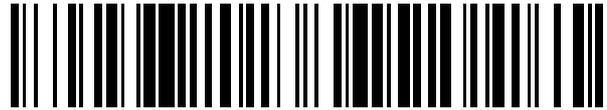


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 660**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10828451 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2497834**

54 Título: **Método de detección de la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer de colon para diagnóstico de cáncer de colon**

30 Prioridad:

05.11.2009 KR 20090106445

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

29.02.2016

73 Titular/es:

**GENOMICTREE, INC. (100.0%)
829 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR**

72 Inventor/es:

**AN, SUNG WHAN;
MOON, YOUNG HO;
OH, TAE JEONG y
CHUNG, HYUN CHEOL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 561 660 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 de detección de la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer de colon para diagnóstico de cáncer de colon

5 Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un método para detectar la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer colorrectal para el diagnóstico de cáncer colorrectal, y más particularmente a un método para detectar genes marcadores específicos de cáncer colorrectal, que se metilan específicamente en células de cáncer colorrectal, para proporcionar información para diagnosticar cáncer colorrectal.

Antecedentes de la técnica

15 Incluso actualmente en que la ciencia médica ha avanzado, la tasa de supervivencia de 5 años de pacientes con cáncer, particularmente pacientes con tumor sólido (diferentes de pacientes con cáncer en la sangre) es de menos del 50 %, y aproximadamente 2/3 de todos los pacientes con cáncer se diagnostican en una fase avanzada y casi todos mueren en 2 años después del diagnóstico de cáncer. Dichos malos resultados en terapia contra el cáncer no son solamente un problema de los métodos terapéuticos, sino que también se deben al hecho de que no es fácil

20 diagnostica el cáncer en una fase prematura y diagnosticar de forma precisa un cáncer avanzado y realizar el seguimiento de los pacientes con cáncer después de la terapia contra el cáncer.

25 En la práctica clínica actual, el diagnóstico del cáncer se confirma realizando biopsia de tejido después de la elaboración del historial, examen físico y evaluación clínica, seguido de ensayo radiográfico y endoscopia si se sospecha cáncer. Sin embargo, el diagnóstico del cáncer mediante las prácticas clínicas existentes es posible solamente cuando la cantidad de células cancerosas es de más de un billón y el diámetro del cáncer es de más de 1 cm. En este caso, las células cancerosas ya tienen capacidad metastásica, y al menos la mitad de las mismas ya han metastatizado. Entretanto, se usan marcadores tumorales para controlar sustancias que se producen directa o indirectamente desde los cánceres en la detección del cáncer, pero causan confusión debido a las limitaciones en la

30 precisión, ya que hasta aproximadamente la mitad de los mismos parecen normales incluso en presencia de cáncer, y a menudo parecen positivos incluso en ausencia de cáncer. Además, los agentes antineoplásicos que se usan principalmente en terapia contra el cáncer tienen el problema de que muestran un efecto solamente cuando el volumen del cáncer es pequeño.

35 La razón por la cual el diagnóstico y tratamiento del cáncer son difíciles es que las células cancerosas son altamente complejas y variables. Las células cancerosas crecen excesivamente y de forma continua, invadiendo el tejido adyacente y metastatizan a órganos distales conduciendo a la muerte. A pesar del ataque de un mecanismo inmunológico o terapia antineoplásica, las células cancerosas sobreviven, se desarrollan continuamente, y grupos de células que son las más adecuadas para la supervivencia se propagan selectivamente. Las células cancerosas son

40 cuerpos vivos con un alto grado de viabilidad, que aparecen por la mutación de una gran cantidad de genes. Para que una célula se convierta en una célula cancerosa y se desarrolle en una masa cancerosa maligna que sea detectable en clínicas, debe suceder la mutación de una gran cantidad de genes. Por tanto, para diagnosticar y tratar el cáncer en la raíz, son necesarios enfoques a un nivel génico.

45 Recientemente, se ha intentado activamente el análisis genético para diagnosticar el cáncer. El método típico más simple es detectar la presencia de genes de fusión ABL: BCR (la característica genética de leucemia) en sangre por PCR. El método tiene una tasa de precisión de más del 95 %, y después del diagnóstico y la terapia de leucemia mielocítica crónica usando este análisis genético simple y fácil, este método se está usando para la evaluación del resultado y el estudio de seguimiento. Sin embargo, este método tiene la deficiencia de que puede aplicarse

50 solamente a algunos cánceres de la sangre.

Además, se ha intentado otro método, en que se detecta la presencia de genes expresados por células cancerosas por RT-PCR y transferencia, diagnosticando de ese modo las células cancerosas presentes en células sanguíneas. Sin embargo, este método tiene limitaciones en que puede aplicarse solamente a algunos cánceres, incluyendo

55 cáncer de próstata y melanoma, y tiene una alta tasa de falsos positivos. Además, es difícil normalizar la detección y lectura en este método, y su utilidad es solamente limitada (Kopreski, M.S. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:1961, 1999; Miyashiro, I. *et al.*, *Clin. Chem.*, 47:505, 2001).

60 Recientemente, se ha intentado activamente el ensayo genético que usa un ADN en suero o plasma sanguíneo. Éste es un método para detectar un cáncer relacionado con cáncer que se aísla de células cancerosas y se libera en la sangre y está presente en forma de un ADN libre en suero. Se observa que la concentración de ADN en suero está aumentada en un factor de 5-10 veces en pacientes propiamente con cáncer en comparación con la de personas normales, y dicho ADN aumentado se libera principalmente de células cancerosas. El análisis de anomalías genéticas específicas de cáncer, tales como la mutación, delección y pérdida funcional de oncogenes y genes supresores tumorales, usando dichos ADN aislados de células cancerosas, permite el diagnóstico del cáncer.

65 En este esfuerzo, ha habido un intento activo por diagnosticar cáncer pulmonar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer

de mama, cáncer colorrectal, y cáncer de hígado examinando la metilación del promotor de oncogenes K-Ras mutados, genes supresores tumorales p53 y genes p16 en suero, y el marcaje e inestabilidad de microsatélites (Chen, X.Q. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2297, 1999; Esteller, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedes, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Sozzi, G. *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5:2689, 1999).

Entretanto, en muestras diferentes a sangre, también puede detectarse el ADN de células cancerosas. Se ha intentado un método en que se detecta la presencia de células cancerosas u oncogenes en esputo o lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer pulmonar mediante un ensayo génico o de anticuerpos (Palmisano, W.A. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:5954, 2000; Sueoka, E. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:1404, 1999). Además, se han intentado otros métodos para detectar la presencia de oncogenes en heces de pacientes con cáncer de colon y rectal (Ahlquist, D.A. *et al.*, *Gastroenterol.*, 119:1219-27, 2000) y detectar anomalías en la metilación de promotores en orina y fluido prostático (Goessl, C. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:5941, 2000). Sin embargo, para diagnosticar de forma precisa cánceres que causan una gran cantidad de anomalías génicas y muestran diversas mutaciones características de cada cáncer, se requiere un método en que se analice simultáneamente una gran cantidad de genes de un modo preciso y automático. Sin embargo, dicho método aún no se ha establecido.

Por consiguiente, recientemente se han propuesto métodos para diagnosticar cáncer midiendo la metilación del ADN. Cuando la isla CpG del promotor de un cierto gen está hipermetilada, se silencia la expresión de dicho gen. Se interpreta que esto es un mecanismo principal por el cual se pierde la función de este gen incluso cuando no existe mutación en la secuencia codificante de proteína del gen en un organismo vivo. Además, esto se analiza como un factor por el cual se pierde la función de varios genes supresores tumorales en cáncer humano. Por tanto, el análisis de la metilación de la isla CpG del promotor de genes supresores tumorales es muy útil en investigación del cáncer. Se ha hecho un intento activo por analizar la metilación de la isla CpG del promotor mediante métodos tales como PCR específica de metilación (a partir de ahora en este documento, mencionada como "MSP") o secuenciación automática de bases y por usar los resultados del análisis para el diagnóstico y detección de cáncer.

Una cantidad significativa de enfermedades están causadas por anomalías genéticas, y la forma más frecuente de anomalía genética es un cambio en la secuencia codificante de un gen. Este cambio genético se menciona como mutación. Cuando cualquier gen tiene una mutación, cambia la estructura y función de una proteína codificada por el cambio, lo que provoca anomalías y deleciones, y esta proteína mutante causa enfermedad. Sin embargo, una anomalía en la expresión de un gen específico puede causar enfermedad incluso en ausencia de una mutación en el gen. Un ejemplo típico de la misma es metilación en que un grupo metilo se une a la región reguladora de la transcripción de un gen, es decir, la base citosina de las islas CpG del promotor, y en este caso, se silencia la expresión del gen. Esto se conoce como cambio epigenético. Éste se transmite a la descendencia y provoca la pérdida de la expresión de la proteína relevante del mismo modo que las mutaciones. Muy típicamente, la expresión de genes supresores tumorales se silencia mediante la metilación de islas CpG del promotor en células cancerosas, provocando carcinogénesis (Robertson, K.D. *et al.*, *Carcinogenesis*, 21:461, 2000).

Para el diagnóstico preciso del cáncer, es importante detectar no solamente un gen mutado sino también un mecanismo por el cual sucede la mutación de este gen. Previamente, se realizaron estudios que se centraban en mutaciones en una secuencia codificante, es decir, micro-cambios, tales como mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, o anomalías cromosómicas macroscópicas. Sin embargo, en los últimos años, se informó de que los cambios epigenéticos son tan importantes como estas mutaciones, y un ejemplo típico de los cambios epigenéticos es la metilación de islas CpG del promotor.

En el ADN genómico de células de mamífero, existe la quinta base además de A, C, G y T, concretamente, 5-metilcitosina, en que un grupo metilo está unido al quinto carbono del anillo de citosina (5-mC). 5-mC está siempre unida solamente a la C de un dinucleótido CG (5'-mCG-3'), que se indica frecuentemente CpG. La C de CpG es metilada principalmente por la unión con un grupo metilo. La metilación de este CpG inhibe la expresión de una secuencia repetitiva en genomas, tales como Alu o transposones. Además, este CpG es un sitio donde aparece muy a menudo un cambio epigenético en células de mamífero. La 5-mC de este CpG se desamina de forma natural en T y, por tanto, el CpG en genomas de mamífero muestra solamente un 1 % de frecuencia, que es muy inferior que una frecuencia normal ($1/4 \times 1/4 = 6,25\%$).

Regiones en que los CpG se integran excepcionalmente se conocen como islas CpG. Las islas CpG se refieren a sitios que son de 0,2-3 kb de longitud, y tienen un contenido de C+G de más del 50 % y una proporción de CpG de más del 3,75 %. Existen aproximadamente 45.000 islas CpG en el genoma humano, y se encuentran principalmente en regiones promotoras que regulan la expresión de genes. Realmente, las islas CpG existen en los promotores de genes constitutivos que representan aproximadamente el 50 % de los genes humanos (Cross, S. *et al.*, *Curr. Opin. Gene Develop.*, 5:309, 1995).

Entretanto, en las células somáticas de personas normales, las islas CpG de dichos sitios promotores de genes constitutivos están sin metilar, pero los genes con impronta y los genes en cromosomas X inactivados se metilan de modo que no se expresen durante el desarrollo.

Durante un proceso causante de cáncer, se encuentra metilación en islas CpG del promotor, y sucede la restricción

en la expresión génica correspondiente. Particularmente, si sucede metilación en las islas CpG del promotor de genes supresores tumorales que regulan en ciclo celular o la apoptosis, restauran el ADN, están implicados en la adhesión de células y la interacción entre células, y/o suprimen la invasión celular y metástasis, dicha metilación bloquea la expresión y función de dichos genes del mismo modo que las mutaciones de una secuencia codificante, promoviendo de ese modo el desarrollo y progresión del cáncer. Además, también sucede metilación parcial en las islas CpG en función del envejecimiento.

Un hecho interesante es que, en el caso de genes cuyas mutaciones se atribuyen al desarrollo de cáncer en cáncer congénito, pero no aparecen en cáncer adquirido, sucede la metilación de islas CpG del promotor en lugar de mutación. Ejemplos típicos incluyen la metilación de promotores de genes, tales como VHL de cáncer renal adquirido (von Hippel Lindau), BRCA1 de cáncer de mama, MLH1 de cáncer colorrectal, y E-CAD de cáncer de estómago. Además, en aproximadamente la mitad de todos los pacientes, sucede la metilación del promotor de p16 o la mutación de Rb, y los cánceres restantes muestran la mutación de p53 o la metilación del promotor de p73, p14 y similares.

