

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 594**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11787338 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2576832**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar una neoplasia**

30 Prioridad:

**25.05.2010 US 348010 P**

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

**06.09.2016**

73 Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 North Charles Street  
Baltimore, MD 21218, US**

72 Inventor/es:

**AHUJA, NITA;  
BAYLIN, STEPHEN;  
HERMAN, JAMES, GORDON;  
WANG, JEFF;  
BAILEY, VASUDEV y  
YI, JOO-MI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 581 594 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

Composiciones y métodos para detectar una neoplasia

### Antecedentes de la invención

El cáncer pancreático es la cuarta principal causa de mortalidad por cáncer con una tasa de mortalidad casi igual a la incidencia de esta enfermedad. La detección de secuencias promotoras de genes anormalmente metilados en el ADN específicas de cáncer ha surgido como una de las principales estrategias de detección de biomarcadores tumorales. Recientemente, ha habido informes útiles de cribado por metilación de ADN usando diversos fluidos corporales, tales como heces para la detección del cáncer colorrectal, esputos para el cáncer de pulmón y orina para el cáncer de próstata.

Sin embargo, en el cáncer pancreático no está disponible actualmente una herramienta de cribado para la detección precoz. Esto es particularmente importante ya que el cáncer pancreático ha menudo se encuentra una vez que ya es metastásico o está localmente avanzado y el diagnóstico a menudo se retrasa debido a que los pacientes se presentan con síntomas gastrointestinales no específicos. El desarrollo de una modalidad de cribado para el cáncer pancreático que identifique cánceres en fase inicial susceptibles de resección curativa quirúrgica tendría entonces un impacto potencial en la reducción de la mortalidad por esta enfermedad actualmente letal.

SHAMES DAVID S Y COLS: "A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies", PLOS MEDICINE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 3, nº 12, 1 de diciembre de 2006 (2006-12-01), ISSN: 1549-1676, DOI: 10.1371/JOURNAL.PMED.0030486 divulga un enfoque de perfilado de expresión global de alto rendimiento en células de cáncer de pulmón para identificar nuevos marcadores de metilación específicos para cáncer. Se identificaron 132 genes que tienen islas 5' CpG que son inducidas a partir de niveles indetectables mediante 5-aza-2'-desoxicitidina en múltiples células de cáncer de pulmón no microcítico y se expresan en células epiteliales bronquiales humanas inmortalizadas.

CHOI J E Y COLS: "Aberrant methylation of ADAMTS1 in non-small cell lung cancer", CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NUEVA YORK, NY, US, vol. 187, no. 2, 1 de diciembre de 2008 (2008-12-01), páginas 80-84, ISSN: 0165-4608, DOI: 10.1016/J.CANCERGENCYT0.2008.08.001 divulga la expresión de ADAMTS1 en cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC, por sus siglas en inglés) y la relación entre la metilación de ADAMTS1 y las características clinicopatológicas en pacientes con NSCLC. Los resultados sugieren que la metilación aberrante de ADAMTS1 se produce frecuentemente en NSCLC y representa un papel en la patogénesis del NSCLC.

PHILIP J. JOHNSON Y COLS: "Plasma Nucleic Acids in the Diagnosis and Management of Malignant Disease", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 48, nº 8, 1 de agosto de 2002 (2002-08-01), páginas 1186-1193, ISSN: 0009-9147 divulga ácidos nucleicos en circulación como una clase emergente de marcadores tumorales moleculares tales como ADN plasmático, análisis de microsatélites, translocaciones cromosómicas, alteraciones epigenéticas y ADN viral.

ESTELLER M: "Relevance of DNA methylation in the management of cancer", LANCET ONCOLOGY, LANCET PUBLISHING GROUP, LONDRES, GB, vol. 4, nº 6, 1 de junio de 2003 (2003-06-01), páginas 351-358, ISSN: 1470-2045, DOI: 10.1016/S1470-2045(03) 01115-X divulga generalmente la metilación de ADN como una diana terapéutica.

G STRATHDEE Y COLS: "Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions", EXPERT REVIEWS IN MOLECULAR MEDICINE, vol. 4, 1 de marzo de 2002 (2002-03-01), páginas 1-17, presenta estudios de metilación de ADN en cáncer que se abren a nuevas oportunidades para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de tumores humanos.

AHLQUIST TERJE Y COLS: "Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers", MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDRES, GB, vol. 7, nº 1, 31 de diciembre de 2008 (2008-12-31), página 94, ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/1476-4598-7-94 divulga marcadores epigenéticos que pueden discriminar entre tejido no maligno y maligno procedente del intestino grueso, es decir marcadores con potencial diagnóstico.

### Sumario de la invención

Según se describe posteriormente, la presente invención ofrece métodos para diagnosticar, detectar o caracterizar una neoplasia (cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de pulmón) ofreciendo *BNC1* y *ADAMTS1*. Ventajosamente, el método proporciona el cribado de suero para un incremento en la metilación del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* para identificar una neoplasia en fase inicial o una propensión a desarrollar una neoplasia.

En un aspecto, la invención proporciona un método in vitro para detectar o caracterizar una neoplasia en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación de un gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza la presencia de una neoplasia en la muestra, comprendiendo además el método opcionalmente la etapa de detectar una alteración en la secuencia o el nivel de expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR* y/o *EML-ALK4*, en donde la neoplasia es un cáncer seleccionado de cáncer de colon, pulmonar o pancreático y en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada.

En otro aspecto, la invención proporciona un método in vitro para detectar o caracterizar cáncer de pulmón o colon en una muestra derivada de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación de un gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza cáncer de pulmón o colon en el sujeto y que comprende además detectar una alteración en la secuencia o el nivel de expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *EGFR* (*pulmón*) y/o *EML-ALK4*, en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada. En otra realización, se identifica que el sujeto tiene propensión a desarrollar una neoplasia (p. ej., se identifica como fumador, tiene pólipos o adenomas de colon o antecedentes familiares de cáncer).

En otro aspecto, la invención proporciona un método in vitro para detectar o caracterizar cáncer pancreático en una muestra de suero o plasma derivada de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación del gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza cáncer pancreático en el sujeto, comprendiendo además la etapa de detectar una alteración en la secuencia o la expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2* y/o *DPC4* con relación a una referencia, en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada. En otra realización, el método implica además obtener imágenes del sujeto y localizar el cáncer. En una realización, se identifica que el sujeto tiene propensión a desarrollar un cáncer pancreático (p. ej., se identifica como fumador, tiene una mutación *Brca1* o *Brca2*, un quiste pancreático, pancreatitis crónica o antecedentes familiares de cáncer).

También se describe un método para el seguimiento de un sujeto diagnosticado de una neoplasia, implicando el método detectar una alteración en el nivel de metilación del promotor en un gen *BNC1* y *ADAMTS1* en una muestra de sujeto con relación a una referencia, donde un nivel alterado indica una gravedad alterada de neoplasia en el sujeto. En una realización, la referencia es el nivel de metilación presente en una muestra previamente obtenida del sujeto; es un nivel inicial de metilación presente en una muestra procedente del sujeto obtenida antes de la terapia; o es el nivel de metilación presente en una muestra de paciente normal. En otra realización, un nivel de metilación disminuido con relación a una referencia indica una gravedad reducida de la neoplasia, y un nivel de metilación incrementado con relación a una referencia indica una gravedad incrementada de la neoplasia.

También se describe un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una neoplasia, implicando el método detectar la metilación de un gen *BNC1* y *ADAMTS1*, donde la detección de la metilación indica que se debe seleccionar terapia epigenética para el tratamiento de dicho sujeto. En una realización, la terapia epigenética se selecciona del grupo que consiste en entinostat, SAHA (suberoilánilida de ácido hidroxámico), desipéptido, azocitidina y desazocitidina.

También se describe un estuche para el análisis de la metilación de un promotor, implicando el estuche al menos un cebador capaz de distinguir entre secuencias promotoras de *BNC1* y *ADAMTS1* metiladas y no metiladas. En una realización, el estuche contiene además un par de cebadores para amplificar la secuencia promotora de un gen de referencia. En otra realización, el estuche contiene además una sonda detectable, donde la sonda es capaz de unirse a la secuencia promotora. En otra realización más, la sonda se detecta mediante fluorescencia, mediante autorradiografía, mediante un inmunoensayo, mediante un ensayo enzimático o mediante un ensayo colorimétrico.

En otras realizaciones de los aspectos anteriores, la muestra biológica es una muestra de tejido o fluido biológico (p. ej., de sangre, suero, plasma, orina, jugo pancreático, fluido de quiste pancreático o lavado pulmonar). La referencia es el nivel de metilación presente en el promotor en una muestra de control. En otras realizaciones, la muestra de control se deriva de un sujeto sano. En otras realizaciones adicionales, la metilación se detecta mediante PCR cuantitativa específica para metilación (QMSP). En otras realizaciones, se cuantifica el nivel de metilación o se cuantifica la frecuencia de metilación. En otras realizaciones adicionales, se cuantifican los niveles de metilación de los promotores de *BNC1* y *ADAMTS1*. En otras realizaciones adicionales, el método da como resultado al menos 50% - 100% (p. ej., 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%) de sensibilidad. En otras realizaciones adicionales, se identifica que el sujeto tiene propensión a desarrollar una neoplasia (p. ej., es fumador, tiene una mutación *Brca1* o

Brca2, un quiste pancreático, pancreatitis crónica, presencia de pólipos o adenomas de colon o antecedentes familiares de cáncer). En diversas realizaciones, el método implica además detectar una alteración en la secuencia o el nivel de expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR* y/o *EML- ALK4*. En otras realizaciones adicionales, la alteración es una alteración de secuencia o una alteración en el nivel de expresión. En otras realizaciones adicionales, el sujeto es un paciente humano. En diversas realizaciones de los aspectos anteriores, la metilación se detecta o se cuantifica por la metilación sobre cuentas o PCR cuantitativa específica para la metilación.

La invención proporciona métodos para detectar o caracterizar una neoplasia en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación de un promotor de los genes *BNC1* y *ADAMTS1*.

#### Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton y cols., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2ª ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5ª Ed., R. Rieger y cols. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Según se usan en la presente, los siguientes términos tienen los significados asignados a ellos posteriormente, a menos que se especifique otra cosa.

Por "gen BNC1" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido BNC1. Una secuencia nucleotídica del gen BNC1 ejemplar está disponible públicamente en GeneBank N°: NM\_001717. Una secuencia ejemplar se proporciona posteriormente.

```

1  gcggcggggg  cggccatcgt  gctgcgcagc  ctgggcgctt  ggggagccgc  ccacttcgcc
61  gggctcgcgc  ccgacggccg  gagcgtggat  gcggcggcgc  ccgccgagcc  ggggaggagc
121  cggggcggcc  cgggccggg  agacgcgcgc  gcagccccgg  caccgcagcg  gtcgcaggat
181  ggccgaggct  atcagctgta  ctctgaactg  tagttgccaa  agtttcaaac  ccgggaaaat
241  aaaccaccgt  cagtgtgacc  aatgcaagca  tggatgggtg  gccacgctc  taagtaagct
301  aaggatcccc  ccatgtatc  caacaagcca  ggtggagatt  gtccagtc  atgtagtgtt
361  tgatattagc  agcctcatgc  tctatgggac  ccaggccatc  ccggttcgcc  taaaaatcct
421  actggaccgg  ctcttcagtg  tgttgaagca  agatgaggtt  ctccagatcc  tccatgcctt
481  ggactggaca  cttcaggatt  atatccgtgg  atacgtactg  caggatgcat  caggaaaggt

```

```

541  gttggatcac  tggagcatca  tgaccagtga  ggaagaagtg  gccaccttgc  agcagttcct
601  tcgttttgg  gagacaaat  ctatagtgtg  actcatggca  attcaagaga  aagaagagca
661  atccatcac  ataccacct  ccacagcaaa  tgtagatata  agggctttca  tcgagagctg
721  cagtcacagg  agttctagcc  tccccactcc  tgtggacaaa  ggaaacccca  gcagtataca
781  ccccttgag  aacctcataa  gcaacatgac  tttcatgctg  ctcttccagt  tcttcaacce
841  tctgcctcct  gactgatag  ggtcattgcc  cgaacaatat  atgttgagc  agggctcatg
901  ccaaagtcag  gaccccaaac  aggaagtcca  tgggcccttc  cctgacagca  gcttcttaac
961  ttccagttcc  acaccatttc  aggttgaaaa  agatcagttg  ttaaactgtc  cggatgctat
1021  tactaaaaaa  gaagacagca  cccatttaag  tgaactccagc  tcatacaaca  ttgtcactaa
1081  gtttgaagg  acacagttat  cccctgaggc  caaagtgaag  cctgagagga  atagccttgg
1141  tacaagaag  ggccgggtgt  tctgactgac  atgtgagaag  accttctatg  acaaaggcac
1201  cctcaaaatc  cactacaatg  ccgtccactt  gaagatcaag  cataagtcca  ccatcgaagg
1261  gtgtaacatg  gtgttcagct  cctaaggag  ccggaatcgc  catagcgcca  accccaacce
1321  tcggctgcac  atgccaatga  acagaaataa  ccgggacaaa  gacctcagga  acagcctgaa
1381  cctggccagc  tctgagaact  acaagtgcgc  aggtttcaca  gtgacgtccc  cagactgtag
1441  gcctcctccc  agctaccctg  gttcaggaga  ggattccaaa  ggccaaccag  ccttcccaaa
1501  cattgggcaa  aatggtgtgc  tttttcccaa  cctaaagaca  gtccagccag  tccctccttt
1561  ctaccgcagt  ccagccacgc  ctgccgaggt  agcaaacacg  cctgggatac  tccttccctt
1621  cccgctgttg  tcctcttcaa  tcccagaaca  gctcatttca  aacgaaatgc  catttgatgc
1681  ccttcccaag  aagaaatoca  ggaagtccag  tatgcctatc  aaaaatagaga  aagaagctgt
1741  ggaaatagct  aatgagaaaa  gacacaacct  cagctcagat  gaagacatgc  ccttacaggt
1801  ggtcagtgaa  gatgagcagg  aggctgcag  tcctcagtca  cacagagtat  ctgaggagca
1861  gcatgtacag  tcaggaggct  tagggaagcc  ttccctgaa  ggggagaggg  cctgccatcg

