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

45 *Gen *SRD5A2**

50 Se realizó una PCR en tiempo real utilizando un reactivo de preparación propia como reactivo de amplificación y el LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH) como instrumento de amplificación de ácidos nucleicos. Se añadieron 5 µl de solución de ADN tratado con BIS tras mezclar el grupo de cebadores, la sonda TaqMan, acetato potásico (pH 7,5) y Aptamer48 a las concentraciones y cantidades mostradas en la tabla 5, en una mezcla de reacción de PCR compuesta por Tricina (pH 8,3) 50 mM, acetato magnésico 3 mM, dNTPs 375 µM, glicerol 2,5% y 0,15 unidades de ZO5 (ADN polimerasa termoestable), realizándose la PCR en un volumen total de 20 µl. La amplificación por PCR se realizó mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos seguida de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 66°C durante 45 segundos y 72°C durante 5 segundos seguidos de un calentamiento a 40°C durante 30

55 segundos.

60 Se detectó la señal fluorescente tras la reacción de extensión a 66°C de cada ciclo. Se monitorizó la amplificación del gen diana mediante la modalidad de análisis F1/F3 del programa LightCycler (Roche Diagnostics GmbH), y se cuantificó el ADN metilado en 50 µl de solución de ADN tratado con BIS utilizando la curva estándar realizada con estándares medidos simultáneamente (dilución seriada de ADN metilado artificialmente a 200, 40, 10 y 4 pg/µl). Además, dicha cantidad de ADN metilado en solución se multiplicó por 50 y se convirtió en cantidad de ADN metilado por 1 ml de suero. Dicha cantidad de ADN metilado en suero se utilizó para el análisis estadístico y las evaluaciones clínicas.

65 En los ciento cuarenta y nueve casos anteriores de pacientes con cáncer hepático positivos para VHC, la evaluación clínica de la progresión del cáncer hepático se implementó utilizando tres genes metilados específicos del cáncer

hepático, la cantidad de ADN en suero y el algoritmo de reducción de datos establecido durante la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático con un número grande de casos (ejemplo 3). En concreto, se evaluó mediante la prueba de correlación de coeficientes de Pearson, la correlación entre el tamaño del tumor y la cantidad de ADN metilado, la cantidad de ADN en suero o los valores de puntuación calculados mediante dicho algoritmo de reducción de datos tras la transformación logarítmica de la cantidad de ADN metilado de cada gen y de la cantidad de ADN en suero.

Como resultado la cantidad de ADN metilado del gen *BASP1* tendía a correlacionarse positivamente con el tamaño del tumor ( $r = 0,216$ ,  $p < 0,01$ ) (tabla 18). Además, los valores de puntuación calculados mediante la fórmula:  $-0,042965 \times \text{valor } \textit{BASP1} - 0,187008 \times \text{valor } \textit{SPINT2} - 2,600843 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,331859$  combinando los 3 marcadores gen *BASP1*, gen *SPINT2* y cantidad de ADN en suero o mediante la fórmula:  $-0,112025 \times \text{valor } \textit{SRD5A2} - 0,199992 \times \text{valor } \textit{SPINT2} - 2,696542 \times \text{cantidad de ADN en suero} + 9,867470$  combinando los 3 marcadores gen *SRD5A2*, gen *SPINT2* y cantidad de ADN en suero tendían a correlacionarse negativamente con el tamaño del tumor ( $r = -0,235$ ,  $p < 0,005$ ,  $r = -0,244$ ,  $p < 0,005$ ) (tabla 18).

Por consiguiente, se sugiere que la determinación de la cantidad de ADN metilado de los genes metilados específicos del cáncer hepático descubiertos en la presente invención o la combinación de la determinación de dichos valores con la cantidad de ADN en suero son útiles para la detección del tamaño tumoral y la progresión del cáncer hepático.