Un hecho importante es que un cambio epigenético causado por metilación del promotor causa un cambio genético (es decir, la mutación de una secuencia codificante), y el desarrollo de cáncer avanza mediante la combinación de dichos cambios genéticos y epigenéticos. En un gen MLH1 como ejemplo, existe la circunstancia en que la función de un alelo del gen MLH1 en células de cáncer colorrectal se pierde debido a su mutación o delección, y el alelo restante no funciona debido a metilación del promotor. Además, si la función de MLH1, que es un gen de restauración del ADN, se pierde debido a metilación del promotor, se facilita la aparición de mutaciones en otros genes importantes hacia el desarrollo de cáncer.

La mayoría de los cánceres muestran tres características comunes con respecto a CpG, concretamente, hipermetilación de las islas CpG del promotor de genes supresores tumorales, hipometilación de los sitios restantes de bases CpG, y un aumento en la actividad de la enzima de metilación, concretamente, la citosina metiltransferasa de ADN (DNMT) (Singal, R. y Ginder, G.D., *Blood*, 93:4059, 1999; Robertson, K. *et al.*, *Carcinogenesis*, 21:461, 2000; Malik, K. y Brown, K.W., *Brit. J. Cancer*, 83:1583, 2000).

Cuando se metilan las islas CpG del promotor, la razón por la cual se bloquea la expresión del gen correspondiente no está claramente establecida, pero se supone que es porque una proteína de unión a metil CpG (MECP) o una proteína de dominio de unión a metil CpG (MBD), e histona desacetilasa, se unen a citosina metilada, causando de ese modo un cambio en la estructura de la cromatina de los cromosomas y un cambio en la proteína histona.

No se ha definido si la metilación de islas CpG del promotor causa directamente el desarrollo de cáncer o es un cambio secundario después del desarrollo de cáncer. Sin embargo, está claro que la metilación del promotor de genes relacionados con tumor es un índice importante para el cáncer, y por tanto puede usarse en muchas aplicaciones, incluyendo el diagnóstico y detección prematura de cáncer, la predicción del riesgo de desarrollo de cáncer, el pronóstico de cáncer, examen de seguimiento después de tratamiento, y la predicción de una respuesta a terapia antineoplásica. Recientemente, se ha realizado activamente un intento por examinar la metilación del promotor de genes relacionados con tumor en sangre, esputo, saliva, heces u orina y por usar los resultados examinados para el diagnóstico y tratamiento de diversos cánceres (Esteller, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sanchez-Cespedez, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. *et al.*, *Gastroenterol.*, 119:1219, 2000).

Para maximizar la precisión del diagnóstico de cáncer usando metilación del promotor, analizar el desarrollo del cáncer de acuerdo con cada fase y discriminar un cambio de acuerdo con cáncer y envejecimiento, se requiere un examen que pueda analizar de forma precisa la metilación de todas las bases de citosina de islas CpG del promotor. Actualmente, un método convencional para este examen es un método de secuenciación del genoma con bisulfito, en que un ADN de muestra se trata con bisulfito sódico, y se amplifican por PCR todas las regiones de las islas CpG de un gen diana a examinar, y después, se analiza la secuencia de bases de las regiones amplificadas. Sin embargo, este examen tiene el problema de que existen limitaciones a la cantidad de genes o muestras que pueden examinarse en un tiempo dado. Otros problemas son que la automatización es difícil, y se requieren mucho tiempo y gastos.

En la Johns Hopkins School of Medicine, el MD Anderson Cancer Center, Charité-Universitätsmedizin Berlin, etc., se ha realizado activamente estudios sobre metilación de promotores de genes relacionados con cáncer. Los datos fundamentales así obtenidos se intercambian a través de la DNA Methylation Society (DMS) y se almacenan en MethDB (<http://www.methdb.de>). Entretanto, EpiGenX Pharmaceuticals, Inc. ahora está desarrollando agentes terapéuticos asociados con la metilación de islas CpG, y Epigenomics, Inc. está ahora realizando estudios para aplicar la metilación de promotores al diagnóstico del cáncer mediante el examen de la metilación de promotores usando diversas técnicas, tales como chips de ADN y MALDI-TOF.

G FOLTZ, et al.: "DNA methyltransferase-mediated transcriptional silencing in malignant glioma: a combined whole-genome microarray and promoter array analysis", *ONCOGENE*, vol. 28, n.º 29, 25 de mayo de 2009, páginas 2667-2677 describe un análisis en microserie de genoma completo para identificar genes con expresión alterada después de supresión inducida por iARN de DNMT en una línea celular de glioblastoma multiforme (GBM) y la identificación

de genes tanto con expresión disminuida como con evidencias de hipermetilación de isla CpG del promotor en muestras tisulares de GBM usando un análisis combinado de transcriptoma por microserie de genoma completo junto con un análisis por serie de promotores después de inmunoprecipitación del ADN con anti-5-metilcitidina.

5 Y.-W. CHENG, et al.: "CpG Island Methylator Phenotype Associates with Low-Degree Chromosomal Abnormalities in Colorectal Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 14, n.º 19, 1 de octubre de 2008, páginas 6005-6013 describe una correlación de cánceres de fenotipo metilador de islas CpG positivo con inestabilidad de microsatélites y la mutación BRAF.

10 INNOC HAN, et al.: "New Insights in Syndecan-2 Expression and Tumourigenic Activity en Colon Carcinoma Cells", THE HISTOCHEMICAL JOURNAL, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 35, n.º 3, 1 de marzo de 2004, páginas 319-326 describe que los receptores de adhesión desempeñan tareas cruciales en la transformación neoplásica de células normales a través de la inducción de comportamiento y morfología celulares específicos de cáncer.

15 H. PARK: "Syndecan-2 Mediates Adhesion and Proliferation of Colon Carcinoma Cells", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, n.º 33, 7 de junio de 2002, página 29730-29736 describe el examen de la función de syndecan-2 en líneas celulares de cáncer de colon. Se descubrió que en varias líneas celulares de cáncer de colon syndecan-2 se expresaba altamente en comparación con líneas celulares normales y syndecan-1 y 4 estaban disminuidos.

20 Por consiguiente, los presentes inventores han hecho amplios esfuerzos por desarrollar un marcador eficaz de metilación específico de cáncer colorrectal que haga posible diagnosticar el cáncer y el riesgo de carcinogénesis en una fase prematura y predecir el pronóstico del cáncer. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que genes *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) se metilan específicamente en células de cáncer colorrectal y que el cáncer colorrectal puede diagnosticarse midiendo el grado de metilación usando estos genes como biomarcadores, completando de ese modo la presente invención.

25 Descripción de la invención

30 Un objeto principal de la presente invención es proporcionar un biomarcador de metilación específico de cáncer colorrectal, que se metila específicamente en células de cáncer colorrectal y puede usarse de forma eficaz para el diagnóstico de cáncer colorrectal, así como el uso del mismo para proporcionar información para diagnosticar cáncer colorrectal en una fase prematura.

35 Otro objeto de la presente invención es un método para detectar la metilación de *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2), que es un biomarcador de metilación específico de cáncer colorrectal, y un kit y chip de ácido nucleico para diagnosticar cáncer colorrectal usando el mismo.

40 Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un método para detectar la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer colorrectal para el diagnóstico de cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:

- 45 (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; y
 (b) detectar la metilación de la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) en el ADN de la muestra clínica.

50 La presente invención proporciona un uso in vitro de la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) en el diagnóstico de cáncer colorrectal.

La presente invención también proporciona el uso de un biomarcador para diagnóstico in vitro de cáncer colorrectal o para el diagnóstico in vitro de la fase de su progresión, donde el biomarcador consiste en la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

55 La presente invención también proporciona el uso de un kit para diagnosticar cáncer colorrectal, donde el kit comprende: un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento metilado que comprende la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2), donde el fragmento se metila mediante un tratamiento con bisulfito; un cebador de secuenciación para pirosecuenciar un producto de PCR amplificado por el par de cebadores; y un tampón de PCR.

60 Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones adjuntas.

65 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un proceso para descubrir un biomarcador de metilación a partir

de células de orina de una persona normal y un paciente con cáncer colorrectal por un microensayo de CpG.

La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra un proceso para detectar genes hipermetilados específicos de cáncer colorrectal a partir de los datos de microserie de cáncer colorrectal.

La FIG. 3 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de medir el grado de metilación de 7 genes biomarcadores candidatos en una línea celular de cáncer colorrectal y los tejidos colorrectales de personas normales por pirosecuenciación.

La FIG. 4 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de medir los grados de metilación de tres biomarcadores de metilación en tejido de cáncer colorrectal y tejido normal adyacente por pirosecuenciación.

La FIG. 5 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de medir la sensibilidad y especificidad de tres biomarcadores de metilación para cáncer colorrectal por análisis de curva ROC para evaluar la capacidad de los biomarcadores de diagnosticar cáncer colorrectal.

La FIG. 6 muestra los resultados de verificar la metilación de un gen biomarcador *SDC2* en los tejidos fecales de personas normales y pacientes con cáncer colorrectal por PCR específica de metilación (círculos: productos de PCR específicos de metilación).

Mejor modo para realizar la invención

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura usada en este documento es bien conocida y se emplea habitualmente en la técnica.

La presente invención se caracteriza porque las islas CpG de *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2), que se metilan específicamente en células de cáncer colorrectal, se usan como biomarcadores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición para diagnosticar cáncer colorrectal, que contiene la isla CpG de al menos un gen del siguiente gen o la isla CpG del promotor del gen:

(i) *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

En la presente invención, las islas CpG pueden estar localizadas en la región intrónica de los genes. En este documento, la región intrónica del gen *SDC2* puede estar localizada entre los nucleótidos (nt) +681 y +1800 desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 1.

Además, las islas CpG pueden estar localizadas en la región promotora del gen.

En la presente invención, se detectaron 7 genes biomarcadores candidatos que muestran la mayor diferencia en el grado de metilación entre personas normales y pacientes con cáncer colorrectal, y entre estos genes, se confirmaron los genes *SDC2* (de acuerdo con la invención), *SIM1* y *SORCS3* para diagnóstico de cáncer colorrectal. Un método para detectar genes marcadores de metilación comprende las etapas de: (a) aislar ADN genómicos de células transformadas y células no transformadas; (b) hacer reaccionar los ADN genómicos aislados con una proteína de unión a ADN metilado, aislar de ese modo ADN metilados; y (c) amplificar los ADN metilados, hibridar los ADN amplificados a una microserie de CpG, y después seleccionar genes que muestren la mayor diferencia en el grado de metilación entre las células normales y las células cancerosas, garantizando de ese modo genes marcadores de metilación.

El método anterior para detectar genes biomarcadores puede encontrar genes que se metilan de forma diferencial en cáncer colorrectal así como en diversas fases displásicas del tejido que progresa a cáncer colorrectal. Los genes detectados pueden usarse para la detección de cáncer colorrectal, evaluación de riesgos, pronóstico, identificación de enfermedad, el diagnóstico de fases de la enfermedad, y la selección de dianas terapéuticas.

La identificación de genes que se metilan en cáncer colorrectal y anomalías en diversas fases de cáncer colorrectal hace posible diagnosticar cáncer colorrectal en una fase prematura de un modo preciso y eficaz y permite perfilar la metilación de múltiples genes y la identificación de nuevas dianas para intervención terapéutica. Además, los datos de metilación de acuerdo con la presente invención pueden combinarse con otros métodos de detección de biomarcadores no relacionados con metilación para obtener un sistema más preciso para el diagnóstico de cáncer colorrectal.

De acuerdo con el método de la presente invención, la progresión de cáncer colorrectal en diversas fases o etapas puede diagnosticarse determinando el grado de metilación de uno o más biomarcadores de ácido nucleico obtenidos de una muestra. Comparando el grado de metilación de un ácido nucleico de una muestra en cada fase de cáncer

colorrectal con el grado de metilación de uno o más ácidos nucleicos de una muestra en que no existe trastorno proliferativo de las células de tejido colorrectal, puede detectarse una fase específica de cáncer colorrectal en la muestra. En este documento, el grado de metilación puede ser hipermetilación.

5 En una realización de la presente invención, el ácido nucleico puede metilarse en la región reguladora de un gen. En otra realización, puede diagnosticarse un gen que está implicado en transformación celular en una fase prematura detectando metilación fuera de la región reguladora del gen, porque la metilación avanza hacia el interior desde el exterior del gen.