```

25

# ES 2 581 594 T3

```

1921 tgaatcagta attgagtoca gtggagccat cagccaaacc cctgagcagg ccacacacaa
1981 ttcagagagg gagactgagc agacaccagc attgatcatg gtgccaaagg aggtcgagga
2041 tgggtggccat gaacactact tcacacctgg gatggaaccc caagttcctt tttctgacta
2101 catggaactg cagcagcgcc tgctggctgg gggactcttc agtgctttgt ccaacagggg
2161 aatggctttt ccttgtcttg aagattctaa agaactggag cacgtgggtc agcatgcatt
2221 agcaaggcag atagaagaaa atcgcttcca gtgtgacatc tgcaagaaga cctttaaaaa
2281 tgctttagt gtgaaaattc atcacaagaa tatgcatgtc aaagaaatgc acacatgcac
2341 agtggagggc tgtaatgcta cctttccctc ccgaggagc agagacagac acagctcaaa
2401 cctaaacctc caccaaaaag cattgagcca ggaagcattg gagagtagtg aagatcattt
2461 ccgtgcagct taccttctga aagatgtggc taaggaagcc tatcaggatg tggcttttac
2521 acagcaagcc tcccagacat ctgtcatctt caaaggaaca agtogaatgg gcagctgtgt
2581 ttaccaata acgcaagtc acagtgccag cctggagagc tacaactctg gcccttgag
2641 cgagggcacc atcctggatt tgagcactac ctcgagcatg aagtcagaga gttagcagca
2701 ttcttctgg gactctgacg ggtgagtgga ggaaggcact gtgcttatgg aggacagtga
2761 tgggaactgt gaagggtcga gccttgtccc tggggaagat gagtacccca tctgtgtcct
2821 gatggagaag gctgaccaga gccttgtctg cctgccttct gggttgccc taacctgtca
2881 tctctgcca aagacataca gtaacaaagg gacctttagg gccactaca aaactgtgca
2941 cctccggcag ctccacaaat gcaaagtacc aggctgcaac accatgtttt cgtctgttcg
3001 cagtcgaaac agacacagcc agaatcccaa cctgcacaaa agcctggcct catctccaag
3061 tcacctccag taacaagatg gcaaaccaag tatgctcaga taagcttttt tcataattca
3121 ggaataaagt agtccataga aatgtttctg tttcatatca tttggggcga gtcaggcaaa
3181 agtatttgat ttgactttat agttttccac agcacaatga gcaaaagaca aacctcgtgg
3241 gaagatgaca ctggggcagc ccttccctatt atttttctta gcccaagagg tctttcactg
3301 atacaaggaa aacttgacaga aatgtgattt ttcccagatt tgtttacatg ttccctggga
3361 cagatccagg tctgcagatc gacaccagtg gcccaggac ctgggggtgg ctttaaatga
3421 ggcttgacgt gttaaaggtc ttggataaga agggctcctg ggaagaagac tctgtggaca
3481 agataccagt ccccaaaaca gcattttcag ttctttcttc aattagtttg aaactccagc
3541 ctgagtttgg aagactgatt ttttgagacc atccctgtgt ttggagtgga taattgtccc
3601 tcccctcagc cctgcaccag aggtctcata tgttacccca gggagtcttc agaggattgg
3661 gttggcctct aacatgttcc ttgttaattc ttgttctgta acatgcattc aagaagctag
3721 gggaaaaata tctcatgcac ttaataatg gtcttcaatt taatttaaaa atattttgac
3781 aatatttaat ttgtgcttat gtgggtgttg gtgtgagtgc agatattgca ctgtgtcacc
3841 tctggatctc tgctcagaag cagaacaagt gatgacctaa atgtcaaat cactgctcgt
3901 tttcatttgg tgaacttoaa actctgttct ttttggtcac ctgtggaatg aatgcaagca
3961 tgattttggc aggaacattt gtacatattc tgccgtagat aatgtggttc tgatggttgt
4021 tgtgtatttt cagtatcact ggatccctca gtcttcaccg ttttataaac gtataagatt
4081 aggatgaact tttgaattta cttggtagga aaaaaagtag gacattattg ccatattgta
4141 tgtcttaata ttttaacttat tcggaatat attccacact gttacataca ttttccatgg
4201 tagaaaaggaa gttcagtcag tcctgtggaa tgaaaccatc tctaaaatt cagcatttgc
4261 agcattctaa aagcctgtgt aggtacaagg acattgattt tgtattcaga attcaagtta
4321 actatctttt aaattcgtgg ttgatgtaag taataaaaaa cattcttaaa gttaggggtt
4381 ataagagaga ttatttctgt ggtctaaagg ttaaaaagcc aacaacctgt taccaattat
4441 ttcagctttt tttgttttaa taagtgtgac aacttaaaac ttgtttctat ttaaagtgaa
4501 atgtatcttt caactgttta gttaccagc tgtttaatat tccagtcttc ccaaagtgaa
4561 aagatttgta tacaaatggt tctatgatt taataaaaa atatggcaca ccaaaaaaaaa
4621 aaaaaaa

```

Por "promotor de *BNC1*" se entiende una secuencia polinucleotídica suficiente para dirigir la expresión de una secuencia codificante de *BNC1*. La secuencia de un promotor de *BNC1* ejemplar (*BNC1* en chr15:81715659-81744472) se proporciona posteriormente:

5

# ES 2 581 594 T3

## Región promotora de BNC1 1 kb aguas arriba del Exón 1

```
gtttccttttcaaggatccccaccagcagcaaggcaggtggaagaaactg
agggagaggaagcaggacccccgccccccccagctctagcctttacag
actccttttaaggagctgaagaggttgggagaggcttgccctgccccggg
gcagcagaaacccgggctgctgcagcagctgtgggctgctccgtcag
ctcctgggctccaggatcctgggcctcagcccctccgctctactctcg
gggccaccacctccagttggcttctccagggcacttcatttcattccgtc
cctagcatccaataagacgcgaaaaacttaatcccattttacaactgaag
ccactgaggcccagagagcaaagccatttgcctgggaaagtggtaagc
tgggactttgactcttcagaccaccaagggaaggggtgtgtgtgtgtgt
gtgtgtgtgtgtgcgtgtgagggtggggggcgttgttttgagttcttaag
aaaacctcctggcgaccccccttctccacatcccaagacgctcgtccgc
actttctcgggaatgaggtttctgcaggcagggcggcgtgccttcttc
ctccggcagtgagaccccgagggcgcgccagggtaggaggggagggcg
aatcatctcctgagaagagcgcagagaacttcagagcgtttcgccttc
cccgaggagaggcaaacaccgacagctctgtgtcttttaccacaagtgc
ttcaagcccggggggcagacacctccgcggccggccggcgaggtct
ccgaggctcggggggccagggcctcgcctcagctgcgtgatttagggc
gttatccggtcccggggcgggagggcgcctcccggggcggcgaagcagcgc
ccgaggcgtggggcgaccgcgggtggcggaggggcaggggagggggcg
gagagggcgtccccggggcagggggcggcgtgcgggcacacgcggctgc
```

## Exón 1 de BNC1

```
GCGGCGGGGGCGGCCATCGTGCTGCGCAGCCTGGGCGCTTGGGGAGCCGC
CCACTTCGCCGGTTCGCGCCCCGACGGCCGGAGCGTGGATGCGGCGGCGC
CCGCCGAGCCGGGGCGGACGCGGGGCGGCCCGGGCCCGGAGACGCGCCG
GCAGCCCCGGCACCGCAGCGGTTCGAGGATGGCCGAGgt aagcggcggcgc
```

- 5 Por "gen de *ADAMTS1*" se entiende una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína ADAMTS1. Una secuencia del gen *ADAMTS1* ejemplar está disponible públicamente en GeneBank N°: NM\_006988. Una secuencia del gen *ADAMTS1* ejemplar se proporciona posteriormente:

ES 2 581 594 T3

1 gcactcgcgtg gaaagcggct ccgagccagg ggctattgca aagccagggt gcgctaccgg  
 61 acggagaggg gagagccctg agcagagtga gcaacatcgc agccaaggcg gaggccgaag  
 121 aggggcgcca ggcaccaatc tccgcgttgc ctcagecccc gaggcgcccc agagegcttc  
  