**Tabla 18: Evaluación clínica en la detección de la progresión del cáncer hepático con una cantidad de gen metilado específico de cáncer de hígado con ADN metilado, o en combinación con los genes metilados específicos del cáncer hepático y una cantidad de ADN en suero**

N = 149	Tamaño tumoral	Cantidad de ADN en suero	<i>BASP1</i>	<i>SPINT2</i>	<i>SRD5A2</i>	<i>BASP + SPINT+ ADN</i> (transformación logarítmica)	<i>SRD5A + SPINT+ ADN</i> (transformación logarítmica)
Coefficiente de correlación de Pearson	1,000	0,121	0,216	-0,028	-0,036	-0,235	-0,244
Probabilidad de tamaño tumoral (2 colas)	-	0	0,008	0,136	0,660	0,004	0,003

Aplicabilidad industrial

La presente invención se utiliza para analizar y diagnosticar el cáncer hepático, especialmente para la realización de pruebas de cribado del cáncer hepático, la detección de lesiones precancerosas, la detección del riesgo de recurrencia tras el tratamiento del cáncer hepático, la detección de la malignidad del cáncer hepático y la monitorización de la progresión en el tiempo del cáncer hepático, y puede utilizarse en industrias de diagnóstico clínico, reactivos farmacéuticos e instrumental médico.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figura 1. Resultados de la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático mediante análisis ROC.

Figura 2. Resultados de la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático mediante análisis FLC y ROC: Capacidad de detección del cáncer hepático (*BASP1 + SPINT2 + CFTR*, sensibilidad: 70 %, especificidad: 80 %, tasa de reconocimiento: 74 %).

Figura 3. Resultados de la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático (cáncer hepático en fase precoz: estadio I e inferior a 3 cm) mediante análisis FLC y ROC: Capacidad de detección del cáncer hepático en fase precoz (*BASP1 + SPINT2 + CCND2*, sensibilidad: 52 %, especificidad: 86 %, tasa de reconocimiento: 78 %).

Figura 4. Resultados de la evaluación del rendimiento diagnóstico de los genes metilados específicos del cáncer hepático (cáncer hepático en fase precoz: bien diferenciado) mediante análisis FLC y ROC: Capacidad de detección del cáncer hepático (*BASP1 + SPINT2 + RASSF1*, sensibilidad: 67 %, especificidad: 80 %, tasa de reconocimiento: 77 %) en fase precoz.

Figura 5. Resultados de la evaluación clínica de la asociación entre los valores determinados de los genes metilados específicos del cáncer hepático y la cantidad de ADN en suero y la tasa de supervivencia (tasa de supervivencia global y tasa de supervivencia libre de enfermedad) tras la intervención quirúrgica del cáncer hepático; A: supervivencia global,  $p = 0,0289$  mediante la prueba "log-rank"; B: supervivencia libre de enfermedad,  $p 0,0372$  mediante la prueba "log-rank".

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG ROCHE DIAGNOSTICS GMBH  
 <120> MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER HEPÁTICO, Y KIT y REACTIVO PARA EL MISMO  
 5 <130> 24105 WO  
 <150> JP 2007-53312  
 < 151 > 02.03.2007  
 <150> JP 2008-021438  
 <151> 31.01.2008  
 10 <160> 39  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador BASP1\_MS  
 <400> 1  
 20 tggctggttt tttagggtat tc 22  
 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador BASP1\_MS  
 <400> 2  
 30 aattaaccga aacaaccg 19  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_MS  
 <400> 3  
 40 tcggtattt tcgggagtc 19  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_MS  
 <400> 4  
 50 cgctacgac actcaacga 19  
 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador APC\_MS  
 <400> 5  
 60 agtgcgggtc gggaagc 17  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>  
 <221>

<222>  
 <223> cebador APC\_MSR  
 <400> 6  
 aaccacatat cgatcacgta cg 22  
 5 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <221>  
 <222>  
 <223> cebador CCND2\_MS  
 <400> 7  
 ttgatttaa gtatcggtta gaggtagc 27  
 15 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <221>  
 <222>  
 <223> cebador CCND2\_MS  
 <400> 8  
 actttctccc taaaaccga ctacg 25  
 25 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <221>  
 <222>  
 <223> cebador CFTR\_MS  
 <400> 9  
 aatcgggaaa gggagggtc 19  
 35 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <221>  
 <222>  
 <223> cebador CFTR\_MS  
 <400> 10  
 accgaatact acctaaccg 20  
 45 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <221>  
 <222>  
 <223> cebador RASSF1\_MS  
 <400> 11  
 gcgtgaagt cggggttc 18  
 55 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <221>  
 <222>  
 <223> cebador RASSF1\_MS  
 <400> 12  
 cccgtacttc gctaactta aacg 24  
 65 <210> 13  
 <211> 21