10 En otra realización más de la presente invención, pueden diagnosticarse células que tienen probabilidad de formar cáncer colorrectal en una fase prematura usando los genes marcadores de metilación. Cuando los genes de metilación confirmada en células cancerosas se metilan en células que parecen normales clínica o morfológicamente, esto indica que las células de apariencia normal progresan a cáncer. Por tanto, puede diagnosticarse cáncer colorrectal en una fase prematura detectando la metilación de genes específicos de cáncer colorrectal en células que parecen normales.

15 El uso del gen marcador de metilación de la presente invención permite la detección de un trastorno proliferativo celular (displasia) de tejido colorrectal en una muestra. El método de detección comprende poner una muestra que comprende al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto en contacto con al menos un agente capaz de determinar el estado de metilación del ácido nucleico. El método comprende detectar la metilación de al menos una región en al menos un ácido nucleico, donde la metilación del ácido nucleico difiere del estado de metilación de la misma región de un ácido nucleico presente en una muestra en que no existe crecimiento anormal (progresión displásica) de células colorrectales.

20 En otra realización más de la presente invención, la probabilidad de progresión de tejido a cáncer colorrectal puede evaluarse examinando la metilación de un gen que se metila específicamente en cáncer colorrectal, y determinando la frecuencia de metilación de tejido que tiene probabilidad de progresar a cáncer colorrectal.

25 Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer colorrectal para el diagnóstico de cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:

- 30 (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; y
 35 (b) detectar la metilación de la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) en el ADN de la muestra clínica.

40 En la presente invención, la etapa (b) puede realizarse detectando la metilación de la isla CpG en la región intrónica del gen. En este documento, la región intrónica del gen *SDC2* puede estar localizada entre los nucleótidos (nt) +681 y +1800 desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 1.

Además, las islas CpG pueden estar localizadas en la región promotora de los genes.

45 En la presente invención, la etapa (b) puede realizarse mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR específica de metilación a tiempo real, ensayo de PCR usando una proteína de unión específica de ADN de metilación, PCR cuantitativa, ensayo basado en chip de ADN, pirosecuenciación, y secuenciación con bisulfato. Además, la muestra clínica puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma sanguíneo, heces, y orina de un paciente sospechoso de tener cáncer o un sujeto a diagnosticar, pero sin limitarse a ello.

50 En una realización de la presente invención, el método para detectar la metilación de un gen puede comprender: (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; (b) aislar ADN de la muestra clínica; (c) amplificar el ADN aislado usando cebadores capaces de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del promotor o intrón de genes *SDC2*; y (d) determinar si el intrón estaba metilado en base a si el ADN se amplificaba en la etapa (c).

55 En otra realización de la presente invención, puede diagnosticarse un trastorno proliferativo celular (displasia) de tejido colorrectal en una muestra detectando el estado de metilación de los siguientes genes usando un kit:

- 60 (i) *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

65 Por tanto, en otro aspecto más, la presente invención se refiere a un kit para diagnosticar cáncer colorrectal, que contiene: un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento metilado que comprende la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2), donde el fragmento se metila mediante un tratamiento con bisulfito; un cebador de secuenciación para pirosecuenciar un producto de PCR amplificado por el par de cebadores; y un tampón de PCR.

En la presente invención, el par de cebadores de PCR puede seleccionarse entre el grupo que consiste en un par de cebadores de las SEC ID N.º 12 y 13.

5 En la presente invención, el cebador de secuenciación puede seleccionarse entre el grupo que consiste en cebadores de la SEC ID N.º 22.

Puede diagnosticarse trastorno proliferativo celular (displasia) de células de tejido colorrectal en una muestra detectando el estado de metilación de los siguientes genes usando un chip de ácido nucleico.

10 Se describe un chip de ácido nucleico para diagnosticar cáncer colorrectal, que tiene inmovilizada en el mismo una sonda que es capaz de hibridar con un fragmento que comprende la isla CpG de al menos un gen de los siguientes genes o la isla CpG del promotor del al menos un gen en condiciones de rigurosidad:

(i) *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

15 En la presente invención, las islas CpG pueden estar localizadas en la región intrónica de los genes. En este documento, la región intrónica del gen *SDC2* puede estar localizada entre los nucleótidos (nt) +681 y +1800 desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 1. Además, las islas CpG pueden estar localizadas en la región promotora de los genes.

20 En la presente invención, la sonda puede seleccionarse entre el grupo que consiste en las secuencias de bases mostradas por las SEC ID N.º 33 to 44, y ejemplos específicos de las mismas son las siguientes.

SDC2

- 25
- 1) 5'-tgggtcgggc cgcgagggga acggc-3' (SEC ID N.º 33)
 - 2) 5'-ggggggagcc tgggtcgggc cgcgagggga acggctccac-3' (SEC ID N.º 34)
 - 3) 5'-tcgccctcgg cgggtcttg cgcgtgtct gggaaggacg gaggggaaag-3' (SEC ID N.º 35)
 - 4) 5'-gggtcccct cctccgcaca ccatcccc cgcgccagct ttctgttg actgcatgca agtctgggg agatgggggc cagatttaag
- 30 agaccgcga-3' (SEC ID N.º 36)

35 El uso del kit de diagnóstico de la presente invención hace posible determinar el crecimiento anormal (progresión displásica) de células de tejido colorrectal en una muestra. El método comprende determinar el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de una muestra, donde el estado de metilación del al menos un ácido nucleico se compara con el grado de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra en que no existe crecimiento anormal (progresión displásica) de células colorrectales.

40 En otra realización de la presente invención, pueden detectarse células transformadas de cáncer colorrectal examinando la metilación del gen marcador usando dicho kit.

En otra realización más de la presente invención, puede diagnosticarse cáncer colorrectal examinando la metilación del gen marcador usando dicho kit.

45 En otra realización más de la presente invención, puede diagnosticarse la probabilidad de progresión a cáncer colorrectal examinando la metilación del gen marcador en una muestra que muestra un fenotipo normal usando dicho kit. La muestra que se usa en la presente invención puede ser tejido sólido o líquido, células, heces, orina, suero, o plasma sanguíneo.

50 Las expresiones principales que se usan en este documento se definen del siguiente modo.

Como se usa en este documento, la expresión "transformación celular" se refiere al cambio en características de una célula de una forma a otra forma tal como de normal a anormal, no tumoral a tumoral, indiferenciada a diferenciada, célula madre a célula no madre. Además, la transformación puede reconocerse por la morfología, fenotipo, características bioquímicas y similares de una célula.

55 Como se usa en este documento, la expresión "detección prematura" de cáncer se refiere a descubrir la probabilidad de cáncer antes de metástasis, y preferiblemente antes de la observación de un cambio morfológico en un tejido o célula. Además, el término "detección prematura" de transformación celular se refiere a la alta probabilidad de una célula de experimentar transformación en sus fases prematuras antes de que la célula se determine morfológicamente como transformada.

60 Como se usa en este documento, el término "hipermetilación" se refiere a la metilación de una isla CpG.

65 Como se usa en este documento, el término "muestra" o "muestra clínica" se refiere a, en su sentido más amplio, e incluye, cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, una línea celular, un cultivo tisular, dependiendo del tipo de ensayo que se tiene que realizar. Los métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos

corporales de mamíferos son bien conocidos en la técnica. Una biopsia de tejido colorrectal es una fuente preferida.

Biomarcador de cáncer colorrectal - uso en células cancerosas para comparación con células normales

5 En la presente invención, células "normales" se refiere a aquellas que no muestran ningún cambio morfológico o citológico anormal. Células "tumorales" son células cancerosas. Células "no tumorales" son aquellas células que son parte del tejido enfermo pero que no se considera que sean la parte tumoral.

10 En un aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento de la relación entre cáncer colorrectal y la hipermetilación de *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

15 En otra realización de la presente invención, puede diagnosticarse un trastorno proliferativo celular de células de tejido colorrectal en una fase prematura determinando el grado de metilación de al menos un ácido nucleico de un sujeto usando el kit de la presente invención. En este documento, el grado de metilación del al menos un ácido nucleico puede compararse con el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto que no tiene un trastorno proliferativo celular de tejido colorrectal. El ácido nucleico es preferiblemente un ácido nucleico que contiene CpG tal como una isla CpG.

20 En otra realización de la presente invención, puede diagnosticarse un trastorno proliferativo celular de tejido colorrectal determinando la metilación de al menos un ácido nucleico de un sujeto usando el kit de la presente invención. En este documento, el ácido nucleico puede ser al menos uno seleccionado del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2). En esta realización, la metilación del al menos un ácido nucleico puede compararse con el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto que no tiene predisposición a un trastorno proliferativo celular de tejido colorrectal.

25 Como se usa en este documento, "predisposición" se refiere a la propiedad de ser susceptible a un trastorno proliferativo celular. Un sujeto que tiene una predisposición a un trastorno proliferativo celular no tiene trastorno proliferativo celular, pero es un sujeto que tiene una probabilidad aumentada de tener un trastorno proliferativo celular.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno proliferativo celular de tejido colorrectal, comprendiendo el método poner una muestra que comprende un ácido nucleico en contacto con un agente capaz de determinar el estado de metilación de la muestra, y determinar la metilación de al menos una región del al menos un ácido nucleico. En este documento, la metilación de la al menos una región en el al menos un ácido nucleico difiere del grado de metilación de la misma región en un ácido nucleico presente en un sujeto en que no existe crecimiento anormal de células.

35 El método de la presente invención comprende una etapa de determinar la metilación de al menos una región de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto.

40 La expresión "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" como se usa en este documento se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, o fragmentos de los mismos, o ADN o ARN monocatenario o bicatenario de origen genómico o sintético, ADN o ARN de hebra con sentido o antisentido de origen genómico o sintético, ácido peptidonucleico (PNA), o cualquier material tipo ADN o tipo ARN de origen natural o sintético. Será evidente para los expertos en la materia que, cuando el ácido nucleico es ARN, los desoxinucleótidos A, G, C, y T están remplazados por los ribonucleótidos A, G, C, y U, respectivamente.

45 Puede usarse cualquier ácido nucleico en la presente invención, dado que puede detectarse en el mismo la presencia de islas CpG metiladas de forma diferente. La isla CpG es una región rica en CpG en una secuencia de ácido nucleico.

Metilación

55 En la presente invención, puede usarse cualquier muestra de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, con la condición de que contenga o sea sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico que contiene un locus diana (por ejemplo, ácido nucleico que contiene CpG). Una región de ácido nucleico capaz de metilarse de forma diferenciada es una isla CpG, una secuencia de ácido nucleico con una densidad aumentada respecto a otras regiones de ácido nucleico del dinucleótido CpG. El doblete CpG existe en ADN de vertebrados solamente en aproximadamente el 20 % de la frecuencia que se esperarían de la proporción de pares de bases G*C. En ciertas regiones, la densidad de dobletes CpG alcanza el valor predicho; está aumentada en diez veces respecto al resto del genoma. Las islas CpG tienen un promedio de contenido G*C de aproximadamente el 60 %, en comparación con el promedio del 40 % en la mayor parte del ADN. Las islas adoptan la forma de tramos de ADN de típicamente aproximadamente una a dos kilobases de longitud. Existen aproximadamente 45.000 islas en el genoma humano.

65 En muchos genes, las islas CpG empiezan justo cadena arriba de un promotor y se extienden cadena abajo en la región transcrita. La metilación de una isla CpG en un promotor habitualmente suprime la expresión del gen. Las

islas también pueden rodear la región 5' de la región codificante del gen así como la región 3' de la región codificante. Por tanto, pueden encontrarse islas CpG en múltiples regiones de una secuencia de ácido nucleico incluyendo cadena arriba de secuencias codificantes en una región reguladora que incluye una región promotora, en las regiones codificantes (por ejemplo, exones), cadena abajo de regiones codificantes en, por ejemplo, regiones potenciadoras, y en intrones.

Típicamente, el ácido nucleico que contiene CpG es ADN. Sin embargo, el método de la invención puede emplear, por ejemplo, muestras que contienen ADN, o ADN y ARN que contiene ARNm, donde el ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario, o puede incluirse un híbrido ADN-ARN en la muestra.