 181 ttgtcccagc agagccactc tgccctgcgc tgccctctcag tgtctccaac tttgcgctgg  
 241 aagaaaaact tcccgcgcgc cggcagaact gcagcgcctc cttttagtga ctccgggagc  
 301 ttcggctgta gccggctctg cgcgcccttc caacgaataa tagaaattgt taattttaac  
 361 aatccagagc aggccaacga ggctttgctc tcccgaacct aactaaaggt ccctcgcctc  
 421 gtgcgctgct acgagcgggt tctcctgggg ctccaatgca gcgagctgtg cccgaggggt  
 481 tcggaaggcg caagctgggc agcgacatgg ggaacgcgga gcgggctccg gggctctcga  
 541 gctttgggccc cgtacccacg ctgctgctgc tcgccgcggc gctactggcc gtgtcggagc  
 601 cactcgggcg cccctccgag gaggcagagg agctagtggg gccggagctg gacgcgccc  
 661 cgggacacgg gaccacgcgc ctccgcctgc acgcctttga ccagcagctg gatctggagc  
 721 tgcggcccga cagcagcttt ttggcgcccg gcttcacgct ccagaacgtg gggcgcaaat  
 781 ccgggtccga gacgcgcctt ccggaaaccg acctggcgca ctgcttctac tccggcaccc  
 841 tgaatggcga tcccagctcg gctgccgccc tcagcctctg cgagggcgtg cgcgggcctc  
 901 ctctacctgt gggggaggcg tatttcatcc agccgctgcc cgcgcgccag gacgcctcg  
 961 ccaccgccgc cccaggggag aagccgcggg caccactaca gttccacctc ctgcggcgga  
 1021 atcggcaggg cgaagctcggc ggcaagctgc gggctcgtgga cgaagagccc cggccgactg  
 1081 ggaaagcggg gaccgaagac gaggacgaag ggactgaggg cgaggacgaa ggggctcagt  
 1141 ggtcgcgcga ggaccgcgca ctgcaaggcg taggacagcc cacaggaact ggaagcataa  
 1201 gaaagaagcg atttgtgtcc agtcaccgct atgtggaaac catgcttgtg gcagaccagt  
 1261 cgatggcaga attccacggc agtgggtctaa agcattacct tctcacgttg tttcgggtg  
 1321 cagccagatt gtacaaacac cccagcattc gtaattcagt tagcctgggtg gtgggtgaaga  
 1381 tcttggctcat ccacgatgaa cagaaggggc cggaaagtgc ctccaatgct gccctcactc  
 1441 tgcggaactt ttgcaactgg cagaagcagc acaaccacc cagtgaccgg gatgcagagc  
 1501 actatgacac agcaattctt ttcaaccagc aggacttgtg tgggtcccag acatgtgata  
 1561 ctcttgggat ggctgatggt ggaactgtgt gtgatccgag cagaagctgc tccgctatag  
 1621 aagatgatgg tttacaagct gccttcacca cagcccatga attaggccc gtgtttaaca  
 1681 tgcacatgta tgatgcaaag cagtgtgcca gccttaatgg tgtgaaccag gattcccaca  
 1741 tgatggcgct aatgctttcc aacctggacc acagccagcc ttgggtctcct tgcagtgct  
 1801 acatgattac atcatttctg gataatggtc atggggaatg tttgatggac aagcctcaga  
 1861 atcccataca gctcccagge gatctccctg gcaacctcgt cgatgccaac cggcagtgcc  
 1921 agtttacatt tggggaggac tccaaacact gccccgatgc agccagcaca tgtagcacc  
 1981 tgtggtgtac cggcacctct ggtggggtgc tgggtgtgca aaccaaacac tcccggtggg  
 2041 cggatggcac cagctgtgga gaagggaaat ggtgtatcaa cggcaagtgt gtgaacaaaa  
 2101 ccgacagaaa gcattttgat acgccttttc atggaagctg gggaaatgtg gggccttggg  
 2161 gagactgttc gagaacgtgc ggtggaggag tccagtacac gatgagggaa tgtgacaacc  
 2221 cgtcccacia gaatggagg aagtactgtg aaggcaaacg agtgcgctac agatcctgta  
 2281 accttgagga ctgtccagac aataatggaa aaacctttag agaggaacaa tgtgaagcac  
 2341 acaacagatt ttcaaaagct tcttttggga gtgggcctgc ggtggaatgg attcccaggt  
 2401 acgctggcgt ctcaacaaa gacaggtgca agctcatctg ccaagcacia ggcattggct  
 2461 acttcttctg tttgcagccc aaggtttag atggtactcc atgtagccca gattccacct  
 2521 ctgtctgtgt gcaaggacag tgtgtaaaag ctggtttaga tcgcatcata gactccaaa  
 2581 agaagtttga taaatgtggt gtttgcgggg gaaatggatc tacttgtaaa aaaatatcag  
 2641 gatcagttac tagtgcaaaa cctggatata atgatatcat cacaattcca actggagcca  
 2701 ccaacatcga agtgaaacag cggaccaga ggggatccag gaacaatggc agcttcttg  
 2761 ccatacaaagc tgctgatggc acatataatc ttaatggtga ctacactttg tccaccttag  
 2821 agcaagacat tatgtacaaa ggtgttctct tgaggtacag cggctcctct gcggcattgg  
 2881 aaagaattcg cagcttttagc cctctcaaag agcccttgac catccaggtt cttactgtgg  
 2941 gcaatgccct tcgacctaaa attaaataca cctacttctg aaagaagaag aaggaatctt  
 3001 tcaatgctat cccactttt tcagcatggg tcattgaaga gtggggcgaa tgttctaagt  
 3061 catgtgaatt gggttggcag agaagactgg tagaatgccg agacattaat ggacagcctg  
 3121 ctcccgagtg tgcaaaaggaa gtgaagccac ccagcaccag accttgtgca gaccatccct  
 3181 gcccccagtg gcagctgggg gagtgtctat catgttctaa gacctgtggg aagggtaca  
 3241 aaaaaagaag ctggaagtgt ctgtcccatg atggagggtt gttatctcat gagagctgtg  
 3301 atcctttaaa gaaacctaaa catttcatag acttttgca aatggcagaa tgcagttaag  
 3361 tggtttaagt ggtgttagct ttgagggcaa ggcaaaagtga ggaagggctg gtgcagggaa  
 3421 agcaagaagg ctggagggat ccagcgtatc ttgccagtaa ccagtgaggt gtatcagtaa  
 3481 ggtgggatta tgggggtaga tagaaaagga gttgaatcat cagagtaaac tgccagttgc  
 3541 aaatttgata ggatagttag tgaggattat taacctctga gcagtgatat agcataataa

```

3601 agccccgggc attattatta ttatttcttt tgttacatct attacaagtt tagaaaaaac
3661 aaagcaattg tcaaaaaaag ttagaactat tacaaccctt gtttcctggt acttatcaaa
3721 tacttagtat catggggggt gggaaatgaa aagtaggaga aaagtgagat tttactaaga
3781 cctgttttac ttacctcac taacaatggg gggagaaagg agtacaataa ggatctttga
3841 ccagcactgt ttatggctgc tatggtttca gagaatgttt atacattatt tctaccgaga
3901 attaaaactt cagattgttc aacatgagag aaaggctcag caacgtgaaa taacgcaaat
3961 ggcttcctct ttcttttttt ggaccatctc agtctttatt tgtgtaattc attttgagga
4021 aaaaaaactt ccatgtattt attcaagtgc attaaagtct acaatggaaa aaaagcagtg
4081 aagcattaga tgctggtaaa agctagagga gacacaatga gcttagtacc tccaacttcc
4141 tttctttcct accatgtaac cctgctttgg gaatatggat gtaaagaagt aacttgtgtc
4201 tcatgaaat cagtacaatc acacaaggag gatgaaacgc cggaaacaaa atgagggtgtg
4261 tagaacaggg tcccacaggt ttggggacat tgagatcact tgtcttgggt tggggaggct
4321 gctgaggggt agcaggtcca tctccagcag ctgggtccaac agtcgtatcc tgggtaatgt
4381 ctgttcagct cttctgtgag aatatgattt tttccatag tatatagtaa aatatgttac
4441 tataaattac atgtacttta taagtattgg tttgggtgtt cttccaaga aggactatag
4501 ttagtaataa atgcctataa taacatattt atttttatac atttatttct aatgaaaaaa
4561 acttttaaat tatatcgctt ttgtggaagt gcatataaaa tagagtattt atacaatata
4621 tgttactaga aataaaagaa cacttttggg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
    
```

5 Por "promotor de *ADAMTS1*" se entiende una secuencia polinucleotídica suficiente para dirigir la expresión de una secuencia codificante de *BNC1*. La secuencia de un promotor de *AdamTS1* ejemplar (*ADAMTS1* en chr21:27130477-27139599) se proporciona posteriormente:

Región promotora de *ADAMTS1* 1kb aguas arriba del exón 1

```

atttccttctttccccctctgcacgcttgctagccccagcgatcgctgct
ggccccgggtaggaaagtggggttcctggccgtttctgcgacgctggcc
tagggcttgacgctgctggttgagtgaagcacgcagactggcgggagccg
atcatttctcgaatgaagaagaaaaagcgaattccctcttatgctcta
gggaattgagcccgctcccagatcacccattccagaaatgtgaaaccggg
cctcacaaagtctgctctggtgaagaggtggcgtgcggggtgggggttg
gtggagggtgaaggcataagcaaacatattttaaataccagatcgtagga
agtgtcacctggccccctacccaggcatgctttctgggggaagcgcaggg
caaagctttccctagaaaaagctggggcgaagagagagcagcggcggtc
aggagctcctggcaggctgggaaggtggagaagtggggtgaggtatttt
ctagaaagtgtagccctagctcatctcctagattgggggaaggggaactg
aggaggagggaaggagaccagggcagctccaggatagggaatggtga
agaagggactgcttctccaaccgaacctccctcctgggaaaccgcagcc
cagcgcggttaactgagttaccgcaaccgggcggtggggagggaagggtgt
ccaggaaaaccggcgaggggagaaaaagcgggtggaaggagagctctctcct
ggagcggccccagcagtaaaaagtgctggtcacagcgcaccttccgcccc
tagattgacgagcagtgccgtggagccagcgcggaggctgccccctccc
ctcccgagcccgagcgcggagcgcggttagcaccaaccggagccggggg
cggcgtctttgggatggaaaaggccaaaaggaggaggtggggtgggggt
gggggttctcactggtccactataaaaggaccgctcggctgcccgttctt
    
```

Exón 1 de *ADAMTS1*

```

GCACTCGCTGGAAAGCGGCTCCGAGCCAGGGGCTATTGCAAAGCCAGGGT
GCGCTACCGGACGAGAGGGGAGAGCCCTGAGCAGAGTGAGCAACATCGC
AGCCAAGGCGGAGGCCGAAGAGGGGCGCCAGGCACCAATCTCCGCGTTGC
CTCAGCCCCGGAGGCGCCCCAGAGCGCTTCTTGTCCAGCAGAGCCACTC
TGCCTGCGCCIGCCTCTCAGTGTCTCCAACITTCGCTGGAAGAAAAACT
TCCCGCGCGCCGAGAACTGCAGCGCCTCCTTTTAGTGACTCCGGGAGC
TTCGGCTGTAGCCGGCTCTGCGCGCCCTTCCAACGAATAATAGAAATTGT
    
```

TAATTTTAACAATCCAGAGCAGGCCAACGAGGCTTTGCTCTCCCGACCCG  
 AACTAAAGGTCCCTCGCTCCGTGCGCTGCTACGAGCGGTGCTCCTGGGG  
 CTCCAATGCAGCGAGCTGTGCCCGAGGGGTTCCGAAGGCGCAAGCTGGGC  
 AGCGACATGGGGAACGCGGAGCGGGCTCCGGGGTCTCGGAGCTTTGGGCC  
 AGTACCCACGCTGCTGCTGCTGCTGCGCGCGGCGCTACTGGCCGTGTCGGACG  
 CACTCGGGCGCCCTCCGAGGAGGACGAGGAGCTAGTGGTGGCCGAGCTG  
 GAGCGCGCCCGGGACACGGGACCACGCGCCTCCGCTGCACGCCTTTGA  
 CCAGCAGCTGGATCTGGAGCTGCGGCCCGACAGCAGCTTTTTGGCGCCCG  
 GCTTCACGCTCCAGAACGTGGGGCGCAAATCCGGGTCCGAGACGCGCCT

Por "alteración" se entiende un incremento o una disminución. Una alteración puede ser tan poco como 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, o en 40%, 50%, 60%, o incluso tanto como 75%, 80%, 90% o 100%. Una alteración puede ser un cambio en la secuencia con relación a una secuencia de referencia o un cambio en el nivel de expresión, la actividad un marcador epigenético (p. ej., metilación de un promotor o alteraciones de histonas).

Por "muestra biológica" se entiende cualquier tejido, célula, fluido u otro material derivado de un organismo.

En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado asignado a ellos en la ley de patentes de EE. UU. y puede significar "incluye", "que incluye" y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente" tiene asimismo el significado asignado en la ley de patentes de EE. UU. y el término es abierto, permitiendo la presencia de más de lo que se cita con tal de que las características básicas o nuevas de lo que se cita no se cambien por la presencia de más de lo que se cita, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, la ausencia o la cantidad del analito que se va a detectar.

Por "agresividad clínica" se entiende la gravedad de la neoplasia. Las neoplasias agresivas son más propensas a metastatizarse que las neoplasias menos agresivas. Aunque los métodos de tratamiento conservativos son apropiados para las neoplasias menos agresivas, las neoplasias más agresivas requieren regímenes terapéuticos más agresivos.

Por "control" se entiende un estándar de comparación. Por ejemplo, el nivel de metilación presente en un promotor en una neoplasia se puede comparar con el nivel de metilación presente en ese promotor en un tejido normal correspondiente.

Por "diagnóstico" se entiende cualquier método que identifique la presencia de una afección patológica o caracterice la naturaleza de una afección patológica (p. ej., una neoplasia). Los métodos diagnósticos difieren en su sensibilidad y especificidad. Aunque un método diagnóstico particular no pueda proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

Por "frecuencia de metilación" se entiende el número de veces que un promotor específico se metila en un número de muestras.

Por "metilación incrementada" se entiende un cambio positivo detectable en el nivel, la frecuencia o la cantidad de la metilación. Tal incremento puede ser en 5%, 10%, 20%, 30%, o en tanto como 40%, 50%, 60%, o incluso en tanto como 75%, 80%, 90% o 100%. En ciertas realizaciones, la detección de cualquier metilación en un promotor de *AdamTS1* y *BNC* en una muestra de sujeto es suficiente para identificar que el sujeto tiene una neoplasia, una lesión precancerosa o propensión a desarrollar una neoplasia.

Por "polinucleótido aislado" se entiende un ácido nucleico (p. ej., un ADN) que está libre de genes que, en el genoma presente en la naturaleza del organismo del que se deriva la molécula de ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector; en un plásmido o virus que se replica autónomamente; o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un ADNc genómico o fragmento de ADNc producido mediante PCR o digestión con endonucleasas de restricción) independiente de las otras secuencias. Además, el término incluye una molécula de ARN que se transcribe a partir de una molécula de ADN, así como un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

Por "nivel de metilación" se entiende el número de alelos metilados. El nivel de metilación se puede representar como la metilación presente en un gen diana/gen de referencia x 100. Cualquier relación que permita que el experto distinga tejido neoplástico de tejido normal es útil en los métodos de la invención. Un experto en la técnica aprecia que el valor de corte se selecciona para optimizar tanto la sensibilidad como la especificidad del ensayo. En ciertas realizaciones, meramente detectar la metilación del promotor de los genes *BNC1* y *AdamTS1* en una muestra biológica de un sujeto es suficiente para identificar que el sujeto tiene cáncer, una lesión precancerosa o que tiene propensión a desarrollar cáncer.