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 5 <222>  
 <223> cebador SRDSA2\_MS  
 <400> 13  
 aatcgcgta gggttggacg c 21  
 <210> 14  
 10 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 15 <222>  
 <223> cebador SRDSA2\_MS  
 <400> 14  
 aacgccaac gccacccg 18  
 <210> 15  
 20 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 25 <222>  
 <223> cebador BASP1\_F  
 <400> 15  
 tttgtaata ggtaagtaaa gtgaa 25  
 <210> 16  
 30 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 35 <222>  
 <223> cebador BASP1\_R  
 <400> 16  
 ttaaataaa cccaactac aaac 24  
 <210> 17  
 40 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 45 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_F  
 <400> 17  
 ggaagggtgg taggtgtta g 21  
 <210> 18  
 50 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 55 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_R  
 <400> 18  
 tacctaatc tactcctcac tc 22  
 <210> 19  
 60 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 65 <222>  
 <223> cebador APC\_F

<400> 19  
 ttgtttgtg gggattggg t 21  
 <210> 20  
 <211> 24  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 10 <223> cebador APC\_R  
 <400> 20  
 tacaaaaaat ccatctcaa tact 24  
 <210> 21  
 <211> 25  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 20 <223> cebador CCND2\_F  
 <400> 21  
 ttttggagt gaaatatatt aaagg 25  
 <210> 22  
 <211> 22  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 30 <223> cebador CCND2\_R  
 <400> 22  
 ccctacatc tactaacaaa cc 22  
 <210> 23  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 40 <223> cebador CFTR\_F  
 <400> 23  
 gaggaggagg aaggtaggt 20  
 <210> 24  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 50 <223> cebador CFTR\_R  
 <400> 24  
 ccacccttc ctttactct t 21  
 <210> 25  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 60 <223> cebador RASSF1\_F  
 <400> 25  
 tagtttgat ttgggggag g 21  
 <210> 26  
 <211> 21  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador RASSF1\_R  
 5 <400> 26  
 ctaccacctta actaccacct c 21  
 <210> 27  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SRD5A2\_F  
 15 <400> 27  
 taagttatgg aaggatagtt taag 24  
 <210> 28  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SRD5A2\_R  
 25 <400> 28  
 aacaactcct acaaaaacca aac 23  
 <210> 29  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_HMF  
 35 <400> 29  
 gttttttggt tgtyggta tt 22  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> cebador SPINT2\_HMR  
 45 <400> 30  
 acctaatct actcctcact 20  
 <210> 31  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> sonda BASP1\_TMP  
 55 <400> 31  
 acgctactac ttacgaacgc tcgaa 25  
 <210> 32  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221>  
 <222>  
 <223> sonda SPINT2\_TMP  
 65 <400> 32  
 ccaacgcgcg aaaatcgcca aaa 23

<210> 33  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <220>  
 5 <221>  
 <222>  
 <223> sonda APC\_TMP  
 <400> 33  
 aaaacgccct aatccgcatc caacg 25  
 10 <210> 34  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <221>  
 <222>  
 <223> sonda CCND2\_TMP  
 <400> 34  
 aatcgccgcc aacacgatcg acccta 26  
 20 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <221>  
 <222>  
 <223> sonda CFTR\_TMP  
 <400> 35  
 tccaccact acgcaccccc g 21  
 30 <210> 36  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <221>  
 <222>  
 <223> sonda RASSF1\_TMP  
 <400> 36  
 acaaacgcga accgaacgaa acca 24  
 40 <210> 37  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <221>  
 <222>  
 <223> sonda SRD5A2\_TMP  
 <400> 37  
 ctcgacctta actcccgcc ct 22  
 50 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <221>  
 <222>  
 <223> sonda SPINT2\_HMBF  
 <400> 38  
 ttggttatt ttgggagttg tt 22  
 60 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 65 <221>  
 <222>