También puede usarse una mezcla de ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico específica a detectar puede ser una fracción de una molécula más grande o puede estar presente inicialmente como una molécula diferente, de modo que la secuencia específica constituya el ácido nucleico completo. No es necesario que la secuencia a estudiar esté presente inicialmente en una forma pura; el ácido nucleico puede ser una fracción minoritaria de una mezcla compleja, tal como contenida en ADN humano completo. Los ácidos nucleicos contenidos en una muestra usada para la detección de islas CpG metiladas pueden extraerse mediante una diversidad de técnicas tales como las descritas por Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Los ácidos nucleicos aislados de un sujeto se obtienen en una muestra biológica del sujeto. Si se desea detectar cáncer colorrectal o fases de progresión de cáncer colorrectal, el ácido nucleico puede aislarse de tejido colorrectal por raspado o biopsia. Dichas muestras pueden obtenerse mediante diversos procedimientos médicos conocidos para los expertos en la materia.

En un aspecto de la invención, el estado de metilación en ácidos nucleicos de la muestra obtenida de un sujeto es hipermetilación en comparación con las mismas regiones del ácido nucleico en un sujeto que no tiene un trastorno proliferativo celular de tejido colorrectal. Hipermetilación, como se usa en este documento, se refiere a la presencia de alelos metilados en uno o más ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de un sujeto que no tiene un trastorno proliferativo celular de tejido no contienen alelos metilados detectables cuando se examinan los mismos ácidos nucleicos.

Genes individuales y panel

Se entiende que la presente invención puede ponerse en práctica usando cada gen por separado como marcador de diagnóstico o pronóstico o unos pocos genes marcadores combinados en un formato de presentación de panel de modo que puedan detectarse varios genes marcadores para un patrón global o lista de genes que se metilan para aumentar la fiabilidad y eficacia. Además, cualquiera de los genes identificados en la presente invención puede usarse individualmente o como un conjunto de genes en cualquier combinación con cualquiera de los otros genes que se mencionan en este documento. Como alternativa, los genes pueden clasificarse de acuerdo con su importancia y ponderarse y, junto con la cantidad de genes que están metilados, puede asignarse un valor de probabilidad de desarrollar cáncer. Dichos algoritmos están dentro del alcance de la presente invención.

Método de detección de metilación

PCR específica de metilación

Cuando se trata ADN genómico con bisulfito, la citosina en la región 5'-CpG-3' permanece intacta, si estaba metilada, pero la citosina cambia a uracilo, si estaba sin metilar. Por consiguiente, en base a la secuencia de bases convertida después del tratamiento con bisulfito, se construyen conjuntos de cebadores de PCR correspondientes a una región que tenga la secuencia de bases 5'-CpG-3'. En este documento, los conjuntos de cebadores construidos son dos tipos de conjuntos de cebadores: un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia metilada de bases, y un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia no metilada de bases. Cuando el ADN genómico se convierte con bisulfito y después se amplifica por PCR usando los dos tipos anteriores de conjuntos de cebadores, se detecta el producto de PCR en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia metilada de bases, si el ADN genómico estaba metilado, pero se detecta el ADN genómico en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia no metilada, si el ADN genómico estaba sin metilar. Esta metilación puede analizarse cuantitativamente por electroforesis en gel de agarosa.

PCR específica de metilación a tiempo real

La PCR específica de metilación a tiempo real es un método de medición a tiempo real modificado a partir del método de PCR específica de metilación y comprende tratar ADN genómico con bisulfito, diseñar cebadores de PCR correspondientes a la secuencia metilada de bases, y realizar PCR a tiempo real usando los cebadores. Los métodos para detectar la metilación del ADN genómico incluyen dos métodos: un método de detección usando una sonda TanMan complementaria a la secuencia amplificada de bases; y un método de detección usando Sybergreen. Por tanto, la PCR específica de metilación a tiempo real permite el análisis cuantitativo selectivo de ADN metilado. En este documento, se traza una curva patrón usando una muestra de ADN metilado in vitro, y también se amplifica

un gen que no contiene secuencia 5'-CpG-3' en la secuencia de bases como grupo de control negativo para la normalización para analizar cuantitativamente el grado de metilación.

Pirosecuenciación

5 El método de pirosecuenciación es un método cuantitativo de secuenciación a tiempo real modificado a partir del método de secuenciación con bisulfito. De forma similar a la secuenciación con bisulfito, el ADN genómico se convierte por tratamiento con bisulfito, y después, se construyen cebadores de PCR correspondientes a una región que no contiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. Específicamente, el ADN genómico se trata con bisulfito, se
10 amplifica usando los cebadores de PCR, y después se somete a análisis de secuencia de bases a tiempo real usando un cebador de secuenciación. El grado de metilación se expresa como un índice de metilación analizando las cantidades de citosina y timina en la región 5'-CpG-3'.

PCR usando proteína de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa, y ensayo en chip de ADN

15 Cuando una proteína que se une específicamente a ADN metilado solamente se mezcla con ADN, la proteína se une específicamente al ADN metilado solamente. Por tanto, o bien PCR usando una proteína de unión específica de metilación o un ensayo en chip de ADN permite aislamiento selectivo de solamente ADN metilado. El ADN genómico se mezcla con una proteína de unión específica de metilación, y después se aísla selectivamente solamente el ADN
20 metilado. El ADN aislado se amplifica usando cebadores de PCR correspondientes a la región promotora, y después se mide la metilación del ADN por electroforesis en gel de agarosa.

Además, la metilación del ADN también puede medirse mediante un método cuantitativo de PCR, y puede marcarse el ADN metilado, aislado con una proteína de unión específica de ADN metilado, con una sonda fluorescente e
25 hibridarse a un chip de ADN que contiene sondas complementarias, midiendo de ese modo la metilación del ADN. En este documento, la proteína de unión específica de ADN metilado puede ser, aunque sin limitación, McrBt.

Detección de metilación diferencial - endonucleasa de restricción sensible a metilación

30 La detección de metilación diferencial puede realizarse poniendo una muestra de ácido nucleico en contacto con una endonucleasa de restricción sensible a metilación que escinde solamente sitios CpG no metilados.

En una reacción diferente, la muestra adicionalmente se pone en contacto con un isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación que escinde sitios CpG tanto metilados como no metilados, escindiendo de ese
35 modo el ácido nucleico metilado.

Se añaden cebadores específicos a la muestra de ácido nucleico, y el ácido nucleico se amplifica mediante cualquier método convencional. La presencia de un producto amplificado en la muestra tratada con la enzima de restricción sensible a metilación pero la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquizómero de la
40 enzima de restricción sensible a metilación indica que ha sucedido metilación en la región de ácido nucleico ensayada. Sin embargo, la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con la enzima de restricción sensible a metilación junto con la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación indica que no ha sucedido metilación en la región de ácido nucleico ensayada.
45

Como se usa en este documento, la expresión "enzima de restricción sensible a metilación" se refiere a una enzima de restricción (por ejemplo, *SmaI*) que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento y tiene actividad cuando la C está metilada en comparación con cuando la C está sin metilar. Ejemplos no limitantes de enzimas de restricción sensibles a metilación incluyen *MspI*, *HpaII*, *BssHII*, *BstUI* y *NotI*. Dichas enzimas pueden usarse en solitario o en combinación. Ejemplos de otras enzimas de restricción sensibles a metilación incluyen, aunque sin limitación *SacII* y *EagI*.
50

El isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación es una enzima de restricción que reconoce el mismo sitio de reconocimiento que la enzima de restricción sensible a metilación pero escinde CG tanto metilados como no metilados. Un ejemplo del mismo incluye *MspI*.
55

Los cebadores de la presente invención se diseñan para que sean "sustancialmente" complementarios a cada hebra del locus a amplificar e incluyen los nucleótidos G o C apropiados como se ha analizado anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras en condiciones de reacción de polimerización. Los cebadores de la presente invención se usan en el proceso de amplificación, que es una reacción en cadena enzimática (por ejemplo, PCR) porque un locus diana aumenta exponencialmente a través de varias etapas de reacción. Típicamente, un cebador es homólogo a la hebra negativa (-) del locus (cebador antisentido), y el otro cebador es homólogo a la hebra positiva (+) (cebador con sentido). Después de que los cebadores hayan hibridado con el ácido nucleico desnaturalizado, se elonga la cadena de ácido nucleico mediante una enzima tal como ADN polimerasa I (Klenow), y reactivos tales como nucleótidos y, como resultado, se sintetizan nuevamente hebras + y - que contienen la secuencia del locus diana. Cuando el locus diana
60
65

recién sintetizado se usa como molde y se somete a ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de cebadores, y elongación, sucede síntesis exponencial de la secuencia del locus diana. El producto de reacción resultante es un dúplex de ácido nucleico diferente con extremos correspondientes a los extremos de los cebadores específicos empleados.

5 La reacción de amplificación es PCR que se usa habitualmente en la técnica. Sin embargo, también pueden usarse métodos alternativos tales como PCR a tiempo real o amplificación lineal usando enzima isotérmica. Además, también pueden usarse reacciones combinadas de amplificación.

10 Detección de metilación diferencial - método de secuenciación con bisulfato

Otro método para detectar un ácido nucleico que contiene CpG metilado comprende las etapas de: poner una muestra que contiene ácido nucleico en contacto con un agente que modifica las citosinas no metiladas; y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra usando cebadores oligonucleotídicos específicos de CpG, donde los cebadores oligonucleotídicos distinguen entre ácido nucleico metilado modificado y ácido nucleico no metilado y detectan el ácido nucleico metilado. La etapa de amplificación es opcional y deseable, pero no esencial. El método se basa en la reacción de PCR para distinguir entre ADN metilado modificado (por ejemplo, modificado químicamente) y ADN no metilado. Dichos métodos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.786.146 que se refiere a secuenciación con bisulfito para la detección de ácido nucleico metilado.

20 Kit

La presente invención proporciona un kit útil para la detección de un trastorno proliferativo celular en un sujeto. El kit de la presente invención comprende un medio de soporte compartimentado para recibir una muestra en el mismo, uno o más recipientes que comprenden un segundo recipiente que contiene cebadores de PCR para la amplificación de una secuencia de bases 5'-CpG-3', y un tercer recipiente que contiene un cebador de secuenciación para pirosecuenciar un producto de PCR amplificado.

El medio de soporte es adecuado para contener uno o más recipientes tales como viales, tubos, y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos diferentes a usar en el método. En vista de la descripción proporcionada en este documento del método de la invención, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la distribución de los reactivos necesarios entre los recipientes.

35 Sustratos

Después de haber amplificado la región diana de ácido nucleico, puede hibridarse el producto de amplificación de ácido nucleico con una sonda génica conocida unida a un soporte sólido (sustrato) para detectar la presencia de la secuencia de ácido nucleico.

40 Como se usa en este documento, el término "sustrato", cuando se usa en referencia a una sustancia, estructura, superficie o material, significa una composición que comprende una superficie no biológica, sintética, inanimada, plana o redonda que hasta ahora no se sabe que comprenda un sitio de reconocimiento específico de unión, hibridación o catalítico o una pluralidad de diferentes sitios de reconocimiento o una cantidad de sitios diferentes de reconocimiento que exceda la cantidad de diferentes especies moleculares que comprenden la superficie, estructura o material. Ejemplos del sustrato incluyen, aunque sin limitación, semiconductores, metales sintéticos (orgánicos), semiconductores sintéticos, aislantes y dopantes; metales, aleaciones, elementos, compuestos y minerales; portaobjetos sintéticos, surcados, grabados, litografiados, impresos, mecanizados y microfabricados, dispositivos, estructuras y superficies; polímeros industriales, plásticos, membranas de silicio, silicatos, vidrio, metales y cerámica; y madera, papel, cartón, algodón, lana, paño, fibras tejidas y no tejidas, materiales y telas; y superficies anfíbias.

50 Se sabe en la técnica que varios tipos de membranas tienen adhesión a secuencias de ácido nucleico. Ejemplos no limitantes específicos de estas membranas incluyen nitrocelulosa u otras membranas usadas para la detección de expresión génica tales como poli(cloruro de vinilo), papel diazotizado y otras membranas disponibles en el mercado tales como GENESCREEN™, ZETAPROBE™ (Biorad) y NYTRAN™. También pueden incluirse perlas, vidrio, obleas y sustratos metálicos. Los métodos para unir ácidos nucleicos a estos objetos son bien conocidos en la técnica. Como alternativa, la detección puede hacerse en una fase líquida.