- 5 Por "perfil del marcador tumoral" se entiende una alteración presente en una muestra de sujeto con relación a una referencia. En una realización, un perfil de marcador tumoral incluye la metilación de un promotor de los genes *BNC1* y *AdamTS1*, así como mutaciones presentes en *Brca1*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, EGFR, EML- ALK4 u otro marcador conocidos en la técnica.
- 10 Por "sensibilidad" se entiende el porcentaje de sujetos con una enfermedad particular que se detecta que tienen la enfermedad. Por ejemplo, un ensayo que detecta 98/100 de carcinomas tiene 98% de sensibilidad.
- 15 Por "gravedad de la neoplasia" se entiende el grado de patología. La gravedad de una neoplasia se incrementa, por ejemplo, a medida que se incrementa el estadio o el grado de la neoplasia.
- 20 Por "especificidad" se entiende el porcentaje de sujetos sin una enfermedad particular que dan negativo en la prueba.
- 25 Por "neoplasia" se entiende cualquier enfermedad que esté provocada por o dé como resultado niveles de división celular inapropiadamente altos, niveles de apoptosis inapropiadamente bajos o ambos. Por ejemplo, el cáncer es un ejemplo de una neoplasia. Ejemplos de cánceres incluyen, sin limitación, cáncer pancreático, incluyendo células de los islotes y adenocarcinomas, cánceres duodenales, colangiocarcinomas, tumores ampollares, leucemias (p. ej., leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia verdadera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no hodgkiniana), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rdbomiosarcoma, carcinoma colorrectal, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinomas neuroendocrinos, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de la vejiga urinaria, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma). Se considera que los trastornos linfoproliferativos también son enfermedades proliferativas.
- 35 Por "periódico" se entiende a intervalos regulares. El seguimiento periódico del paciente incluye, por ejemplo, un esquema de pruebas que se administran diariamente, bisemanalmente, bimensualmente, mensualmente, bianualmente o anualmente.
- 40 Por "promotor" se entiende una secuencia de ácido nucleico suficiente para dirigir la transcripción. En general, un promotor incluye, al menos, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1.000, 1.500 o 2.000 nucleótidos aguas arriba de una secuencia codificante dada (es decir aguas arriba de la secuencia codificante para los polipéptidos BNC1 y ADAMTS1).
- 45 Por "marcador" se entiende cualquier proteína o polinucleótido que tenga una alteración en la metilación, el nivel de expresión o la actividad que está asociada con una enfermedad o un trastorno.
- 50 Por "reduce" se entiende una alteración negativa de al menos 10%, 25%, 50%, 75% o 100%.
- 55 Por "referencia" se entiende un estado estándar o de control. Referencias ejemplares incluyen un valor inicial de la metilación presente en un sujeto de control sano o una curva estandarizada.
- 60 Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subgrupo de o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de un ADNc o una secuencia génica de longitud completa, o el ADNc o la secuencia génica completos. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia tendrá generalmente al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 25 aminoácidos, y aún más preferiblemente aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será generalmente al menos aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 75 nucleótidos, y aún más preferiblemente aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 nucleótidos o cualquier número entero cercano o entre los mismos.
- 65

Por "sujeto" se entiende un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, un ser humano o un mamífero no humano, tal como un bóvido, un équido, un cánido, un óvido o un felino.

5 Se entiende que los intervalos proporcionados en la presente son abreviados para la totalidad de los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

10 Según se usan en la presente, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntomas asociados con el mismo. Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o una afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados con los mismos se eliminen completamente.

15 A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, se entiende que los términos "un(a)", "uno" y "el(la)" son singulares o plurales.

20 A menos que se indique específicamente o sea obvio a partir del contexto, según se usa en la presente, el término "aproximadamente" se entiende como dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor indicado. A menos que quede clara otra cosa del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en la presente están modificados por el término aproximadamente.

25 Cualesquiera métodos proporcionados en la presente se pueden combinar con uno o más de cualquiera de los otros métodos proporcionados en la presente.

### Breve descripción de los dibujos

30 Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran un diagrama esquemático, un gel y un gráfico de barras, respectivamente. La Figura 1A ilustra un esquema que es una representación por etapas del método de cribado usado para identificar biomarcadores epigenéticos. La Figura 1B ilustra los resultados del análisis de metilación de 8 genes específicos de cáncer en líneas celulares de cáncer pancreático. M=señal de metilación; U=señal no metilada. IVD= ADN metilado in vitro. ddH<sub>2</sub>O=control de agua sin añadir ADN. La Figura 1C es un gráfico de barras que presenta las frecuencias de metilación de los 8 genes en una serie de pacientes con cáncer pancreático procedentes de JHU (fase 1-4; n=143), junto con una serie de páncreas normales procedentes de pacientes no cancerosos (n=4) y una serie de neoplasia intraductal pancreática (PanIN) (n=20 que varía de Pan IN 1-3).

40 Las Figuras 2A, 2B y 2C ilustran geles de metilación de promotores y los correspondientes gráficos de barras, un diagrama de metilación de CpG y un esquema que ilustra una tecnología de metilación sobre cuentas (MOB), respectivamente. La Figura 2A muestra silenciar los genes *BNC1* y *ADAMTS1* en líneas celulares de cáncer pancreático mediante un análisis de PCR específica para metilación (MSP) de las regiones promotoras de los genes *BNC1* y *ADAMTS1* (panel superior que ilustra bandas de gel) y la correlación de la metilación del promotor con la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa) en líneas celulares de cáncer pancreático (panel inferior que muestra datos en un formato de gráfico de barras. M=señal de metilación; U=señal no metilada. IVD= ADN metilado in vitro. La expresión por RT-PCR en tiempo real se muestra como cambio en número de veces  $\pm$  EE con relación a células tratadas simuladamente durante tratamientos con 5-aza-desoxicitidina (DAC) 5  $\mu$ M y Trichostatin A (TSA) 300 nM. La Figura 2B muestra los resultado del análisis de secuenciación con bisulfito de islas de CpG en la región promotora del gen *BNC1*. La región promotora de *BNC1* se ilustra como una línea, con regiones CpG indicadas como barras verticales. TIS indica el sitio de inicio de la transcripción. Localización de sitios de CpG (cebadores de bisulfito (BST): región aguas arriba desde -331 hasta +36 con relación al sitio de inicio de la transcripción). Análisis por secuenciación con bisulfito del gen *BNC1* en Panc1 (línea celular de cáncer pancreático), tejido de páncreas normal, tumores primarios pancreáticos y HCT116 (DNMT1/3b<sup>-/-</sup>) como un control negativo. Los círculos abiertos y rellenos representan sitios CpG no metilados y metilados, respectivamente, y cada fila representa un clon individual. La Figura 2C muestra la ilustración por etapas del nanoensayo usado para detectar la metilación en suero. La extracción y la conversión con bisulfito de ADN se llevan a cabo usando metilación sobre cuentas (MOB). El ADN se eluye usando tampón de PCR y se amplifica usando cebadores modificados por MSP y NTP etiquetados con fluoróforos. Las muestras se analizan usando MS-qFRET o electroforesis en gel.

50 La Figura 3 ilustra gráficas que muestran los resultados del análisis por MSP cuantitativo (qMSP) de *BNC1* y *ADAMTS1* usando PCR en tiempo real. La Figura 3 muestra una frecuencia estadísticamente incrementada de la metilación cuando se compara tejido de páncreas normal con cánceres invasivos. La Figura 3 también muestra que la metilación de *BNC1* se podía detectar en las fases más tempranas de la carcinogénesis pancreática (p. ej. PanIN) en comparación con la metilación de *ADAMTS1*. Páncreas normal (n=4 tejidos normales, n=10 tejidos normales

circundantes) y muestras de pancreatitis (n=30), PanIN (n=20) y tumor (fase 2; n=12), respectivamente. La MSP en tiempo real se muestra como un cambio en el número de veces para la señal metilada con relación a la señal no metilada. En el análisis de MSP, se muestran para cada muestra señales para ADN no metilado (U) y metilado (M). La barra horizontal indica la media.

5 Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran ensayos de formación de colonias, cuadros y gráficos de barras de Panc1, y cuadros y gráficos de barras de MIA-PaCa2, respectivamente. La Figura 4A muestra la formación de colonias por células Panc1 y MIA-PaCa2 transfectadas con pcADN3.1 o *BNC1*-pcADN3.1 y desarrolladas durante 2 semanas en medio que contiene G418. Los resultados se representan como los números de colonias medios con relación a transfectantes de pcADN3.1 en tres experimentos independientes (Panc1; \*p=0,0275, MIA-PaCa2; \*p=0,0294). La  
 10 Figura 4B muestra gráficos que resumen un ensayo de proliferación celular en células Panc1, mientras que la Figura 4C muestra datos análogos para células MIA-PaCa. Las Figuras 4A y 4B se dividen cada una en un panel derecho, un panel medio y un panel izquierdo, que ilustran datos pertinentes para células Panc1 y MIA-PaCa, respectivamente. Panel derecho: células Panc1 transfectadas con *BNC1* (*BNC1*-pcADN3.1) se compararon con células de control transfectadas con vector vacío (pcADN3.1). Los resultados se presentan como en número medio de células en tres experimentos independientes diferentes (Panel; \*p=0,0469; 72 h, \*\*p=0,0086; 96 h: MIA-PaCa2, \*p=0,0469; 48 h, \*p=0,0318; 72 h, \*p=0,0389; 96 h). Panel medio: Proliferación celular medida mediante incorporación de 3H-timidina (Panc1; \*p=0,0286, MIA-PaCa2; \*p=0,0256). Panel izquierdo: Invasión de células Panc1 y MIA-PaCa2 a través de Transwells revestidos con Matrigel con relación a células de control transfectadas con vector vacío en tres experimentos independientes (NS: no significativo estadísticamente).

## 20 Descripción detallada de la invención

La invención presenta métodos que son útiles para identificar a un sujeto que tiene o tiene propensión a desarrollar neoplasia (cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de pulmón).

25 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la detección de la metilación del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* era útil para identificar con alta sensibilidad las fases más tempranas de cánceres de páncreas. Notablemente, la detección de la metilación del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* en ADN en circulación en suero era útil para la detección temprana de cáncer de pulmón, colon y pancreático, especialmente en individuos de alto riesgo. Por otra parte, *BNC1* es un gen supresor de tumores en el cáncer pancreático que es inactivado por la metilación del promotor.

30 Se usó un transcriptoma del genoma completo para identificar nuevas alteraciones de la metilación de ADN específicas del cáncer en carcinoma pancreático. Se analizaron las frecuencias de metilación para los genes, *BNC1* y *ADAMTS1*, mediante PCR específica para la metilación y PCR cuantitativa específica para la metilación, así como análisis de expresión mediante PCR en tiempo real e inmunohistoquímica. Se usó una nueva tecnología de metilación sobre cuentas permitida por nanopartículas para detectar cánceres pancreáticos en fase muy temprana. El papel biológico del gen *BNC1* se examinó mediante ensayos de formación de colonias, proliferación celular e invasión en líneas celulares de cáncer pancreático. Este análisis condujo a la identificación de *BNC1* (91,8%) y *ADAMTS1* (66,7%) como genes que mostraban una alta frecuencia de metilación en tejidos con cáncer de páncreas (n=143). *BNC1* se metilaba frecuentemente en las fases más iniciales de la carcinogénesis de páncreas incluyendo carcinoma in situ o neoplasia intraepitelial pancreática PanIN3 (100%) y cánceres invasivos en fase 1 (97,4%). Usando el ensayo ultrasensible de MOB permitida por nanopartículas, estas alteraciones se detectaron en muestras de suero de pacientes con cáncer de páncreas, con una sensibilidad para *BNC1* de 79% (IC 95%: 0,6-0,8) y para *ADAMTS1* de 48% (IC 95%: 0,3-0,6) (n=42 cánceres, Fases 1-4), mientras que la especificidad era 88% para *BNC1* (IC 95%: 0,6-0,9) y 92% para *ADAMTS1* (IC 95%: 0,7-0,9) entre 26 individuos sin cáncer. La sobreexpresión de *BNC1* en líneas celulares de cáncer pancreático mostraba un efecto sorprenden mediante formación de colonias y proliferación celular, pero no invasión.

### Cáncer pancreático

50 El cáncer pancreático es un cáncer mortal con una tasa de supervivencia total a los 5 años de menos de 5% y sin mejoras en la supervivencia a lo largo de las 3 últimas décadas. El cáncer pancreático se clasifica actualmente con la cuarta causa principal de muerte relacionada con el cáncer en los Estados Unidos con 42.470 nuevos casos y 35.240 muertes estimados en 2009 y su incidencia es creciente. Uno de los principales factores atribuidos al terrible pronóstico del cáncer de páncreas es el diagnóstico retardado de la enfermedad. Sólo aproximadamente 10% de los casos son susceptibles de resección quirúrgica curativa potencial. Sin embargo, la supervivencia a largo plazo de 5 años se puede alcanzar con pacientes seleccionados con cáncer pancreático en fase inicial que se pueden someter a resección quirúrgica curativa. Por lo tanto, se cree que la detección precoz del cáncer pancreático es la mejor modalidad para mejorar la supervivencia en esta enfermedad mortal. Sin embargo, no está disponible ninguna prueba de cribado para la detección del cáncer pancreático.

El cáncer pancreático se caracteriza por múltiples cambios genéticos y epigenéticos. En los últimos años se ha hecho evidente que el cáncer pancreático es tanto una enfermedad de epigenética desregulada como una enfermedad de mutación genética.

- 5 En particular, los cambios en los patrones de metilación de promotor de ADN probablemente representan un papel crucial en la tumorigénesis y la progresión del cáncer. A fin de atender la necesidad tanto de diagnóstico clínico como de terapias, muchos estudios han empleado metilación de ADN de genes específicos para la aplicación en el diagnóstico de múltiples cánceres. Estas pruebas de diagnóstico se pueden usar en principio para la detección temprana de cánceres, para valorar un pronóstico y para terapias como predictores de respuesta a la terapia. La detección temprana de la enfermedad da como resultado un desenlace clínico mejorado para la mayoría de los tipos de cáncer ((Jemal A y cols. (2011) Cancer Statistics, 2010. CA Cancer J Clin. mar-abr; 61(2):133-4). Por lo tanto, se ha invertido mucho esfuerzo en el desarrollo de tecnologías de cribado eficaces para estrategias de detección temprana.