<223> sonda SPINT2\_HMBR  
<400> 39  
tcctcactca cacctcacc a 21

5

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG en el gen *BASP1* y opcionalmente en el gen *SRD5A2* que comprende las siguientes etapas (a) a (d):
- (a) aislar el ADN genómico de una muestra del paciente;
- 10 (b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químico o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas;
- (c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas del gen *BASP1* y opcionalmente del gen *SRD5A2* en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y
- 15 (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y opcionalmente del gen *SRD5A2* en la muestra de dicho paciente,
- de manera que la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático indican que el paciente está afecto de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta una
- 20 cáncer hepático que está progresando en el tiempo.
2. Método para indicar que un paciente está afecto de de un cáncer hepático, presenta un riesgo aumentado de cáncer hepático, presenta un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, presenta un cáncer hepático maligno o presenta una cáncer hepático que está progresando en el tiempo mediante la detección de la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en regiones que contienen secuencias CpG en al menos el gen *BASP1* y el gen *SPINT2*, opcionalmente en un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra de un paciente, comprendiendo dicho método las siguientes etapas (a) a (d):
- (a) aislar el ADN genómico de una muestra del paciente;
- (b) poner en contacto un reactivo para el tratamiento químico o enzimático con el ADN genómico para discriminar entre citosinas metiladas y no metiladas;
- 35 (c) amplificar una región que contiene citosinas metiladas del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*, opcionalmente de un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en el ADN genómico utilizando un método de PCR; y
- 40 (d) determinar la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG del gen *BASP1* y del gen *SPINT2*, y opcionalmente de un gen adicional entre los genes *SRD5A2*, *CFTR*, *CCND2*, *APC* y *RASSF1* en la muestra del paciente.
- 45 3. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que al menos una secuencia de nucleótidos de un par de cebadores de PCR es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una región que contiene residuos citosina que pueden metilarse del ADN genómico, hibridándose específicamente dicho cebador a dicha secuencia de nucleótidos del ADN genómico cuando dichas citosinas están metiladas.
- 50 4. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que se utilizan simultáneamente al menos un cebador de un par de cebadores de PCR que se hibrida específicamente a una región que no contiene residuos citosina que pueden ser metiladas y oligonucleótidos para bloquear la amplificación por dichos cebadores de PCR, en el que dichos oligonucleótidos se superponen parcialmente a las secuencias de nucleótidos de dichos cebadores de PCR, son complementarios a secuencias de nucleótidos en otras partes del ADN genómico en una región que contiene residuos que pueden metilarse y en el que dichos oligonucleótidos pueden hibridarse específicamente a dichas secuencias de nucleótidos del ADN genómico cuando dichas citosinas no están metiladas.
- 55 5. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que un par de cebadores puede hibridarse específicamente a secuencias de nucleótidos del ADN genómico que no contienen residuos citosina que puedan metilarse en al menos sus extremos 3', y en el que la determinación de la presencia y/o cantidad de citosinas metiladas en los productos según la etapa (d) se realiza mediante análisis de secuenciación o espectrometría de masas.
- 60 6. Método, según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el tratamiento químico según la etapa (b) se realiza proporcionando al ADN genómico un reactivo para la conversión de las citosinas no metiladas a uracilos, de manera que esencialmente todas las citosinas no metiladas de dicho ADN se convierten a uracilos.
- 65