60 Condiciones de hibridación

En reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones usadas para conseguir un nivel particular de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se estén hibridando. Por ejemplo, puede considerarse la longitud, grado de complementariedad, composición de secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC/AT), y tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN/ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos en la selección de las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

Un ejemplo de condiciones progresivamente más rigurosas es el siguiente: SSC 2X/SDS al 0,1 % a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); SSC 0,2X/SDS al 0,1 % a temperatura ambiente (condiciones de rigurosidad baja); SSC 0,2X/SDS al 0,1 % a 42 °C (condiciones de rigurosidad moderada); y SSC 0,1X a aproximadamente 68 °C (condiciones de rigurosidad alta). El lavado puede realizarse usando solamente una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de rigurosidad alta, o puede usarse cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo todas y cada una de las etapas enumeradas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones óptimas variarán dependiendo de la reacción particular de hibridación implicada, y pueden determinarse empíricamente. En general, se usan condiciones de rigurosidad alta para la hibridación de la sonda de interés.

Marcador

La sonda de interés puede marcarse de forma detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales, o una enzima. El marcaje apropiado con dichas sondas es ampliamente conocido en la técnica y puede realizarse mediante cualquier método convencional.

Ejemplos

A partir de ahora en este documento, se describirá la presente invención en mayor detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para un experto en la materia que estos ejemplos son con fines ilustrativos solamente y no deben entenderse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Descubrimiento de genes metilados específicos de cáncer colorrectal

Para detectar biomarcadores que están metilados específicamente en cáncer colorrectal, se sonicaron 500 ng de cada ADN genómico de 2 personas normales y cada ADN genómico del tejido canceroso y tejido normal adyacente de 12 pacientes con cáncer colorrectal (Vibra Cell, SONICS), construyendo de esa manera fragmentos de ADN genómico de 200~300 pb.

Para obtener solamente ADN metilado del ADN genómico, se usó un dominio de unión a metilo (domino de unión a metilo; MBD) (Fraga et al., *Nucleic Acid Res.*, 31: 1765, 2003) que se sabe que se une a ADN metilado. Específicamente, se pre-incubaron 2 µg de MBD2bt con marca 6xHis con 500 ng del ADN genómico de *E. coli* JM110 (n.º 2638, Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology), y después se unieron a perlas magnéticas Ni-NTA (Qiagen, EE.UU.). Se dejó que 500 ng de cada ADN genómico sonificado aislado de las personas normales y los pacientes con cáncer colorrectal reaccionaran con las perlas en presencia de tampón de unión (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 3 mM, Triton-X100 al 0,1 %, glicerol al 5 %, 25 mg/ml de BSA) a 4 °C durante 20 minutos. Después, las perlas se lavaron tres veces con 500 µl de una solución de tampón de unión que contenía NaCl 700 mM, y después se aisló el ADN metilado unido a MBD2bt usando el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen, EE.UU.).

Después, se amplificaron los ADN metilados unidos a MBD2bt usando un kit de amplificación de ADN genómico (Sigma, EE.UU., Cat. n.º WGA2), y se marcaron 4 µg de los ADN amplificados con Cy4 usando un sistema de marcaje genómico total BioPrime I (Invitrogen Corp., EE.UU.). Para comparar indirectamente el grado de metilación entre la persona normal y el paciente con cáncer colorrectal, se construyó un ADN de referencia. En este documento, el ADN de referencia se construyó mezclando los ADN genómicos de los 12 pacientes con cáncer colorrectal con cada uno de los otros en la misma cantidad, amplificando la mezcla de ADN genómico usando un kit de amplificación de ADN genómico (Sigma, EE.UU., Cat. n.º WGA2), y marcando 4 µg del ADN genómico amplificado con Cy3 usando un sistema de marcaje genómico total BioPrime I (Invitrogen Corp., EE.UU.). El ADN de referencia se mezcló con cada uno de los ADN de las personas normales y los pacientes con cáncer colorrectal, y después se hibridaron a 244K microseries de CpG humano (Agilent, EE.UU.) (FIG. 1). Después de la hibridación, la mezcla de ADN se sometió a una serie de procesos de lavado, y después se escanearon usando un escáner Agilent. El cálculo de los valores de señal a partir de las imágenes de microserie se realizó calculando la diferencia relativa en la fuerza de la señal entre la muestra de persona normal y la muestra de paciente con cáncer colorrectal usando el programa Feature Extraction v. 9.5.3.1 (Agilent).

Para detectar sondas que tengan señales fiables de hibridación, se detectaron 64.325 sondas que tenían un valor de señal Cy3 de más de 112,8 en al menos 21 series entre un total de 26 series mediante el modelo de error génico cruzado usando el programa GeneSpring 7.3 (Agilent, EE.UU.). Para detectar sondas hipermetiladas en cáncer colorrectal entre las sondas anteriores, se realizaron dos métodos de análisis. En el primer método de análisis, el tejido colorrectal de la persona normal y el tejido de aspecto normal adyacente al tejido de cáncer colorrectal se consideraron el mismo grupo, y para detectar sondas que mostraran metilación diferencial en comparación con el tejido de cáncer colorrectal, se realizó el ensayo ANOVA, detectando de ese modo 4.498 sondas ($p < 0,05$). De estas sondas, se detectaron adicionalmente 1.560 sondas hipermetiladas en el tejido de cáncer colorrectal, y de estas sondas, se seleccionaron 4 genes biomarcadores candidatos (*CHST11*, *IRX5*, *KCNA1*, *SDC2*, y *SORCS3*) que mostraban hipermetilación en dos o más sondas adyacentes presentes en una distancia de aproximadamente 400

pb (FIG. 2). En el segundo método de análisis, para descubrir biomarcadores adecuados para diagnóstico prematuro, el tejido de cáncer colorrectal y el tejido de aspecto normal adyacente al mismo se consideraron el mismo grupo, y se realizó el ensayo ANOVA, detectando de ese modo 3.242 sondas que mostraban metilación diferencial en comparación con el tejido colorrectal de las personas normales ($p < 0,01$). De las 3.242 sondas, se detectaron 705 sondas que mostraban hipermetilación en el tejido de cáncer colorrectal y el tejido de aspecto normal adyacente al mismo. De estas sondas detectadas, se seleccionaron 6 genes biomarcadores candidatos (*CHST11*, *IRX1*, *IRX5*, *KCNA1*, *SIM1*, y *SORCS3*) que mostraban hipermetilación en dos o más sondas adyacentes presentes en una distancia de aproximadamente 400 pb (FIG. 2).

Entre los genes biomarcadores candidatos seleccionados usando los dos métodos de análisis anteriores, se confirmaron 4 genes como comunes, y por tanto se garantizó un total de 7 genes biomarcadores candidatos (Tabla 1). Además, se analizó la secuencia de nucleótidos correspondiente a la sonda de cada uno de los 7 genes que mostraban hipermetilación en la microserie de CpG usando MethPrimer (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html>), confirmado de este modo islas CpG en las sondas.

[Tabla 1] Lista de genes biomarcadores de metilación candidatos para diagnóstico de cáncer colorrectal

Genes candidatos	Localizaciones de sonda ^a	N.º GenBank	Descripción
<i>CHST11</i>	+501, +605	NM_018413	carbohidrato (condroitina 4) sulfotransferasa 11
<i>IRX1</i>	+809, +956, +1.021, +1.097	NM_024337	homeobox iroquois 1
<i>IRX5</i>	+2.647, +2.724	NM_005853	homeobox iroquois 5
<i>KCNA1</i>	-1.853, -1.612	NM_000217	canal de potasio abierto por voltaje, subfamilia relacionada con shaker, miembro 1 (ataxia episódica con mioquimia)
<i>SDC2</i>	+1.168, +1.282	NM_002998	Syndecan 2*
<i>SIM1</i>	-1.242, -1.178	NM_005068	homólogo único 1 (<i>Drosophila</i>)
<i>SORCS3</i>	+1.478, +1.519	NM_014978	receptor 3 que contiene dominio VPS10 relacionado con sortilina

^a pares de bases (pb) desde el sitio de inicio de la transcripción (+1)

* de acuerdo con la invención

Ejemplo 2: Medición de la metilación de genes biomarcadores en líneas de células cancerosas

Para confirmar adicionalmente el estado de metilación de los genes biomarcadores candidatos seleccionados en el Ejemplo 1, se realizó pirosecuenciación para la región promotora e intrónica de cada gen.

Para modificar la citosina no metilada en uracilo usando bisulfito, se aisló el ADN genómico total de cada una de las líneas celulares de cáncer colorrectal Caco-2 (KCLB n.º 30037,1) y HCT116 (KCLB n.º 10247), y se trataron 200 ng del ADN genómico con bisulfito usando el kit de metilación de ADN-oro EZ (Zymo Research, EE.UU.). Cuando el ADN se trató con bisulfito, la citosina no metilada se modificó en uracilo, y la citosina metilada permaneció sin cambios. El ADN tratado con bisulfito se eluyó en 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación.

Se diseñaron cebadores de PCR y secuenciación para realizar pirosecuenciación para los 7 genes usando el programa de diseño de ensayos PSQ (Biotage, EE.UU.). Los cebadores de PCR y secuenciación para medir la metilación de cada gen se muestran en las Tablas 2 y 3 a continuación.

[Tabla 2] Cebadores de PCR

Genes	Cebadores	Secuencias (5'->3')	SEC ID N.º	Localización de CpG ^b	Tamaño de amplicón (pb)
<i>CHST11</i>	Directo	GAGATTATTTGGTTAATATGG	4	+361, +368, +385,	207
	Inverso	TTTAAAACRAAATCTCACT	5	+391, +393	
<i>IRX1</i>	Directo	YGAAAYGGAGTTTATTTAAGT G	6	+660, +681, +686, +692	126
	Inverso	ACRAAACRACCTCTTAAATC	7		
<i>IRX5</i>	Directo	GGGTTYGGGTTAGGTTTATAA	8	+2558, +2568, +2572,	113
	Inverso	TAACTCCRCAACATTTTC	9	+2576	
<i>KCNA1</i>	Directo	GGGTGGGTTTYGTAGAGAGTAA G	10	-420, -410, -398, -394	114
	Inverso	CCTCCRACRAATTTACTTTT	11		
<i>SDC2</i> *	Directo	YGT TTTTYGAGATTAGGGATGA TT	12	+1100, +1115, +1131, +1133	107
	Inverso	TCTCCCCAAAACCTTACAT	13		
<i>SIM1</i>	Directo	GGTTTTTAATTAGGAATAATAG	14	-1024, - 1021,	244

		TG		- 1015, -1003	
	Inverso	AACRCCCATCTCTTAACT	15		
SORCS3	Directo	GGGTTTTTTTGGATAAGG	16	+1741, +1751, +1754,	101
	Inverso	CAAACRCRATACTCAATC	17	+1763	

^a Y = C o T; R = A o G

^b distancias (nucleótidos) desde el sitio de inicio de la transcripción (+1): las posiciones de las regiones CpG en el ADN genómico usado en la medición de la metilación

* de acuerdo con la invención

5

[Tabla 3]

Secuencias de cebadores de secuenciación para genes marcadores de metilación

Genes	Secuencias (5' --> 3')	SEC ID N.º
<i>CHST11</i>	TAGGAGAATGGTGTGAAT	18
<i>IRX1</i>	TCCCTCTTCTCCCTA	19
<i>IRX5</i>	ATTTTAATGGATTAATAG	20
<i>KCNA1</i>	TTTTTTGGGGGAGGA	21
<i>SDC2*</i>	GGGATGATTTGGAAATT	22
<i>SIM1</i>	CATCTCTTAACTATTCTCATACCT	23
<i>SORCS3</i>	TTTTTTGGATAAGGATG	24

* de acuerdo con la invención

10

Se amplificaron 20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito por PCR. En la amplificación por PCR, se usó una solución de reacción de PCR (20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de tampón de PCR 10x (Enzymomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzymomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, y después 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 60 °C durante 45 segundos y elongación a 72 °C durante 40 segundos, seguido de elongación final a 72 °C durante 5 minutos. La amplificación del producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %.

15

20

El producto de PCR amplificado se trató con reactivos PyroGold (Biotage, EE.UU.), y después se sometió a pirosecuenciación usando el sistema PSQ96MA (Biotage, EE.UU.). Después de la pirosecuenciación, se midió el grado de metilación del ADN calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa promedio de unión de citosina para cada isla CpG.

25

Como se ha descrito anteriormente, los grados de metilación de los genes biomarcadores candidatos en las líneas celulares de cáncer colorrectal se midieron usando el método de pirosecuenciación. Como resultado, como puede observarse en la FIG. 3A, los 7 genes marcadores estaban todos metilados a altos niveles en al menos una de las líneas celulares. Los 7 genes mostraron altos niveles de metilación en las líneas celulares de cáncer colorrectal, lo que sugiere que estos genes son útiles como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer colorrectal. Para verificar si estos genes se usan como biomarcadores, se realizó adicionalmente el siguiente ensayo usando una muestra de tejido.