#### Cribado para el cáncer

- 15 Idealmente, los métodos para el cribado del cáncer deben ser fáciles de realizar, rentables, no invasivos y proporcionar beneficio a los paciente. Los métodos actuales de cribado para el cáncer pancreático son inadecuados. Por ejemplo, los ultrasonidos endoscópicos se han mostrado prometedores para identificar pacientes de alto riesgo, pero requieren acceso a centro especializados y son una modalidad costosa e invasiva que se necesita repetir a intervalos frecuentes. La presente invención proporciona ventajas significativas sobre las tecnologías de cribado existentes para cáncer pancreático y otros. Significativamente, la invención proporciona métodos para detectar la metilación de *BNC1* y *ADAMTS1*. Un incremento de la metilación en *BNC1* y *ADAMTS1* se asocia con todas las fases del cáncer pancreático. El gen *BNC1* se metilaba con una frecuencia de 100% en PanIN3, que se cree que el la penúltima etapa antes del desarrollo de un carcinoma invasivo.

- 25 De forma interesante, *BNC1* mostraba un papel supresor potencial según mide por la supresión de la formación de colonias, la proliferación celular y la invasión en células de cáncer pancreático. La metilación de *BNC1* y *ADAMTS1* mostraba alta sensibilidad y especificidad para detectar cáncer pancreático en sueros usando la tecnología basada en metilación nanopermítida denominada metilación sobre cuentas (MOB). Los resultados presentados aquí posteriormente indican que el cribado basado en metilación es útil para identificar sujetos con riesgo no solo de cáncer pancreático, sino también de cánceres de pulmón y colon usando una modalidad económica no invasiva.

- 30 Aunque los métodos de la invención son adecuados para cribar la población sin limitación, es particularmente útil para cribar sujetos que se identifica que tienen un riesgo incrementado de tener una neoplasia. Sujetos que se identifica que tienen un riesgo incrementado de neoplasia (cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon) incluyen pero no se limitan a fumadores y sujetos que tienen una mutación *Brca1* o *Brca2*. Sujetos que se identifica que tienen un riesgo incrementado de cáncer pancreático incluyen sujetos que se identifica que tienen quistes pancreáticos o pancreatitis, así como pacientes que tienen antecedentes familiares de cáncer pancreático, particularmente en 1 o 2 parientes.

#### Tipos de muestras biológicas

- 40 El nivel de metilación de promotor en cada uno de los genes identificados en la presente (es decir, *BNC1* y *ADAMTS1*) se puede medir en diferentes tipos de muestras biológicas. En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero. En otra realización, la muestra es una muestra de tejido que incluye células de un tejido u órgano (p. ej., células pancreáticas, células de un quiste pancreático o una lesión del páncreas, células pulmonares y células de colon). El tejido pancreático se obtiene, por ejemplo, de una biopsia del páncreas.
- 45 En otra realización, la muestra biológica es una muestra de fluido biológico (p. ej., sangre, suero sanguíneo, plasma, orina, heces, fluido de quiste pancreático, fluido procedente del conducto pancreático mayor/menor (es decir, "jugo pancreático"), lavado pulmonar, heces, esputos, o cualquier otro fluido biológico útil en los métodos de la invención).

#### Metilación sobre cuentas

- 50 En resumen, la metilación sobre cuentas es un método en un solo tubo para la extracción y la conversión con bisulfito de polinucleótidos que proporciona un método rápido y muy eficaz para la extracción de ADN, el tratamiento con bisulfito y la detección de la metilación de ADN usando partículas superparamagnéticas de sílice (SSP). Todas las etapas se ponen en práctica sin centrifugación o secado al aire lo que proporciona rendimientos superiores con relación a métodos convencionales para la extracción y la conversión con bisulfito de ADN. Las SSP sirven como un sustrato sólido para la unión de ADN a través de las múltiples fases de cada procedimiento. Específicamente, las SSP se usan en primer lugar para capturar ADN genómico de muestras biológicas en crudo, muestras biológicas procesadas o células cultivadas. A continuación, se lleva a cabo tratamiento con bisulfito sódico en presencia de SSP sin transferencias de tubos. Finalmente, el ADN tratado con bisulfito se analiza para determinar el estado de metilación. Se encontró que el rendimiento de extracción de ADN era de 5-20 veces el rendimiento de la extracción

convencional. Se recuperó 90% del ADN de entrada después del tratamiento con bisulfito. Además, el procedimiento total de metilación sobre cuentas se completó en menos de 6 horas cuando se comparaba con 3 días para métodos convencionales. De ahí que la metilación sobre cuentas permita una detección de la metilación cómoda, eficaz y libre de contaminación en un solo tubo u otra plataforma de reacción. Métodos para llevar a cabo la metilación sobre cuentas son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en el documento PCT/US2009/000039.

FRET de puntos cuánticos específica para la metilación

Si se desea, los métodos de la invención se pueden combinar ventajosamente con transferencia de energía de resonancia de puntos cuánticos específica para la metilación (MS-qFRET). Véase, por ejemplo, el documento PCT/US2009/000039. La MS-qFRET proporciona la detección cualitativa y cuantitativa de ADN metilado, así como la detección de ADN metilado de baja abundancia. En esta técnica, se usan puntos cuánticos para capturar amplicones de PCR (MSP) específicos para la metilación y para determinar el estado de metilación a través de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Deseablemente, la MS-qFRET tiene bajo ruido de fondo intrínseco, alta resolución y alta sensibilidad. La MS-qFRET detecta tan poco como 15 pg de ADN metilado en presencia de un exceso de 10.000 veces de alelos no metilados, permite el uso reducido de PCR (8 ciclos) y permite el análisis múltiple.

Más específicamente, ADN tratado con bisulfito se amplifica a través de PCR, en donde el cebador directo se biotinila y el cebador inverso se etiqueta con un fluoróforo orgánico. A continuación, se introducen puntos cuánticos (QD) conjugados a estreptavidina para capturar los productos de PCR etiquetados a través de unión de estreptavidina-biotina, poniendo los QD (que sirven como donantes) y los fluoróforos (que sirven como aceptores) en estrecha proximidad que permite que se produzca la FRET. Finalmente, los productos de PCR se detectan mediante emisiones de fluoróforos acompañadas por desactivación de los QD. La información espectral se procesa para determinar el nivel de metilación de ADN. Las respuestas de fluorescencia se miden usando un fluoroespectrómetro.

Se pone en marcha PCR con cebadores etiquetados. A continuación, los productos se someten a purificación por PCR (Qiagen Corporation) a fin de recuperar un producto de PCR que esté libre de cebadores, dímeros de cebadores, Taq y dNTP. Para la conjugación con los puntos cuánticos (Invitrogen Corporation), 1 µl de NaCl 100 mM se mezcla con 7 µl de mezcla para PCR. Se añade a esta mezcla 1 µl de H<sub>2</sub>O desionizada (DI). Finalmente, se añade 1 µl de QD 1 nM y la mezcla se deja en reposo durante 15 minutos.

Se obtienen mezclas de niveles de metilación definidos que varían de 100%, 75%, 50%, 25% y 1% de los 150 ng totales de ADN de entrada. Para cuantificar el nivel de metilación, se define una "puntuación q": una puntuación que se basa en las eficacias de FRET normalizadas de la emisión de los aceptores y los donantes en MS-qFRET. En cualquier procedimiento de FRET, a medida que se incrementa el nivel de la emisión de los aceptores, también se incrementa la reducción de la emisión de los donantes. La eficacia de FRET se puede calcular a continuación basándose en el formalismo de la relación de proximidades,

$$E = \frac{I_A}{I_A + I_D}$$

(correspondiendo  $I_D$  e  $I_A$  a la intensidad de los donantes y los aceptores). Además, la puntuación q se determinó al normalizar la E calculada para la mezcla de ADN hasta una concentración apropiada de IVD sólo como un control metilado (puntuación q = 1) y NL sólo y como un control no metilado (puntuación q = 0). Al incluir controles positivos y negativos en cada ensayo, se crea una curva estándar a fin de cuantificar y comparar niveles de metilación de muestras desconocidas usando ciclos de baja amplificación.

Ensayos de diagnóstico

La presente invención proporciona un número de ensayos de diagnóstico que son útiles para la identificación o la caracterización de una neoplasia (cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon). En una realización, la neoplasia se caracteriza por cuantificar o determinar el nivel de metilación de los siguientes promotores: *BNC1* y *ADAMTS1* en la neoplasia. En una realización, los niveles de metilación se determinan usando PCR cuantitativa específica de metilación (QMSP) para detectar la metilación de CpG en ADN genómico. La QMSP usa bisulfato sódico para convertir citosina no metilada en uracilo. Una comparación de ADN tratado con bisulfato sódico y no tratado proporciona la detección de citosinas metiladas.

Aunque los ejemplos proporcionados posteriormente describen métodos para detectar niveles de metilación usando QMSP, el experto aprecia que la invención no se limita a tales métodos. Los niveles de metilación son cuantificables mediante cualquier método estándar, tales métodos incluyen, pero no se limitan a, PCR en tiempo real, transferencia Southern, secuenciación de ADN genómico con bisulfito, PCR con enzimas de restricción, MSP (PCR específica para la metilación), extensión de un solo cebador nucleotídico sensible a la metilación (MS-SNuPE) (véase, por ejemplo, Kuppuswamy y cols., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 1143-1147, 1991), microchip de ADN basado en fluorescencia o etiquetaje isotópico (véanse, por ejemplo, Adorján Nucleic Acids Res., 30: e21 y Hou Clin. Biochem., 36:197-202, 2003), espectroscopía de masas, ensayos de capacidad aceptora de metilo y unión de anticuerpos

específica para la metilación. Véanse además las Patentes de EE. UU. Nº: 5.786.146, 6.017.704, 6.300.756 y 6.265.171.

Los cebadores usados para la amplificación del ácido nucleico que contiene CpG en el espécimen, después de la modificación con bisulfito, distinguen específicamente entre ADN no tratado y no modificado, ADN metilado y no metilado. Los cebadores específicos para la metilación para el ADN no metilado tienen preferiblemente una T en el par CG 3' para distinguirlo de la C retenida en el ADN metilado, y el complemento está diseñado para el cebador antisentido. Los cebadores específicos para la metilación contienen habitualmente relativamente pocas C o G en la secuencia ya que las C estarán ausentes en el cebador de sentido y las G ausentes en el cebador antisentido (la C se modifica hasta U (uracilo) que se amplifica como T (timidina) en el producto de amplificación).

Los cebadores abarcan oligonucleótidos de suficiente longitud y secuencia apropiada de modo que proporcionen un inicio específico de la polimerización sobre un número significativo de ácidos nucleicos en el locus polimórfico. Específicamente, el término "cebador", según se usa en la presente, se refiere a una secuencia que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente más de tres y lo más preferiblemente más de 8, secuencia que es capaz de iniciar la síntesis de un producto de extensión con cebador que sustancialmente es complementario a una hebra de un locus polimórfico. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor para la polimerización. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, el tampón y la composición de los nucleótidos. El cebador oligonucleotídico contiene típicamente entre 12 y 27 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Los cebadores se diseñan para ser "sustancialmente" complementarios a cada hebra del locus genómico que se va a amplificar e incluyen los nucleótidos G o C apropiados según se analiza anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus hebras respectivas bajo condiciones que permitan que el agente para la polimerización actúe. En otras palabras, los cebadores deben tener suficiente complementariedad con las secuencias de flaqueo 5' y 3' para hibridarse con las mismas y permitir la amplificación del locus genómico. Aunque en la presente se proporcionan cebadores ejemplares, se entiende que cualquier cebador que se hibride con las secuencias dianas de la invención es útil en el método de la invención para detectar un ácido nucleico metilado.

En una realización, los cebadores específicos para la metilación amplifican una diana genómica deseada usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A continuación, el producto amplificado se detecta usando métodos estándar conocidos en la técnica. En una realización, un producto de PCR (es decir, un amplicón) o un producto de PCR en tiempo real se detecta mediante unión a una sonda. En una realización, la unión a la sonda genera una señal fluorescente, por ejemplo, al acoplar una molécula de colorante fluorogénico y un resto desactivador a sustratos oligonucleotídicos iguales o diferentes (p. ej., TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU. de A.), Molecular Beacons (véase, por ejemplo, Tyagi y cols., Nature Biotechnology 14(3):303-8, 1996), Scorpions® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE. UU. de A.)). En otro ejemplo, se detecta un producto de PCR mediante la unión de un colorante fluorogénico que emite una señal fluorescente durante la unión (p. ej., SYBR® Green (Molecular Probes)). Tales métodos de detección son útiles para la detección de un producto de PCR específico para la metilación.

El nivel de metilación de los promotores *BNC1* y *ADAMTS1* descritos en la presente define el perfil de metilación de una neoplasia. El nivel de metilación presente en cualquier promotor particular se compara con una referencia. En una realización, la referencia es el nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia. En otra realización, la referencia es un nivel de metilación inicial presente en una muestra biológica derivada de un paciente antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia. En otra realización más, la referencia es una curva estandarizada.