7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se determinan simultáneamente en la muestra las concentraciones de proteínas marcador tumoral convencionales como AFP y/o PIVKA-II y /o la cantidad de ADN libre circulante.
- 5 8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el cáncer hepático es un cáncer hepático en fase precoz.
9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra deriva de suero, plasma, sangre total, tejidos, células sanguíneas, excreciones o secreciones internas/externas humanas.
- 10 10. Par de cebadores o grupo de cebadores que comprende los dos cebadores siguientes:
- 15 1) BASP1\_MSF (Identificador de secuencia nº: 1) and BASP1\_MSR (identificador de secuencia nº: 2), y opcionalmente al menos un par de cebadores seleccionados del siguiente grupo de pares de cebadores:
- 20 2) SPINT2\_MSF (identificador de secuencia nº: 3) and SPINT2\_MSR (identificador de secuencia nº: 4),
- 3) APC\_MSF (identificador de secuencia nº: 5) and APC\_MSR (identificador de secuencia nº: 6),
- 25 4) CCND2\_MSF (identificador de secuencia nº: 7) and CCND2\_MSR (identificador de secuencia nº: 8),
- 5) CFTR\_MSF (identificador de secuencia nº: 9) and CFTR\_MSR (identificador de secuencia nº: 10),
- 6) RASSF1\_MSF (identificador de secuencia nº: 11 and RASSF1\_MSR (identificador de secuencia nº: 12), y
- 30 7) SRDSA2\_MSF (identificador de secuencia nº: 13) and SRD5A2\_MSR (identificador de secuencia nº: 14).
11. Sonda o combinación de sondas formada por:
- 35 1) BASP1\_TMP (identificador de secuencia nº: 31), y opcionalmente al menos una sonda seleccionada del siguiente grupo de sondas:
- 2) SPINT2\_TMP (identificador de secuencia nº: 32),
- 40 3) APC\_TMP (identificador de secuencia nº: 33),
- 4) CCND2\_TMP (identificador de secuencia nº: 34),
- 5) CFTR\_TMP (identificador de secuencia nº: 35),
- 45 6) RASSF1\_TMP (identificador de secuencia nº: 36), y
- 7) SRDSA2\_TMP (identificador de secuencia nº: 37).
12. Kit para el método de detección del cáncer hepático, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, formado por:
- 50 (a) un par de cebadores o una combinación de pares de cebadores formada por al menos el identificador de secuencia nº: 1 y el identificador de secuencia nº: 2 según la reivindicación 10 y/o
- 55 (b) una sonda o combinación de sondas formada al menos por el identificador de secuencia nº: 31 según la reivindicación 11, y
- (c) reactivos para la extracción del ADN.
13. Reactivo para el método de detección del cáncer hepático, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, formado por:
- 60 (a) un par de cebadores o una combinación de pares de cebadores formada por al menos el identificador de secuencia nº: 1 y el identificador de secuencia nº: 2, según la reivindicación 10 y/o
- 65 (b) una sonda o combinación de sondas formada al menos por el identificador de secuencia nº: 31 según la reivindicación 11, y

- 5
14. Utilización de un par de cebadores o un grupo de pares de cebadores formado por el identificador de secuencia nº: 1 y el identificador de secuencia nº: 2 o una sonda o combinación de sondas formada por el identificador de secuencia nº: 31, según las reivindicaciones 10 u 11, para detectar la presencia y/o cantidad de bases citosina metiladas específicas del cáncer hepático en una región que contiene secuencias CpG de un gen relacionado con el HCC en una muestra de un paciente, o para detectar un cáncer hepático, un riesgo aumentado de cáncer hepático, un riesgo de recurrencia tras tratamiento del cáncer hepático, un cáncer hepático maligno o para monitorizar que un paciente está desarrollando un cáncer hepático que está progresando en el tiempo.