30

Ejemplo 3: Medición de metilación de genes biomarcadores candidatos en tejido colorrectal de personas normales

35

Para que los 7 genes biomarcadores candidatos tengan utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer colorrectal, estos genes deben mostrar niveles bajos de metilación en el tejido colorrectal de personas normales diferentes a los pacientes, pero deben mostrar niveles altos de metilación en tejido de cáncer colorrectal.

40

Para verificar si estos genes satisfacen estos requisitos, se aisló ADN genómico de tejido colorrectal de dos personas normales (Biochain) usando el mini-kit de ADN QIAamp (QIAGEN, EE.UU.), y se trataron 200 ng del ADN genómico aislado con bisulfito usando el kit de metilación de ADN-oro EZ (Zymo Research, EE.UU.). El ADN tratado se eluyó en 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación.

45

Se amplificaron 20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito por PCR. En la amplificación por PCR, se usó una solución de reacción de PCR (20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de tampón de PCR 10x (Enzymomics, corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzymomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, y después 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 60 °C durante 45 segundos y elongación a 72 °C durante 40 segundos, seguido de elongación final a 72 °C durante 5 minutos. La amplificación del producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %.

50

El producto de PCR amplificado se trató con reactivos PyroGold (Biotage, EE.UU.), y después se sometió a

pirosecuenciación usando el sistema PSQ96MA (Biotage, EE.UU.). Después de la pirosecuenciación, se midió el grado de metilación del ADN calculando el índice de metilación del mismo. El índice de metilación se calculó determinando la tasa promedio de unión de citosina para cada región CpG. De la misma manera que en el Ejemplo 2, se usaron los cebadores de PCR de la Tabla 2 y los cebadores de secuenciación de la Tabla 3.

Como resultado, como puede observarse en la FIG. 3B, los genes *IRX1*, *IRX5*, *KCNA1* y *CHST11* entre los 7 genes, mostraron niveles de metilación mayores del 40 % en el tejido normal, lo que sugiere que estos genes no tienen utilidad como biomarcadores. Por tanto, estos genes se excluyeron de los biomarcadores candidatos. Por otro lado, los genes *SIM1*, *SDC2* y *SORCS3* mostraron niveles relativamente bajos de metilaciones en el tejido normal. Por tanto, para verificar si los genes *SIM1*, *SDC2* y *SORCS3* son útiles como biomarcadores, se realizó el siguiente ensayo usando el tejido de pacientes con cáncer colorrectal.

Ejemplo 4: Medición de metilación de genes biomarcadores en tejido de pacientes con cáncer colorrectal

Para verificar si los genes *SIM1*, *SDC2* y *SORCS3* que muestran niveles altos de metilación en el tejido colorrectal de personas normales son útiles como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer colorrectal, se aislaron ADN genómicos de tejidos de cáncer colorrectal aislados de 12 pacientes con cáncer colorrectal (el Biochip Research Center en Yonsei University, asignado por el ministro coreano de salud y bienestar) y los tejidos de aspecto normal adyacentes a los mismos.

Se trataron 200 ng de cada uno de los ADN genómicos aislados con bisulfito usando el kit de metilación de ADN-oro EZ (Zymo Research, EE.UU.). Cada uno de los ADN tratados se eluyó en 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación.

Se amplificaron 20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito por PCR. En la amplificación por PCR, se usó una solución de reacción de PCR (20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de tampón de PCR 10x (Enzymomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzymomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, y después 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 60 °C durante 45 segundos y elongación a 72 °C durante 40 segundos, seguido de elongación final a 72 °C durante 5 minutos. La amplificación del producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %.

El producto de PCR amplificado se trató con reactivos PyroGold (Biotage, EE.UU.), y después se sometió a pirosecuenciación usando el sistema PSQ96MA. Después de la pirosecuenciación, se midió el grado de metilación del ADN calculando el índice de metilación del mismo. El índice de metilación se calculó determinando la tasa promedio de unión de citosina para cada región CpG. De la misma manera que en el Ejemplo 2, se usaron los cebadores de PCR de la Tabla 2 y los cebadores de secuenciación de la Tabla 3.

Se midieron los grados de metilación de los 3 genes. Como resultado, como puede observarse en la FIG. 4, los genes *SDC2* y *SIM1* mostraron niveles mayores de metilación en los tejidos de cáncer colorrectal de todos (100%) los 12 pacientes en comparación con aquellos en los tejidos de aspecto normal. Además, el gen *SORCS3* mostró altos niveles de metilación en los tejidos de cáncer colorrectal de 10 (83,3%) de los 12 pacientes (8,3,3%). Por tanto, se descubrió que los tres genes son muy útiles como biomarcadores de metilación para el diagnóstico de cáncer colorrectal. La siguiente Tabla 4 muestra los valores promedio de los niveles de metilación de los tres genes biomarcadores en los tejidos de cáncer colorrectal y los tejidos de aspecto normal adyacentes a los mismos. Para confirmar si el nivel de metilación de los genes difiere de forma estadísticamente significativa entre el tejido de cáncer colorrectal y el tejido de aspecto normal, se realizó el ensayo de ji cuadrado. Como resultado, pudo observarse que los tres genes mostraban niveles estadísticamente significativos ($p < 0,01$) (véase la Tabla 4).

[Tabla 4] Resultados de análisis cuantitativo de metilación de 3 biomarcadores

Genes	Nivel promedio de metilación (% , promedio \pm desviación típica)		Valores P ^a
	Tejidos de aspecto normal	Tejidos de cáncer colorrectal	
<i>SDC2</i> *	5,7 \pm 0,6	24,5 \pm 15,4	< 0,0001
<i>SIM1</i>	18,3 \pm 4,7	29,8 \pm 11,8	< 0,0001
<i>SORCS3</i>	24,1 \pm 5,0	51,8 \pm 19,9	0,0012

^a valores p obtenidos a través del ensayo de ji cuadrado
* de acuerdo con la invención

Ejemplo 5: Evaluación de la capacidad de 3 biomarcadores de diagnosticar cáncer colorrectal

Para los genes *SIM1*, *SDC2* y *SORCS3* confirmados útiles como marcadores de cáncer colorrectal en el Ejemplo 4, se realizó análisis de característica operativa del receptor (ROC) usando el programa MedCalc (MEDCALC, Bélgica) para evaluar la capacidad de los genes de diagnosticar cáncer colorrectal.

5 Como resultado, como se muestra en la FIG. 5, las sensibilidades y especificidades de los genes para cáncer colorrectal fueron, respectivamente, del 100% y 100% para el gen *SDC2*, del 83,3% y 100% para el gen *SIM1*, y del 83,3% y 100% para el gen *SORCS3*. Esto sugiere que los genes tienen una capacidad excelente para diagnosticar cáncer colorrectal.

Además, entre los 3 biomarcadores, el *SDC2*, que tiene la mayor capacidad para diagnosticar cáncer colorrectal, se evaluó para su capacidad para diagnosticar cáncer colorrectal en una muestra fecal.

10 Específicamente, usando una técnica de PCR anidada específica de metilación (MSP), se aislaron ADN genómicos de las muestras fecales de 4 personas normales y 10 pacientes con cáncer colorrectal (el Biochip Research Center en Yonsei University, asignado por el ministro coreano de salud y bienestar). Se trataron 4 µg de cada uno de los ADN genómicos aislados con bisulfito usando el kit de metilación de ADN-oro EZ (Zymo Research, EE.UU.). Cada uno de los ADN tratados se eluyó en 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a un ensayo MSP anidado. Las secuencias cebadoras usadas en el ensayo MSP anidado se muestran en la Tabla 5 a continuación.

[Tabla 5] Secuencias cebadoras usadas en ensayo MSP del gen *SDC2*

Metilación	Cebadores	Secuencias cebadoras (5'--> 3')	Tamaño del producto amplificado (pb)	SEC ID N.º
Metilación	Exterior-F	AATTTTCGGTACGGGAAAGGAGTT C	248	25
	Exterior-R	AAACAAAATACCGCAACGATTAC GA		26
	Interior-F	TAGAAATTAATAAGTGAGAGGGC GT	121	27
	Interior-R	GACTCAAACCTCGAAAACCTCGAA		28
Sin metilación	Exterior-F	TGAATTTTGGTATGGGAAAGGAG TTT	250	29
	Exterior-R	AAACAAAATACCACAACAATTAC AAC		30
	Interior-F	GAGTGTAGAAATTAATAAGTGAG AGGGT	129	31
	Interior-R	TACAACTCAAACCTCAAAAACCTCA AA		32

20 Se amplificó 1 µg del ADN genómico tratado con bisulfito por PCR. En la amplificación por PCR, se usó una solución de reacción de PCR (20 µg del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de tampón de PCR 10x (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de Dntp 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, y después 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, hibridación a 60 °C durante 45 segundos y elongación a 72 °C durante 40 segundos, seguido de elongación final a 72 °C durante 5 minutos. 1/2 del producto de PCR se recogió y amplificó por PCR durante 45 ciclos de la misma manera que anteriormente. La amplificación de los productos de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %.

30 Como resultado, como se muestra en la FIG. 6, se observó que el gen *SDC2* no estaba metilado en los tejidos de las 4 personas normales, pero estaba metilado en 6 (60%) de los 10 pacientes con cáncer colorrectal. Esto sugiere que el gen *SDC2* es útil para el diagnóstico de cáncer colorrectal en heces.

Aplicabilidad industrial

5 Como se ha descrito anteriormente, el uso del método de la invención para detectar metilación y la composición, kit y chip nucleico de la invención para diagnosticar cáncer colorrectal hace posible diagnosticar cáncer colorrectal en una fase de transformación prematura, posibilitando de esa manera el diagnóstico prematuro de cáncer colorrectal. Además, el método de la invención posibilita diagnosticar de forma eficaz el cáncer colorrectal de un modo preciso y rápido en comparación con métodos convencionales de la presente invención. Por tanto, el alcance sustancial de la presente invención se definirá por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GENOMICTREE, INC.

5 <120> MÉTODO PARA DETECTAR LA METILACIÓN DE GENES MARCADORES DE METILACIÓN ESPECÍFICOS DE CÁNCER DE COLON PARA DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE COLON

<130> 24218EP

10 <140> 10 828 451.4
<141> 14-10-2010

<150> KR10-2009-0106445
<151> 05-11-2009

15 <160> 44

<170> KopatentIn 1.71

20 <210> 1
<211> 1120
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Intrón del gen SCD2

<400> 1
gagtgggcca ggcggaggat gcgcgcgccg tttagggtgt ttgaagctac gagaggagcc 60
cgcagggaaat aggggagcgc cacctgggga acccccagtc cccaagtata caccggagat 120
ccgctgggac aaatgcgctc gtccggtcac cctttccccc tcttccttc ctcaaaaag 180
cgctgctcgc tggcgttacc ccgcggtccg cgggaatggg ggcaccgaga attgcggttt 240
ggcttagccg cagaggcccc tgaagtcact cccaacttct tcgccctcgg cgggtcttgc 300
tgctgtgtct gggaggagc gaggggaaag ggtggcagga ggggggagcc tgggtcgggc 360
ccgcgagggga acggtccac tccgcgcgct cctcgagacc agggatgacc tggaaacttc 420
ggggtccctt cctccgcaca ccatccccc cgccagct ttctgtttg actgcatgca 480
agttctgggg agatgggggc cagatttaag agaccgcga gtgtccagag agaaaagttt 540
gcaaaagttc ttttgtttga tgctccctgc ggctagggcg aggtaaccga cactacgtgg 600
aatcgcagta ggcgatccct caaggggata ctgggggagg cacggaacgc gtccgaaaat 660
gctgggacgc cggccactgg attcccagtc ctgcggcgac cccctcctcg ttgaggggtg 720
gaggttgcac cgcggggcgt cagggacggg aggacatttt cataggagtt acacgggagt 780
gccgcaagca gggcgaggcg ggttacgtgt gacacggcgc tcggcttcgg gtcgcctggc 840
cgctggggga cagaggcttc cctcccgccg cgctcgccct ctctggccct ggcggggcgc 900
ttctggggcc gggaggagtc tcgtctccgg cggagcgcct gccggcacc agcttccttc 960
ccccgcctg gcggtgggaa cttgatttct ccttttggtc gcgcttcggg ggctggagct 1020
tgtttcccca cgtcgcccaa tgagcgccct ctaaagggaa ctgcctcctt ggcctcctct 1080
cgtcgcagc tgcctccacc tgggcgccag gagctctgtc 1120