El nivel de metilación de los promotores descritos en la presente (*BNC1* y *ADAMTS1*) se usa, solo o en combinación con otros métodos estándar, para caracterizar la neoplasia. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo métodos para detectar la metilación de los promotores *BNC1* y *ADAMTS1* antes de o simultáneamente con una prueba con respecto a alteraciones en otros biomarcadores, tales como un gen o polipéptido *BRCA1*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR*, *EML-ALK4*. En una realización, la alteración en un gen *Brca1*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR*, *EML-ALK4* es una mutación en la secuencia del gen con relación a una referencia. En otras realizaciones, la alteración es en el nivel de expresión o actividad del gen o polipéptido *Brca1*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR*, o *EML-ALK4*. Una vez que se identifica que un sujeto tiene metilación incrementada del promotor *BNC1* y *ADAMTS1*, se puede llevar a cabo una prueba de diagnóstico adicional para localizar la patología en un órgano o sistema de órganos particular. Típicamente, después de que se haya identificado que el sujeto tiene un incremento en la metilación del promotor en *BNC1* y *ADAMTS1*, se pueden llevar a cabo estudios de obtención de imágenes. Tales estudios incluyen, pero no se limitan a, ultrasonidos endoscópicos, MRI, barrido CT y barrido PET.

Si se desea, los métodos de diagnóstico de la invención se pueden combinar con métodos de diagnóstico convencionales para determinar el estadio o el grado de una neoplasia. La graduación se usa para describir cuán anormales o agresivas parecen las células neoplásicas, mientras que la estadificación se usa para describir el alcance de la neoplasia. El grado y el estadio de la neoplasia es indicativo del pronóstico (es decir, respuesta

probable al tratamiento y supervivencia) a largo plazo del paciente. Así, los métodos de la invención son útiles para predecir el pronóstico del paciente, y para seleccionar un curso de tratamiento.

5 En métodos de diagnóstico convencionales, un patólogo observará una muestra de tejido procedente del tumor y determinará el grado basándose en nivel de patología observado. Típicamente, los tumores pancreáticos se gradúan de 1-4. Para un tumor de grado I, las células presentes en la muestra son las más similares a células pancreáticas normales. Las muestras de grado 4 contienen células que son las más distintas a células pancreáticas normales. Las neoplasias de alto grado son las más mortales debido a que son las más agresivas y de crecimiento más rápido. Las neoplasias de alto grado típicamente se mueven hacia tejidos circundantes, tales como los ganglios linfáticos y los huesos.

10 Estadio se refiere al alcance de un cáncer. En el cáncer pancreático, por ejemplo, un método de clasificación del estadio divide el cáncer en cuatro categorías, el cáncer pancreático en estadio I se encuentra solamente en el propio páncreas o se ha empezado a extender a los tejidos contiguos al páncreas (tales como el intestino delgado, el estómago o el conducto biliar). El cáncer pancreático en estadio II se ha extendido a órganos cercanos tales como el estómago, el bazo o el colon, pero no ha entrado en los ganglios linfáticos. El cáncer pancreático en estadio III se ha extendido a los ganglios linfáticos próximos al páncreas. El cáncer se ha extendido a órganos cercanos. El cáncer pancreático en estadio IV se ha extendido a órganos próximos al páncreas (estadio IVA) o a órganos alejados del páncreas (estadio IVB). El cáncer pancreático en estadio IVA se ha extendido a órganos que están cerca del páncreas (tales como el estómago, el bazo o el colon) pero no se ha extendido a órganos distantes (tales como el hígado o los pulmones). El cáncer pancreático en estadio IVB se ha extendido a órganos distantes (tales como el hígado o los pulmones).

#### Selección de un método de tratamiento

25 La identificación de la presencia de un incremento en la metilación del promotor en *BNC1* y *ADAMTS1* indica que el sujeto tiene probablemente un cáncer invasivo o una lesión precancerosa (p. ej., cáncer in situ). Se puede llevar a cabo una prueba de diagnóstico adicional para localizar la patología a un órgano o sistema de órganos particular. Por ejemplo, se pueden usar ultrasonidos endoscópicos, MRI, barrido CT, barrido PET., broncoscopia, colonoscopia, esofagogastroduodenoscopia, cirugía laparoscópica para localizar la lesión o cualquier otra modalidad conocida en la técnica para caracterizar la neoplasia o la lesión precancerosa (p. ej., PanIN, o condiciones pulmonares precursoras tales como displasia, carcinoma in situ, hiperplasia adenomatosa atípica o lesiones colónicas precursoras tales como adenomas). Es probable que las lesiones precancerosas sean sensibles a métodos de tratamiento conservativo. Métodos de tratamiento conservativos incluyen, por ejemplo, vigilancia del cáncer, que implica la vigilancia periódica del paciente usando los ensayos de diagnóstico de la invención, solos o en combinación, con diagnóstico por imagen o quimioprevención.

30 Las neoplasias más agresivas son menos sensibles a métodos de tratamiento conservativos. Para neoplasias agresivas, se debe seleccionar un método de tratamiento agresivo. Los regímenes terapéuticos agresivos incluyen típicamente una o más de las siguientes terapias: resección quirúrgica, terapia de radiación y quimioterapia. Después de que un sujeto sea diagnosticado de una neoplasia (p. ej., cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon) se selecciona un método de tratamiento. Cuando los métodos de la invención identifican que un sujeto tiene una neoplasia asociada con un incremento en la metilación del promotor en *BNC1* y *ADAMTS1*, se puede seleccionar una terapia para reducir esta metilación del promotor. Por ejemplo, se puede seleccionar terapia epigenética para aliviar la metilación del promotor en *BNC1* y *ADAMTS1*. Tal terapia epigenética puede implicar el uso de inhibidores de histona desacetilasa o inhibidores de la metilación. Agentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, entinostat, SAHA (suberoilánilida de ácido hidroxámico), depsipéptido (Fujisawa Pharmaceuticals), azocitidina, desazocitidina, romidepsina (Istodax), Vorinostat, análogos de poliamina, zebularina y otros nuevos fármacos emergentes que se dirigen a la metilación, cambios de histona en todo el complejo de polipeptido. La terapia epigenética se puede combinar con terapias más convencionales.

#### Seguimiento de pacientes

50 Los métodos de diagnóstico de la invención también son útiles para observar el curso de una lesión precancerosa en un paciente o para valorar la eficacia de un régimen terapéutico. En una realización, los métodos de diagnóstico de la invención se usan periódicamente para realizar un seguimiento de los niveles de metilación de *BNC1* y *ADAMTS1*. En un ejemplo, la neoplasia se caracteriza usando un ensayo de diagnóstico de la invención antes de administrar la terapia. Este ensayo proporciona un valor inicial que describe el nivel de metilación de uno o más promotores o el perfil de metilación de la neoplasia antes del tratamiento. Se administran ensayos de diagnóstico adicionales durante el curso de la terapia para realizar un seguimiento de la eficacia de un régimen terapéutico seleccionado. Una terapia se identifica como eficaz cuando un ensayo de diagnóstico de la invención detecta una disminución en los niveles de metilación en uno o más promotores con relación al nivel de metilación inicial.

## Estuches

Se describen estuches para el diagnóstico o el seguimiento de una neoplasia en una muestra biológica obtenida de un sujeto. En diversas realizaciones, el estuche incluye al menos un cebador o una sonda cuya unión distingue entre una secuencia promotora *BNC1* y *ADAMTS1* metilada y una no metilada, junto con instrucciones para usar el cebador o la sonda para identificar una a neoplasia. En otra realización, el estuche comprende además un par de cebadores adecuados para el uso en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otra realización más, el estuche comprende además una sonda detectable. En otra realización más, el estuche comprende además un par de cebadores capaces de unirse a y amplificar una secuencia de referencia. En otras realizaciones adicionales, el estuche comprende un recipiente estéril que contiene el cebador o la sonda; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, sacos, blísteres u otra forma de recipiente adecuada conocida en la técnica. Tales recipientes pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel estratificado, papel metalizado u otros materiales adecuados para mantener ácidos nucleicos. Las instrucciones incluirán generalmente información acerca del uso de los cebadores o las sondas descritos en la presente y su uso para diagnosticar una neoplasia. Preferiblemente, el estuche comprende además uno cualquiera o más de los reactivos descritos en los ensayos de diagnóstico descritos en la presente. En otras realizaciones, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del cebador o la sonda; métodos para usar los materiales empaquetados para el diagnóstico de una neoplasia; precauciones; advertencias; indicaciones; estudios clínicos o de investigación; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente sobre el recipiente (cuando estén presentes), o como una etiqueta aplicada al recipiente, o como una hoja, un folleto, una tarjeta o una carpeta separado suministrados en o dentro del recipiente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están totalmente dentro de la competencia del experto. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller y Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, se pueden considerar al elaborar y poner en práctica la invención. Técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se analizarán en las secciones que siguen.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de genes candidatos a la metilación de un promotor específico para el cáncer en hipermetiloma de páncreas

A fin de identificar nuevos marcadores de metilación de ADN para el cáncer pancreático, se usó un cribado por microchip de transcriptomas humanos enteros previamente establecido para identificar genes silenciados por hipermetilación de promotores. Para identificar cambios en la expresión génica dependientes de hipermetilación globales en el cáncer pancreático, se realizó un enfoque basado en microchip de expresión del genoma completo en cuatro líneas celulares cáncer pancreático humano diferentes (PL45, MIA-PaCa2, Panc1 y Capan 1) con una estrategia farmacológica usando 5-aza-desoxicitidina y Trichostatin A (TSA) usando metodología basada en microchip estándar (p. ej. Agilent Technologies 44K). Como se observa en la Figura 1A, se identificó inicialmente un total de 1.427 genes únicos en cuatro líneas celulares, que cumplían los criterios para genes hipermetilados candidatos en las líneas celulares de cáncer pancreático.

A fin de identificar genes que solo mostraban metilación específica para el cáncer, se usaron los siguientes criterios de validación experimentales: 1) el gen se expresaba en tejido de páncreas normal, 2) el gen presentaba ninguna/poca metilación en tejidos pancreáticos normales (tejidos libres de cáncer) y 3) el gen se metilaba frecuentemente en líneas celulares de cáncer de páncreas, y también se observaba metilación en tumores primarios. Basándose en estos criterios, se identificaron 8 genes (*TFPI2*, *ASCL2*, *BNC1*, *TWIST1*, *BNIP3*, *ADAMTS1*, *PNMT*, y *EVL*) que presentaban metilación específica para el cáncer en cánceres pancreáticos.

Ejemplo 2: biomarcadores de metilación *BNC1* y *ADAMTS1*-ADN para la detección precoz de cáncer pancreático

A continuación, se examinó el estado de metilación de estos 8 genes (*TFPI2*, *ASCL2*, *BNC1*, *TWIST1*, *BNIP3*, *ADAMTS1*, *PNMT* y *EVL*) en una gran serie de muestras de tumor pancreático primario (n=143; Estadios 1-4) usando PCR específica para la metilación (véase la Tabla 1).

**Tabla 1.** Información clínica de muestras de tumor primario de pacientes con cáncer de páncreas en este estudio

	Tumores Primarios de Páncreas					
	Normal (n=4)	PanIN (N=20)	Estadio 1 (N=38)	Estadio 2 (N=78)	Estadio 3 (N=5)	Estadio 4 (N=2)
<b>Supervivencia Mediana (meses)</b>		No Met	43,0	18,0	14,1	19,6
<b>Género</b>						
<b>Masculino</b>	3(75%)	9 (45%)	9(23,7%)	44 (57%)	1 (20%)	2 (100%)
<b>Femenino</b>	1925%)	11 (55%)	29(76,3%)	34 (43%)	4 (80%)	0,0%
<b>Grado</b>						
Bien Moderadamente Escasamente		9 (45%)	3 (7,9%)	4 (5,1%)	1 (20%)	0(0%)
		8 (40%)	23 (60,5%)	41 (52%)	4 (40%)	1 (50%)
		3 (15%)	12 (31,6%)	33 (42,9%)	4 (40%)	1 (50%)

5 Como se muestra en la Figura 1B, el gen más frecuentemente metilado era *BNC1* (90,5%), seguido por *ADAMTS1* (66,7%), *TWIST1* (66,7%), *ASCL2* (53,79%), *BNIP3* (49%), *TFPI2* (53,7%,) *EVL* (46,3%) y *PNMT* (26,5%). De forma interesante, dos de los genes que demostraban una metilación frecuente en este grupo de muestras de cáncer pancreático primario, *BNC1* (90,5%) y *ADAMTS1* (66,7%), también mostraban una metilación frecuente en las lesiones precursoras de cáncer pancreático, lesión por neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN). Específicamente, la frecuencia de metilación de *BNC1* era 70% (n=14/20) y la frecuencia de metilación de *ADAMTS1* era 25% (n=5/20).

10 La capacidad para identificar lesiones precursoras de alto grado tales como PanIN3 (o carcinoma pancreático in situ) representa uno de los mejores medios para alcanzar una detección precoz del cáncer pancreático, y facilita la puesta en práctica de estrategias de quimioprevención (véase la Figura 1C). *BNC1* se metiló en PanIN 1 (56%), PanIN 2 (75%) y PanIN 3 (100%) durante el avance de PanIN. Estos datos indican que la metilación de ADN del gen *BNC1* es un episodio inicial en la carcinogénesis pancreática y que el predominio de la metilación se incrementa con el avance del cáncer pancreático.