Figura 1

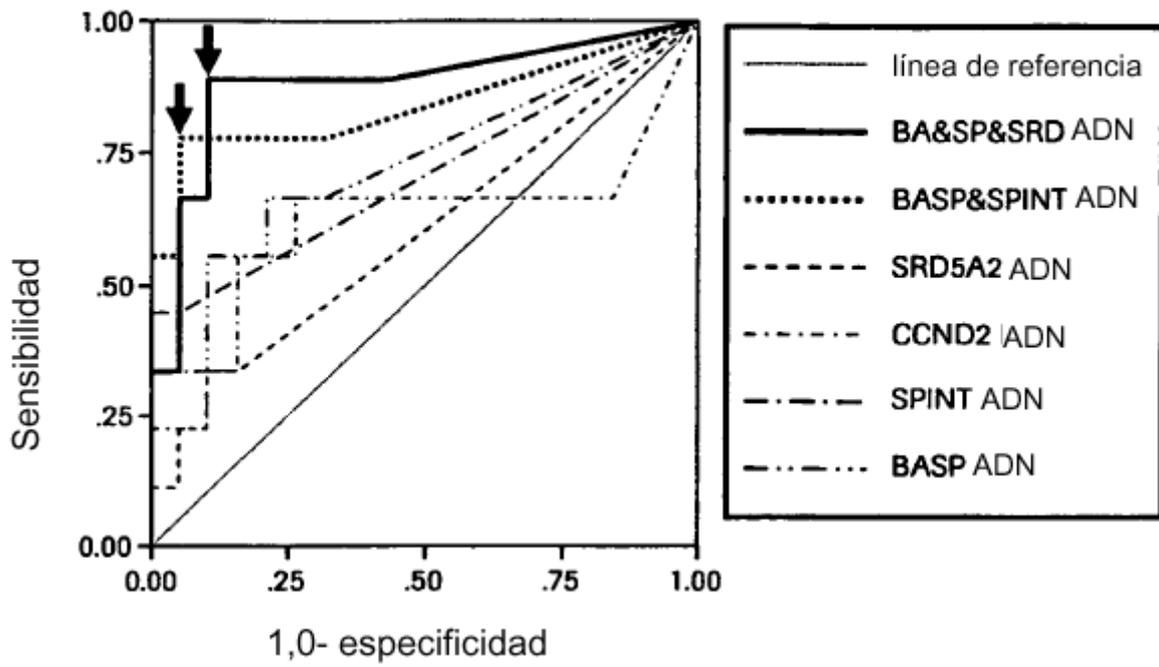


Figura 2

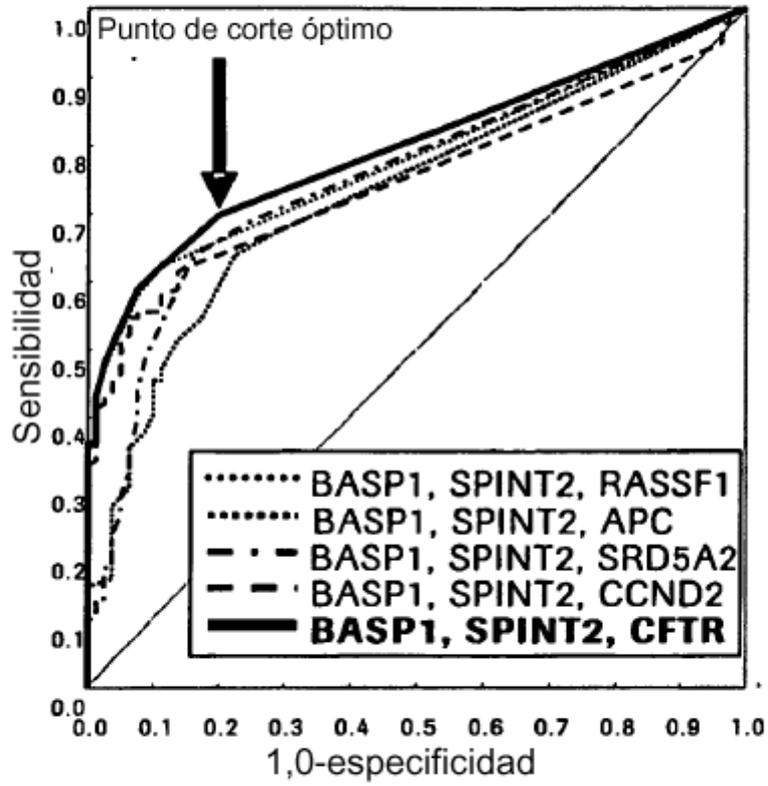