30 <210> 2
<211> 1000
<212> ADN

ES 2 561 660 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Promotor del gen SIM1

5

<400> 2

gcaaccggac agcgccgacc cggcacccctg agctcattag gagtccagcg gtcccgcggg	60
tagtaagatt cagagcccgg agcctgggcg cgcggagggc ggctcggggc cgactcgtgt	120
cactcagccc tattggccaa tgagcgcctc gcccttgccc gcgccaggcc aatgggaggg	180
gagggggctt gtgagtggca ttgagggagg gcgggagaga ggcgccccg gagtgaagtt	240
gaagctaaac ccttaagcta taaagaagtt acggggggca gttttcggct tccaattagg	300
aataatagtg aactggcttc gtagcaacta cggaggacca ggattctaaa atcacctcac	360
tcgtcccaaa gcttgcattc tcctctttct gccacgcacc cctcctcaa ttcattgatcc	420
agaaaagggg gccgggaatg ctctgctcct ctctgccggg gggaagcggg gaggccggcg	480
gtgtcgctgg gttggacggg aggcattgaga acagttaaga gatggggccc cccgaaacct	540
ctgccgcttg tggggactga aggtaggtga agcagaagac gccccgcgcc cgcccagcag	600
ccccgcagct ccgcgggtgt gtgggagagg ccgcggcgcc tcccaccccc gggggagcct	660
gcgaggggct gtcgcgagcg cgcacactgt taacctggcg ctgctgggcc ccgcttgttg	720
cagcccctgc tgggcagcca gagcgtggg tcgccttggg agtcccgaga gacttggtgt	780
gtaagtgtca ctttttgagg aatccctcag acttgagacc caagttaaag aggtagccaa	840
ggtccagatc tgccaaggta gggagctgaa aggccctgc ctgccttgg aggaattctg	900
atctgcggaa acctgctttc ctgggacgtg cgcgccgctt gggcgcggac tcggggatcc	960
gcggcggaag atcccttgcg ggtcttcaga aatatgtatt	1000

<210> 3

10 <211> 1150

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Intrón del gen SORCS3

<400> 3

cagcgtgagt acccaaccgg cggcgggtcc gcctgtttcc tgacaccgaa ggggaatggg	60
ggggtggggtg ggagcgaggg acagatagtt gctcgggggt cgaggcgggg gacgcctcga	120
cttttcgaga taacaggttt gtccgattcc ccccacgccc ccaacaggtt aacggagttt	180
gttgttagac gctgtgtgtg tttgtttact ggagacccta ggcttcggcc gccgggaggg	240
gagtggagga aggggcttct taaagatgag tgggggaggg atctgtgctc actttctcca	300
atacttggct tggaggttca gttttcctgt ttgcgggggtg cttgaattct tggatgagaa	360

ES 2 561 660 T3

	aaagggctga cttggggcgg gagccgctga acagaccgat tcctgcggct gccgggctcc	420
	ccctaccccc accccacccc cccccccct cccgtcacgc gaaagggaac ccggaaggcc	480
	attcggactc ccagcctcct gctcgcctcg gggtcgctgc tatccgctcc aggcgcgcag	540
	tcctccagcc caagagggag gctcggccaa gtcggccccc agccttgcc ttcaggtaac	600
	cccggttcct ccttcaaagt ccagggagcg gccctggaaa gcgtagcag aggccgtaaa	660
	aaaaagtta aagcgtgaag cgaaattcca caccatcca gcgctcatgc cacaccgctc	720
	gccctcacgc acgcacaggc acacggaagt cgctcagcag aaaactctcg acttcacat	780
	tgcgtcctgc gccacaaacg gctccctgag cggagtggg tgctgagct tcctgcacac	840
	ctctccacce gcttttcccc gccaccgggt tctcctggac aaggatgtac cgagaggtgg	900
	cgtcgtgag cccggtctgg cctactccgg cattccgaac tgggcgcccg actgagcatc	960
	gcgctcgctt ggcagctgca gcggcccga gcgctgccc ggaggggctc cccctacctc	1020
	gccggcacc cagcgtgtgc agccaagcaa agaaaaggcg ggggacaggt tcccaccatc	1080
	tccccgactt ccctccctcc cggggtccct actagagcca gatttgaaa atcctttcct	1140
	cttctctggc	1150
	<210> 4	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador directo para el gen CHST11	
	<400> 4	
	gagattattt tggtaatat gg	22
	<210> 5	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador inverso para el gen CHST11	
	<400> 5	
	tttaaaacra aatctcact	19
25	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador directo para el gen IRX1	
	<400> 6	
35	ygaaayggag tttatttaa gtg	23
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador inverso para el gen IRX1	

ES 2 561 660 T3

	<400> 7 acraaacrac ctctaaatc	20
5	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo para el gen IRX5	
15	<400> 8 gggttygggt taggtttat aa	22
20	<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso para el gen IRX5	
30	<400> 9 taactccrca acatttcc	18
35	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador directo para el gen KCNA1	
45	<400> 10 gggtgggttt ygtagagagt aag	23
50	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador inverso para el gen KCNA1	
60	<400> 11 cctccrca attactttt	20
65	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador directo para el gen SDC2	
75	<400> 12 ygttttyga gattaggat gatt	24
80	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Cebador inverso para el gen SDC2	

ES 2 561 660 T3

	<400> 13 tctcccaaa acttacat	18
5	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo para el gen SIM1	
15	<400> 14 ggttttaaat taggaataat agtg	24
20	<210> 15 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador inverso para el gen SIM1	
30	<400> 15 aacrcccatc tcttaact	18
35	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador directo para el gen SORCS3	
45	<400> 16 gggtttttt ggataagg	18
50	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador inverso para SORCS3 gene	
60	<400> 17 caaacrctat actcaatc	18
65	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen CHST11	
75	<400> 18 taggagaatg ggtggaat	18
80	<210> 19 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen IRX1	

ES 2 561 660 T3

	<400> 19 tccctctct cccta	15
5	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen IRX5	
15	<400> 20 attttaatgg attaaattag	20
20	<210> 21 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen KCNA1	
25	<400> 21 tttttgagg gagga	15
30	<210> 22 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen SDC2	
35	<400> 22 gggatgattt gaaatt	17
40	<210> 23 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen SIM1	
50	<400> 23 catctcttaa ctattctcat acct	24
55	<210> 24 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador de secuenciación para el gen SORCS3	
60	<400> 24 ttttttgga taaggatg	18
60	<210> 25 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Cebador exterior-F	

ES 2 561 660 T3

	<400> 25 aatttcgta cgggaaagga gttc	24
5	<210> 26 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador exterior-R	
15	<400> 26 aaacaaaata ccgcaacgat tacga	25
20	<210> 27 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador interior-F	
30	<400> 27 tagaaattaa taagtgagag ggcgt	25
35	<210> 28 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador interior-R	
45	<400> 28 gactcaaact cgaaaactcg aa	22
50	<210> 29 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador exterior-F	
60	<400> 29 tgaatttgg tatgggaaag gagttt	26
65	<210> 30 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Cebador exterior-R	
75	<400> 30 aaacaaaata ccacaacaat tacaac	26
80	<210> 31 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
85	<220> <223> Cebador interior-F	

ES 2 561 660 T3

	<400> 31 gagtgtagaa attaataagt gagaggg	28
5	<210> 32 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador interior-R	
15	<400> 32 tacaactcaa actcaaaaac tcaaa	25
20	<210> 33 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda para el gen SDC2	
25	<400> 33 tgggtcgggc ccgagggga acggc	25
30	<210> 34 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda para el gen SDC2	
35	<400> 34 ggggggagcc tgggtcgggc ccgagggga acggctccac	40
40	<210> 35 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sonda para el gen SDC2	
50	<400> 35 tcgcctcgg cgggtctgc tgcgtgtct gggaaggacg gaggggaaag	50
55	<210> 36 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda para el gen SDC2	
	<400> 36 gggggtccctt cctccgcaca ccatccccc cgcgccagct ttctgtttg actgcatgca	60
	agttctgggg agatgggggc cagatttaag agaccgcgca	100
60	<210> 37 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 561 660 T3

	<220>	
	<223> Sonda para el gen SIM1	
	<400> 37	
5	gatgggcgcc cccgaaacct ctgcc	25
	<210> 38	
	<211> 40	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda para el gen SIM1	
	<400> 38	
15	gccccgcgcc cgcccagcag cccccagct ccgcggtgg	40
	<210> 39	
	<211> 50	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda para el gen SIM1	
25	<400> 39	
	gggaagcgga gaggccggcg gtgtcgtgg gttggacggt aggcatgaga	50
	<210> 40	
30	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Sonda para el gen SIM1	
	<400> 40	
	gggaagcgga gaggccggcg gtgtcgtgg gttggacggt aggcatgaga acagttaaga	60
	gatgggcgcc cccgaaacct ctgccgcttg tggggactga	100
40	<210> 41	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Sonda para el gen SORCS3	
	<400> 41	
50	cgagaggtgg cgtcgttgag cccgg	25
	<210> 42	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Sonda para el gen SORCS3	
	<400> 42	
60	cgtcgttgag cccggtctgg cctactccgg cattccgaac	40
	<210> 43	
	<211> 50	
	<212> ADN	

ES 2 561 660 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda para el gen SORCS3

5

<400> 43

cgagaggtgg cgtcgttgag cccggtctgg cctactccgg cattccgaac 50

<210> 44

10 <211> 110

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Sonda para el gen SORCS3

<400> 44

cgtcgttgag cccggtctgg cctactccgg cattccgaac tgggcgccc actgagcatc 60

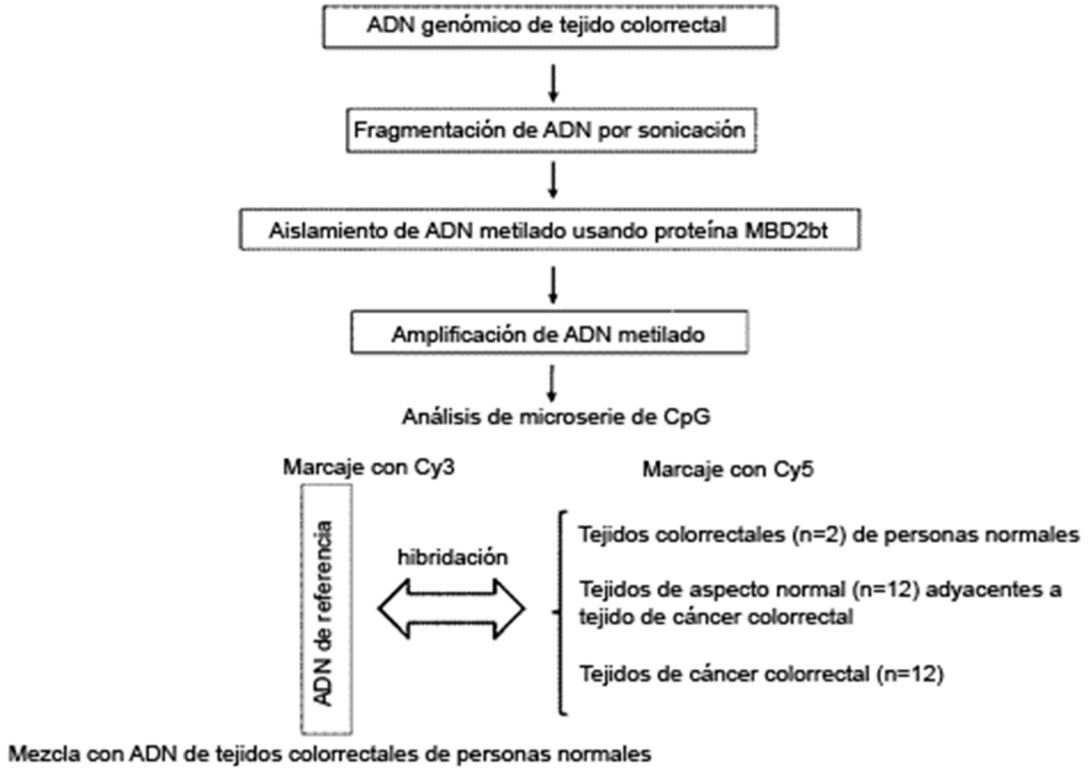
gcgcctgcct ggcagctgca gcggcccga gcgcgtgcc ggaggggctc 110