15 Este cribado de hipermetilomas de genoma completo se basa en un enfoque farmacológico que usa 5-desoxiazacitidina y TSA, que ha mostrado una excelente correlación entre la metilación de ADN del promotor y la inhibición de la expresión y la reexpresión génica después del tratamiento con un fármaco desmetilador de ADN, tal como 5-desoxiazacitidina, en estudios previos sobre el cáncer de mama y colorrectal. Aquí, se probó la metilación del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1*, y se correlacionó con una falta de expresión génica en líneas celulares de cáncer pancreático (Panc1, MIA-PaCa2, Capan1 y PL45) usando RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) (Figura 2A, panel superior). Ambos genes mostraban expresión génica endógena virtualmente indetectable (o nula/baja) y reexpresión significativa después del tratamiento con 5-desoxiazacitidina. Según se muestra en la Figura 2A, el panel inferior, tratamiento con un inhibidor de histona desacetilasa, tal como TSA, daba como resultado una reexpresión mínima, excepto en el caso de PL45, que se puede regular tanto mediante la metilación de ADN del promotor como mediante modificaciones de histona. La metilación de la isla CpG asociada al promotor en el promotor *BNC1* se detectó mediante análisis de secuenciación con bisulfito en una línea celular de cáncer pancreático (Panc1), una muestra de cáncer de páncreas primario (estadio 2) y tejido pancreático normal. Según se muestra en la Figura 2B, el análisis de secuenciación con bisulfito mostraba una metilación densa en la línea celular de cáncer pancreático y el cáncer pancreático primario y una metilación mínima/nula en muestras de páncreas normal de acuerdo con el análisis de PCR específico para la metilación.

20 Ejemplo 3: Detección de la metilación de ADN en suero de pacientes con cáncer pancreático usando la tecnología de metilación sobre cuentas

25 La detección precoz de la enfermedad da como resultado un desenlace clínico mejorado para muchos tipos de cáncer. Esto es particularmente importante para el cáncer pancreático, que es poco accesible y difícil de diagnosticar. Por consiguiente, 90% de los pacientes con cáncer pancreático presentan enfermedad metastásica o regional avanzada. Basándose en estudios de metilación, *BNC1* y *ADAMTS1* han surgido como importantes biomarcadores para la detección temprana del cáncer pancreático. Para determinar si la metilación del ADN del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* se podía detectar en sueros de pacientes con cáncer pancreático, se usó un ensayo nanopermitido muy sensible, denominado metilación sobre cuentas, que se desarrolló para mejorar la sensibilidad de la detección de la metilación (véase, p. ej., la Figura 2C). Para probar la utilidad de la metilación sobre cuentas como una herramienta para la detección precoz de cánceres pancreáticos, se probaron muestras de suero de una serie de pacientes con cáncer pancreático (n=42; estadios 1-4), así como un grupo de muestras de suero sano

normal (n=26). La sensibilidad se determinó basándose en la suposición de que todos los pacientes con cáncer estaría metilados para ambos genes, mientras que los voluntarios normales sanos estarían desmetilados para ambos genes. La metilación se analizó en 42 muestras de suero de pacientes con cáncer pancreático y 26 voluntarios normales. 33 de los 42 pacientes con cáncer pancreático mostraban metilación para *BNC1*, mientras que 20 de los 42 mostraban metilación para *ADAMTS1* (véase la Tabla 2).

En general, para todos los estadios incluidos, se determinó que la sensibilidad para *BNC1* y *ADAMTS1* era 78,6% y 47,6%, respectivamente. La sensibilidad de detección de cánceres pancreáticos en estadio I era 90% para ambos genes. Entre las 26 muestras de suero normal, 3 de los voluntarios normales mostraban metilación para *BNC1* mientras que 2 mostraban metilación para *ADAMTS1*. Se determinó que la especificidad de detección era 88,4% para *BNC1* y 92,4% para *ADAMTS1*. Los resultados computados se han presentado usando un intervalo de confianza de 95% y se presentan con detalle en la Tabla 2. Los resultados en el tumor correspondiente eran superiores para ambos genes, con 100% de sensibilidad y especificidad para *BNC1* y 79,2% de sensibilidad y 100% de especificidad para *ADAMTS1*.

Adicionalmente, también se probaron la sensibilidad y la especificidad de *BNC1* y *ADAMTS1* en otros tipos de cáncer, incluyendo tanto cáncer de colon como cáncer de pulmón (Tabla 2). Estos datos mostraban que *BNC1* también se usó como un biomarcador útil para la detección estadios iniciales de cáncer de colon. Por ejemplo, *BNC1* mostraba una sensibilidad de 84,6% (n=11/13) para cánceres de colon en estadio 1 y adenomas avanzados. De forma similar, *BNC1* también mostraba buena sensibilidad para la detección de cáncer de pulmón en estadio inicial ya que el cáncer de pulmón en estadio 1 se detectaba con una sensibilidad de 75% (n=12/16).

**Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de genes *BNC1* y *ADAMTS1* en muestras de suero de pacientes con diversos cánceres**

		<i>BNC1</i>		<i>ADAMTS1</i>	
<b>Tipos de Cáncer:</b>					
<b>Cáncer pancreático</b>		<b>Sensibilidad (%)</b>			
Estadio	N	Valor Estimado	IC 95%	Valor Estimado	IC 95%
I	10	90,0% (9/10)		90,0% (9/10)	
II-IV	32	75,0% (24/32)		34,4% (11/32)	
Total	42	78,6% (33/42)	60-90%	47,6% (20/42)	40-70%
<b>Cáncer de colon</b>		<b>Sensibilidad (%)</b>			
Estadio		Valor Estimado	IC 95%	Valor Estimado	IC 95%
Adenomas, estadio I	13	84,6% (11/13)		61,5% (8/13)	
II-III	15	66,7% (10/15)		73,3% (11/15)	
Otro cáncer *	2	100,0% (2/2)		50,0% (1/2)	
Total	30	76,7% (23/30)	70-90%	66,7% (20/30)	40-70%
<b>Cáncer de pulmón</b>		<b>Sensibilidad (%)</b>			
Estadio		Valor Estimado	IC 95%	Valor Estimado	IC 95%
I	16	75,0 % (12/16)		62,5% (10/16)	
II-III	4	100,0% (4/4)		100,0% (4/4)	
Total	20	80,0 % (16/20)	60-90%	70,0% (14/20)	50-90%
<b>Normal</b>					
<b>Especificidad</b>	26	88,4%	70-90%	92,4%	70-90%

IC: Intervalo de confianza.

\*otras enfermedades malignas colorrectales.

Se recogió y analizó un subgrupo de muestras de tejido de pacientes diagnosticados con enfermedades pancreáticas no cancerosas, tales como pancreatitis. Los pacientes con pancreatitis crónica pueden tener un riesgo incrementado de cáncer pancreático y, entre los pacientes con cáncer pancreático, 5% o más de los pacientes tienen pancreatitis crónica subyacente. Las afecciones inflamatorias crónicas incrementan probablemente la frecuencia de metilación como un defecto de práctico que puede incrementar entonces el riesgo de una enfermedad maligna posterior. La metilación de ADN de *BNC1* y *ADMATS1* se comparó entre diferentes afecciones (normal, pancreatitis, PanIN y cánceres invasivos) usando un análisis de PCR cuantitativa específica para la metilación.

Según se muestra en la Figura 3, *BNC1* y *ADAMTS1* mostraban una frecuencia de metilación estadísticamente incrementada cuando se comparaban con tejidos de páncreas normales y cánceres invasivos ( $p < 0,0001$ ; tanto *BNC1* como *ADAMTS1*), así como pancreatitis crónica y cánceres invasivos ( $p < 0,0001$ , tanto *BNC1* como *ADAMTS1*). Había una baja frecuencia de metilación de *BNC1* y *ADAMTS1* presente en una enfermedad no cancerosa, tal como pancreatitis. De forma más interesante, había una diferencia cuantitativa significativa entre PanIN y cánceres invasivos en ambos genes ( $p < 0,001$  tanto *BNC1* como *ADAMTS1*). Sin embargo, se podía detectar metilación de *BNC1* en los estadios iniciales de carcinogénesis pancreática tal como PanIN, en comparación con la metilación de *ADAMTS1* (véase la Figura 3), indicando que la metilación de *BNC1* es un episodio muy temprano, y que la metilación de *ADAMTS1* es un episodio tardío durante el desarrollo del cáncer de páncreas.

#### 10 **Ejemplo 4: Efectos supresores de tumores de la sobreexpresión del gen *BNC1* en células de cáncer pancreático**

Según los datos de metilación en pacientes con cáncer pancreático, *BNC1* es un biomarcador de la metilación de ADN en pacientes con cáncer pancreático. Para determinar si *BNC1* representaba un papel como un supresor de tumores en células de cáncer pancreático, se realizaron ensayos de formación de colonias in vitro para determinar los efectos de *BNC1* de longitud completa transfectado en células Panc1 y MIA-PaCa2 que carecen de expresión de *BNC1*. En comparación con células de control transfectadas con vector vacío, la sobreexpresión de un gen *BNC1* de longitud completa inducía una reducción de casi 2,2 veces (Panc1) y 9 veces (MIA-PaCa2) de colonias resistentes a G418 (véase la Figura 4A). Además, había una disminución de 75% (Panc1) y 81% (MIA-PaCa2) en la proliferación celular según se medía por la actividad de [<sup>3</sup>H]-timidina (Figura 4B y 4C; panel izquierdo y medio). Sin embargo, la sobreexpresión del gen *BNC1* no tenía efecto sobre la migración y la invasión de células Panc1 y MIA-PaCa2 a través de membranas Transwell revestidas con Matrigel en comparación con células de control transfectadas con vector vacío (Figura 4B y 4C; panel derecho). Tomados conjuntamente, estos datos indican que el gen *BNC1* tiene efectos supresores de tumores en células de cáncer pancreático humano.

En este estudio, se usó el perfilado de expresión génica de genoma completo usando un enfoque farmacológico (5-desoxi-azacitidina y TSA) en líneas celulares de cáncer pancreático, una plataforma que se ha usado para identificar un marcador de detección precoz para el cáncer colorrectal. Se ha usado la definición de hipermetiloma de ADN ya que permite la identificación no solo de nuevos candidatos a biomarcadores de metilación de ADN, sino también de candidatos a genes supresores de tumores en muchos tipos de cánceres (colon, mama, ovárico, etc.). Los biomarcadores de metilación de ADN identificados facilitarán el diagnóstico, y también contribuyen a la terapia como predictores de respuesta a la terapia.

La escasa accesibilidad del páncreas junto con la presentación tardía de síntomas ha frustrado intentos de detección a tiempo de una enfermedad maligna, y ha contribuido a las altas tasas de mortalidad del cáncer pancreático, que es la cuarta principal causa de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres. Por lo tanto, el desarrollo de biomarcadores de cáncer del cáncer pancreático es la mayor esperanza para una detección precoz.

Según se presenta en la presente anteriormente, la metilación de promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* es un excelente biomarcador de detección precoz para el cáncer pancreático. *BNC1* y *ADAMTS1* no se han descrito como un biomarcador de metilación de ADN en cánceres pancreáticos, aunque se han presentado metilados en cánceres de pulmón.

El cribado con una tecnología de alta sensibilidad nanobasada permitía la detección sensible y específica de cáncer pancreático en sus estadios más iniciales. Usar *BNC1* y *ADAMTS1* proporcionaba la detección de estadios muy tempranos de carcinoma pancreático, con una sensibilidad global de 83,7% (IC 95%; 74,2- 90,3%) y una especificidad de 84,6% (IC 95%; 64,3-95,0%). Significativamente, la sensibilidad alcanzada en este estudio es superior que la presentada previamente para marcadores de hipermetilación séricos. La presente invención proporciona un enfoque rentable para cribar individuos que se identifica que tienen factores de riesgo para cáncer pancreático en la población general. Adicionalmente, el método de detección por metilación sobre cuentas nanobasado reducía significativamente la cantidad de suero necesaria para el análisis. La invención proporciona un paradigma para el cribado amplio para cánceres pancreáticos usando una sola prueba en sangre.

En conclusión, este es el primer estudio en describir la utilidad de la metilación del promotor de *BNC1* y *ADAMTS1* como biomarcadores en suero de pacientes con cáncer pancreático usando tecnología permitida por nanopartículas. Además, este es el primer informe en demostrar un papel supresor de tumores para *BNC1* en el cáncer pancreático. Estos datos indican que la metilación del promotor *BNC1* es útil como una modalidad de preselección no invasiva sensible y específica para diagnosticar a sujetos que tienen cáncer e identificar a individuos con riesgo de cáncer pancreático.

Los resultados presentados anteriormente en la presente se llevaron a cabo usando los siguientes métodos y materiales.

## Análisis de la expresión génica con microchips

Se recogió ARN total de células en fase logarítmica usando métodos estándar (p. ej. con TRIzol (Invitrogen™) y el estuche RNeasy (Qiagen™) según las instrucciones del fabricante), incluyendo una etapa de digestión con DNasa. El ARN se cuantificó usando un espectrofotómetro (p. ej. el NanoDrop™ ND-100 (<http://www.nanodrop.com/>)) seguido por la valoración de la calidad con una plataforma de análisis microfluídico (p. ej. el Agilent™ 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, <http://www.agilent.com/>). Las concentraciones individuales de ARN para muestras individuales eran mayores de 200 ng/1 l, con relaciones 28S/18S mayores de 2,2 y una integridad de ARN de 10 (10 puntuado como lo más alto). Se llevaron a cabo procedimientos de amplificación y etiquetado de las muestras usando métodos estándar (p. ej. Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies™) según las instrucciones del fabricante). El ARNc etiquetado se purificó usando columnas giratorias (p. ej. el miniestuche RNeasy (Qiagen™)) y se cuantificó. Se añadieron controles de calibración de ARN (Agilent Technologies™) a muestras de ARN antes de la amplificación. Muestras (0,75 lg) etiquetadas con Cy3 o Cy5 se mezclaron con dianas de control (Agilent Technologies™), se montaron en un oligomicrochip, se hibridaron y se procesaron según el protocolo de microchips de Agilent. El escaneo se realizó con un escáner de microchips (Agilent™ G2565BA, usando los ajustes recomendados). El análisis de datos se efectuó como se presenta previamente (Schuebel K, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, y cols., Comparing the ADN hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer.2007, PLOS Genetics, 3(9):1709-1723..