Figura 3

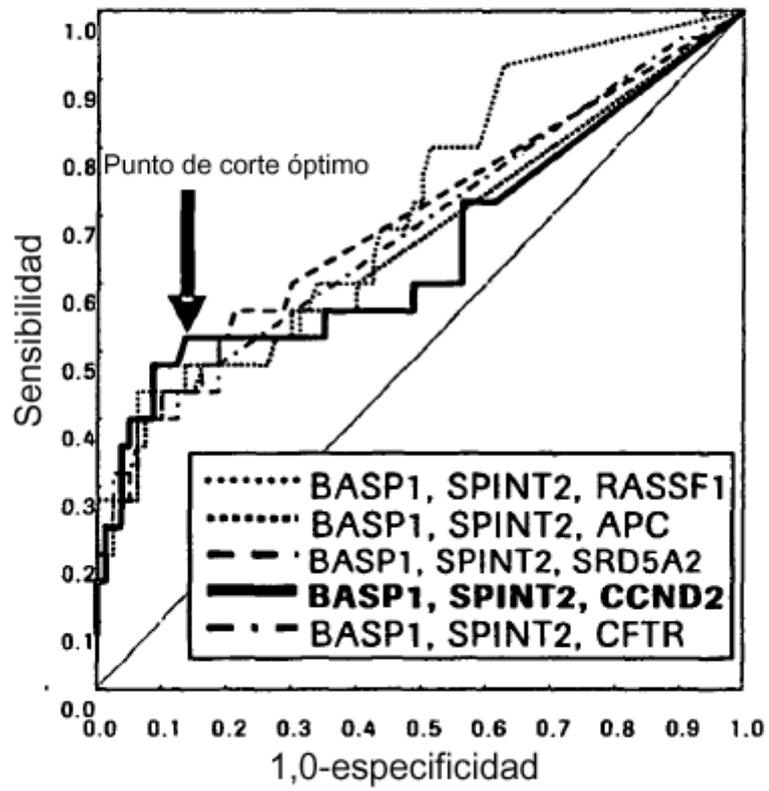


Figura 4

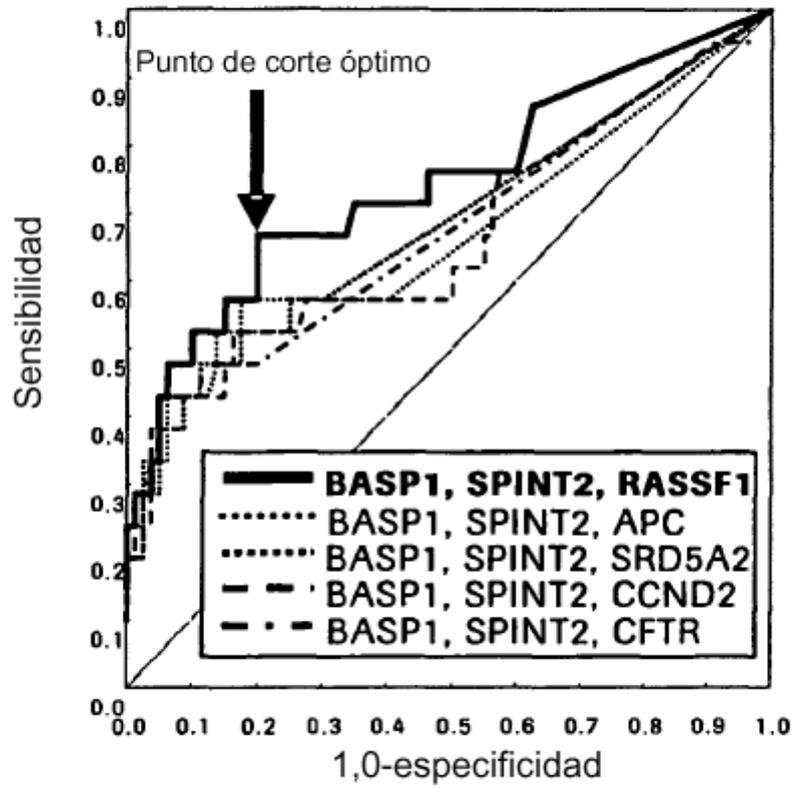


Figura 5