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar la metilación de genes marcadores de metilación específicos de cáncer colorrectal para el diagnóstico de cáncer colorrectal, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; y
(b) detectar la metilación de la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) en el ADN de la muestra clínica.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza detectando la metilación de la isla CpG en la región intrónica del gen *SDC2* que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N.º 1.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza detectando la metilación de la isla CpG de una región amplificada por un par de cebadores de las SEC ID N.º 25 y 26 o la isla CpG de una región amplificada por un par de cebadores de las SEC ID N.º 27 y 28.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) se realiza mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR específica de metilación a tiempo real, ensayo de PCR usando una proteína de unión específica de ADN con metilación, PCR cuantitativa, ensayo basado en chip de ADN, pirosecuenciación, y secuenciación con bisulfato.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra clínica se selecciona entre el grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma sanguíneo, suero, heces, y orina de un paciente sospechoso de tener cáncer o un sujeto a diagnosticar.
- 30 6. Uso de un kit para diagnosticar cáncer colorrectal, en el que el kit comprende:
un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento metilado que comprende la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2), en el que el fragmento se metila mediante un tratamiento con bisulfito;
un cebador de secuenciación para pirosecuenciar un producto de PCR amplificado por el par de cebadores; y un tampón de PCR.
- 35 7. El uso de la reivindicación 6, en el que el par de cebadores de PCR es un par de cebadores de las SEC ID N.º 12 y 13.
- 40 8. El uso de la reivindicación 6, en el que el cebador de secuenciación es el cebador de la SEC ID N.º 22.
9. Un uso in vitro de la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) en el diagnóstico de cáncer colorrectal.
- 45 10. Uso de un biomarcador para diagnóstico in vitro de cáncer colorrectal o para el diagnóstico in vitro de la fase de su progresión, en el que el biomarcador consiste en la isla CpG del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2) o la isla CpG del promotor del gen *SDC2* (NM_002998, Syndecan 2).

FIG. 1



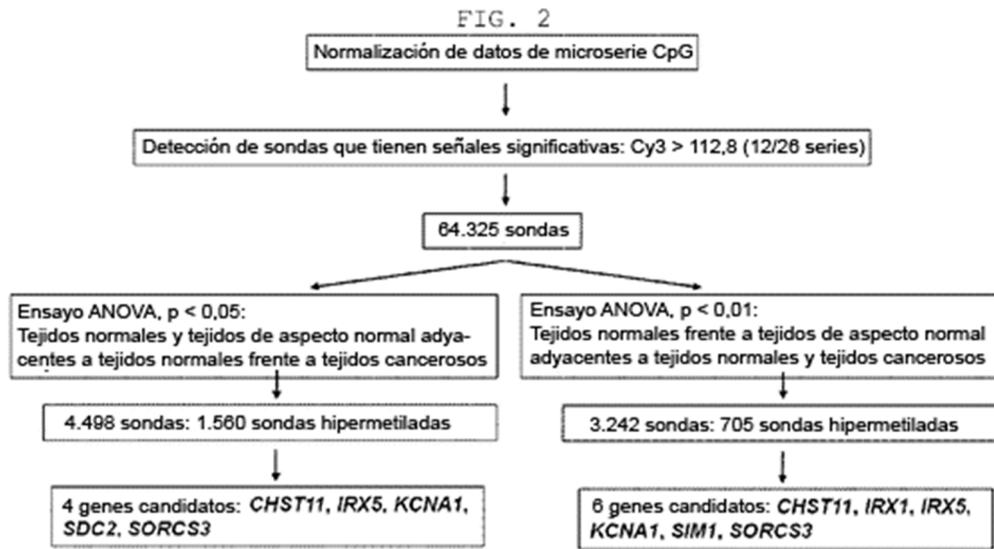


FIG. 3

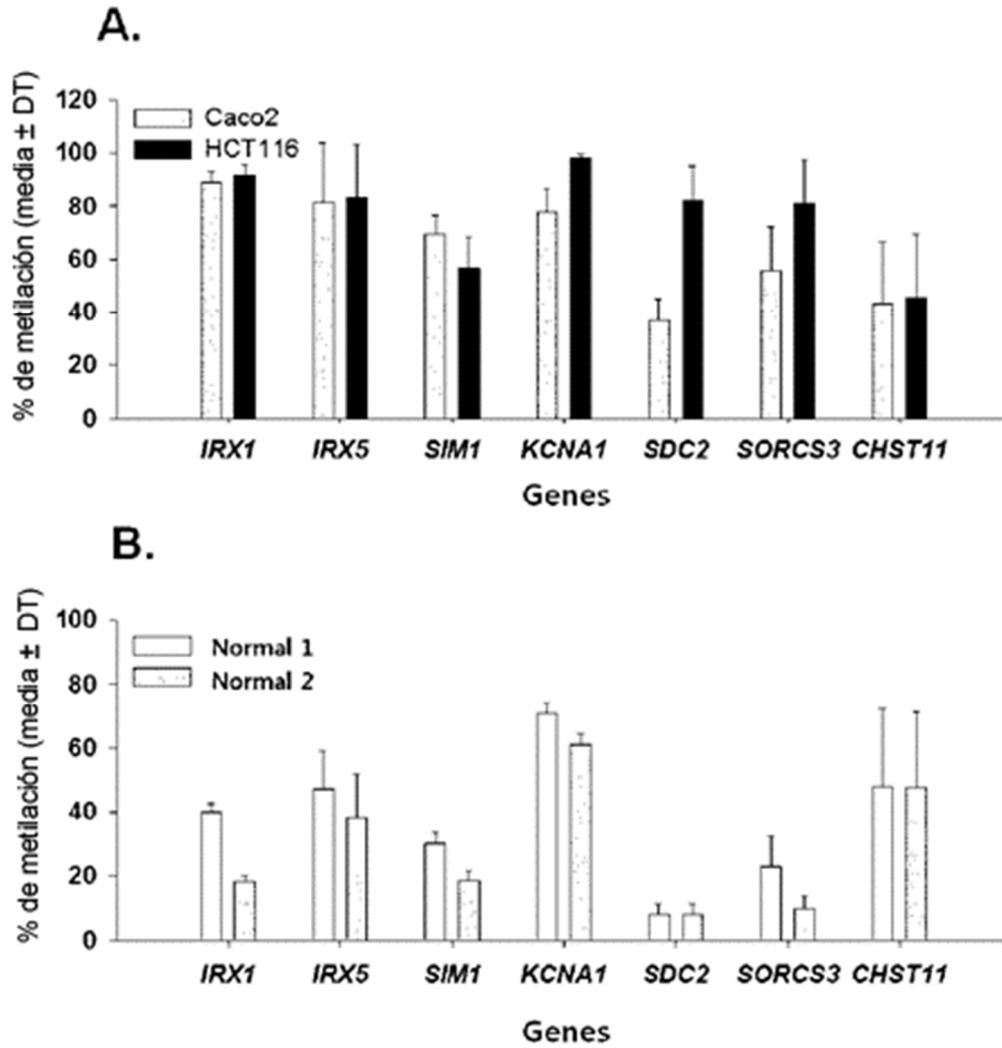


FIG. 4

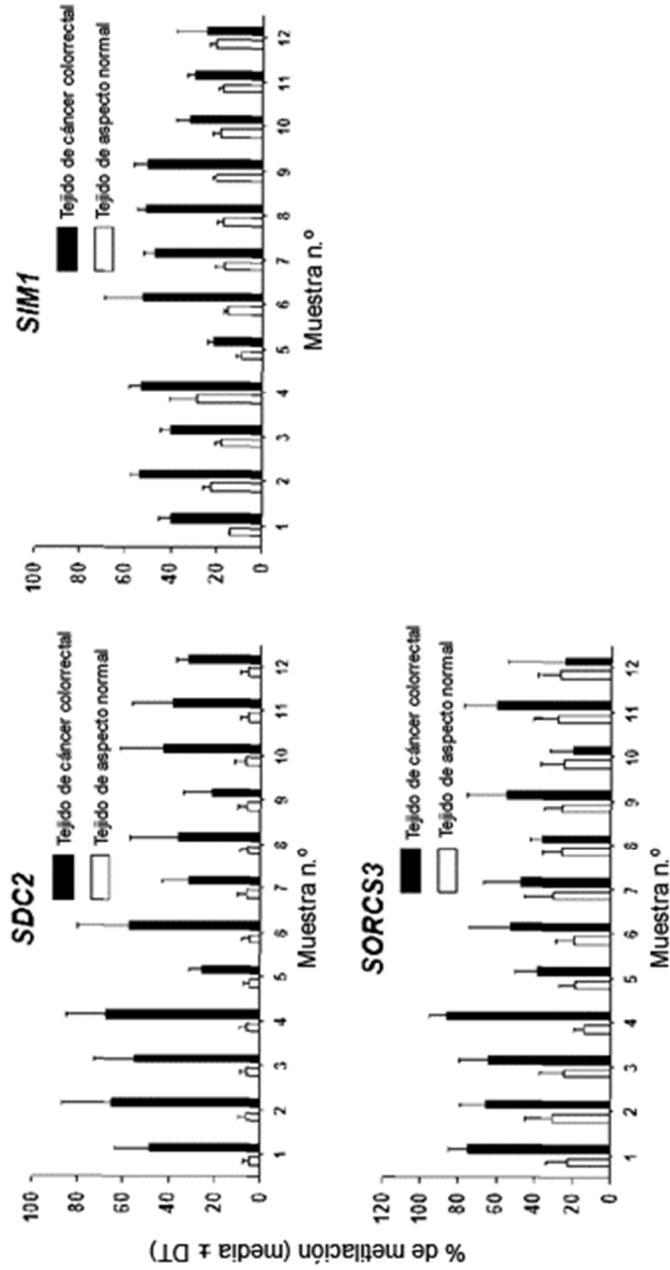


FIG. 5

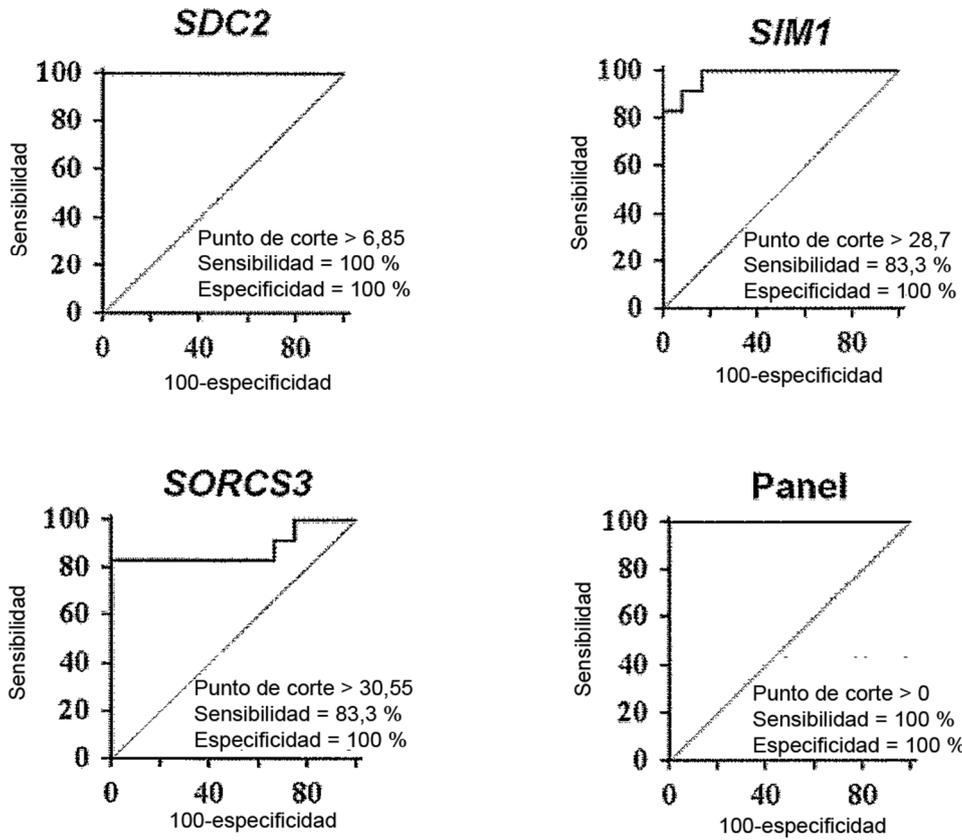


FIG. 6