## Muestras de los pacientes y población de estudio

Las muestras de los pacientes se prepararon a partir de muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) de pacientes con cáncer pancreático adquiridas de los archivos patológicos del Johns Hopkins Hospital según todas las normas y regulaciones del Institutional Review Board (IRB) y en cumplimiento de HIPAA. Un total de 167 pacientes se analizó en el estudio actual. La cohorte del Johns Hopkins consistía en 143 muestras de tejido de pacientes con cáncer pancreático con enfermedad de estadio 1 a estadio 4 que se habían sometido a cirugía primaria y otro tratamiento para el cáncer pancreático en el JHH desde 1998 hasta 2009 (Revisión mediana de 6,4 años). Los pacientes de esta cohorte eran similares en estadio con respecto al género, la proporción de casos con invasión linfocelular y el grado patológico (Tabla 1). Se obtuvieron 20 muestras de tejido FFPE adicionales de pacientes que se habían sometido a resección quirúrgica pero diagnosticados de lesiones precancerosas, neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN). Finalmente, se obtuvieron 4 muestras de tejido FFPE de los archivos patológicos de pacientes que se habían sometido a resección pancreática sin anomalía apreciada con un examen a simple vista o microscópico.

## Muestras de suero de pacientes con cáncer pancreático

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes de individuos con cáncer pancreático antes de someterse a tratamiento quirúrgico en el JHH después de obtener consentimiento informado desde 2007 hasta 2009. Se sacaron muestras de tumores de cotejo de los archivos patológicos del Johns Hopkins Hospital según todas las normas y regulaciones del Institutional Review Board (IRB) y en cumplimiento de HIPAA. Se probó un total de 36 muestras de suero, 23 de las cuales tenían tejido FFPE de cotejo disponible. También se obtuvieron muestras de suero de paciente de individuos con cánceres de páncreas (42 muestras, Estadios 1-4), colon (30 muestras, Estadios 1-3 y adenomas) y pulmón (20 muestras, Estadios 1-3) antes de someterse a tratamiento quirúrgico en el JHH después de obtener consentimiento informado. Adicionalmente, se obtuvieron 26 muestras de suero de voluntarios sanos normales para servir como controles.

## Cultivo celular y tratamiento

Las líneas de cultivo de cáncer (líneas celulares de cáncer de páncreas; Panc1, MIA-PaCa2, PL45, Capan1, Bxpc3, Capan2, PK9, Aspc1, PK8 y PL3) se obtuvieron de ATCC y se cultivaron en medios apropiados y bajo condiciones descritas por ATCC, con medios obtenidos de InVitrogen™, complementados con 10% de suero bovino fetal (Gemini Bio-Products) y 1% de penicilina/estreptomina (InVitrogen™). Se cultivaron células DKO (células de cáncer de colon HCT116 con ruptura genética de *DNMT1* y *DNMT3b*) como se describe previamente (Rhee y cols., 2002, Nature).

## Análisis de metilación de ADN y RT-PCR para el análisis de la expresión

Los pares de cebadores se diseñaron preferentemente cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS) putativo en las islas 5' CpG de los genes. Las secuencias de los cebadores para el análisis de PCR específico para la metilación se diseñaron usando MSPPrimer (<http://www.mspprimer.org>). Todas las secuencias de los cebadores se listan en la Tabla 3. Para estudios de expresión que usan RT-PCR, los cebadores se diseñaron usando el programa de acceso abierto Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.www.cgi>).

Tabla 3: Cebadores usados para MSP, RT-PCR, análisis de secuenciación con bisulfito

Genes	Cebadores	S(5-3)	AS(5-3)
ADAMTS1	No met	tATTGtAAAGttAGGGTtGtGtAttGGAAtG	aaaaCTaAaaCAACaCaaAaATTaaTaCCTaaCa
	Met	ttAGGGTGCGtTAtCGGAC	TaAaaCAACGCGaAaATTaaTaCCTaaCG
	RT	tcgaagtgaacagcggaac	gccgctgtacctcaagacaa
ASCL2	No met	tGtTAGGGGAtAGtGtGttAGttAGTtGtG	CaTACaCaTaaCaCaTaaCTCACaaaaAaCATCa
	Met	GAtAGCGCGttAGttAGTCGC	TaaCGCGTaaCTCACGaaaAaCATCG
BNC1	No met	TTtGttTTtttGGGAGAG GtAAAtAttGAtAtG	aaAaACCTCaCCaaCaaCCaaCa
	Met	GtttTTttCGGGAGAGGtAAAtAtCGAtAC	CCGaCGaCCGaCG
	RT	acaaaagcctggcctcatct	tcgccccaatgatatgaaa
	Bisulfito		
	Secuenciación	AATtAtTtTGAGAAGAGYGtAGAGAAtT	CCCAaCRCCCAaaCTaC
BNI P3	No met	ttAtGtttTgTtAtGtGtAGGtttAAGTtGtG	aCTCCaaACTaAaCaaAaCCCCa
	Met	GtACGCGtAG GtttAAGTCGC	CCGaACTaAaCGaAaCCCCG
EVL	No met	GTGTGTTTTTTTTTTGAGGATTGGAGTTGTTTG	ACCACCAAAAAATAAAAAACAAAAACAAACCA
	Met	GAGGATTCGGAGTCGTTT	CCGAAAAATAAAAAACGAAAAACGAACCG
PNMT	No met	TGGGGGAtGATTGtGtGtAGtG	CaCCaAaCCaCCcaaaCCATaTaCa
	Met	GGGGACGATTGtCGtGtAGtC	AaCCGCCCgaaaCCATaTaCG
TFPI2	No met	CCCACATAAAACAACACCCAAACCA	TGGTTTGTGGGTAAAGTGTGTTG
	Met	GTTTCGTTGGGTAAGGCGTTC	CATAAACGAACACCCGAACCG
TWIST1	No met	tAGAtAttTtGtGGGtTtGtAGtAttGtAttG	aCaaaAaaaaAaaaaACaaTaTaaATaaCCCCa
	Met	CGGgTtTtGtAGtAtCGGtAtC	CGAaAaaaaAaaaaACGaTaTaaATaaCCCCG

5 Para el análisis de PCR específico para la metilación, se extrajo ADN usando el método de extracción con fenolcloroformo estándar. La modificación con bisulfito de ADN genómico se llevó a cabo usando protocolos estándar (p. ej. con el EZ ADN methylation Kit (Zymo Research™)). Se realizó el análisis de metilación promotores del gen CAN (gen canceroso, según se define por Wood LD, Parsons DW, Jones S y cols., The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers, Science. 2007, 318(5853):1108-1113.) usando pares de cebadores MSP situados cerca del sitio de inicio de la transcripción putativo en la isla 5' CpG con 2 µl de ADN tratado con bisulfito como plantilla y JumpStart Red Taq ADN Polymerase (Sigma™) para la amplificación según se describe previamente (Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci USA. 3 de septiembre de 1996; 93(18):9821-9826).

15 Se extrajo ARN total de líneas celulares usando métodos estándar (p. ej. el RNeasy Mini Kit (Qiagen™)), y se trataron con DNasa. Para la reacción de transcripción inversa (RT), 1 µg de ARN total se sometió a la síntesis de ADNc de la primera hebra usando protocolos de síntesis de ADNc estándar (p. ej. Superscript III first strand cADN synthesis kit (InVitrogen™) usado según las instrucciones del fabricante). El análisis de la expresión se realizó mediante RT-PCR usando 1 µl de ADNc como plantilla y protocolos de amplificación estándar (p. ej. JumpStart Red Taq DNA Polymerase (Sigma™)).

PCR cuantitativa específica para la metilación usando PCR en tiempo real

25 Se llevó a cabo en primer lugar modificación con bisulfito sódico, que convierte residuos de citosina no metilados en residuos de uracilo, sobre 1 ug de ADN genómico aislado de las secciones de tejido embebidas en parafina usando procedimientos de metilación estándar (p. ej. EZ DNA metilación kit (Zymo Research Co) según las instrucciones del fabricante). Para análisis cuantitativos en tiempo real, se usaron procedimientos estándar. Por ejemplo, se usó el

Power SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems) y las condiciones de amplificación consistían en una etapa de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y renaturalización y extensión durante 30 segundos y 60 segundos, respectivamente. Se usó un ABI StepOnePlusReal-Time PCR System (Applied Biosystems), y para la cuantificación se usó el método del umbral del ciclo comparativo (Ct), normalizando los valores de Ct para el gen indicado con los valores de Ct de una muestra de reacción desmetilada con relación a una muestra de reacción metilada.

#### Método de metilación sobre cuentas (MOB)

Los métodos y los tampones usados para la extracción por metilación sobre cuentas son como se describen previamente (Bailey VJ, Zhang Y, Keeley BP, Yin C, Pelosky KL, Brock M, Baylin SB, Herman JG, Wang TH. Single-tube analysis of ADN methylation with silica superparamagnetic beads. Clin Chem. 56(6):1022-1025). En resumen, 50 µl de Protease K se añadieron a fondo de un tubo de Eppendorf y se añadieron a la muestra de suero 200 µl de tampón de unión de metilación sobre cuentas 1 y 100 µl de tampón de lisis hasta 200 µl. La muestra se incubó a 55°C durante 15 minutos (líneas celulares, sangre entera), y se añadieron 200 µl de alcohol isopropílico al 100%, y la muestra se mezcló. A continuación, se añadieron a la muestra 35 µl de cuentas magnéticas a la muestra y se mezclaron. A continuación, el tubo se puso sobre el soporte magnético para capturar las cuentas, y el sobrenadante se descartó. El tubo se retiró del soporte magnético y las cuentas se lavaron con 500 µl de tampón de lavado 1. Las cuentas se capturaron una vez más sobre el soporte magnético y a continuación se lavaron una segunda vez en 500 µl de tampón de lavado 2. A continuación, esta etapa se repitió una vez, y las cuentas se capturaron de nuevo, y el sobrenadante se descartó. Se añadieron 50 µl de tampón de elución al tubo de Eppendorf que contenía las cuentas lavadas. Para desnaturalizar el ADN para el tratamiento con bisulfito, se añadieron al tubo 6 µl de NaOH 2 M, se mezclaron y se incubaron a 70°C durante 10-15 minutos. A continuación, se añadieron y se mezclaron 12 µl de solución de hidroquinona recientemente preparada. Se añadieron y se mezclaron 200 µl de solución de bisulfito Na preparada. La solución de bisulfito Na se sometió a turbulencia para asegurar que estuviera totalmente saturada. La muestra se incubó a 65°C durante 4-6 horas, y a continuación se añadieron 120 µl de NaOH 10 M, se mezclaron y se incubaron a 50°C durante 10 minutos adicionales. Se añadieron a la muestra 350 µl de tampón de unión 2 para of metilación sobre cuentas, 100 µl de IPA y se mezclaron. A continuación, las cuentas se capturaron y se lavaron una vez en tampón de lavado 1 y dos veces en tampón de lavado 2 según se describe anteriormente. A continuación, las cuentas se capturaron y el sobrenadante se descartó. A continuación, el ADN se eluyó de las cuentas magnéticas con 100 µl de tampón de PCR. A continuación, la muestra se dividió según se deseara para la posterior amplificación por PCR.

## REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para detectar o caracterizar una neoplasia en una muestra biológica de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación de un gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza la presencia de una neoplasia en la muestra, comprendiendo además el método opcionalmente la etapa de detectar una alteración en la secuencia o el nivel de expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2*, *DPC4*, *EGFR* y/o *EML-ALK4*, en donde la neoplasia es un cáncer seleccionado de cáncer de colon, pulmonar o pancreático y en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el método detecta un incremento en la metilación con relación a una referencia.
3. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido o fluido biológico.
4. El método según la reivindicación 2, en el que la referencia es el nivel de metilación presente en el promotor en una muestra de control preferiblemente derivada de un sujeto sano.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la metilación se detecta mediante PCR cuantitativa específica para la metilación (QMSP).
6. El método según la reivindicación 5, en el que se cuantifica el nivel o la frecuencia de la metilación.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se cuantifican los niveles de metilación de los promotores de *BNC1* y *ADAMTS1*.
8. El método según la reivindicación 1, en el que el sujeto es fumador, tiene una mutación *Brcal* o *Brca2*, un quiste pancreático, pancreatitis crónica, presencia de pólipos o adenomas en el colon o antecedentes familiares de cáncer.
9. Un método in vitro según la reivindicación 1, para detectar o caracterizar cáncer de pulmón o colon en una muestra derivada de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación de un gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza cáncer de pulmón o colon en el sujeto y que comprende además detectar una alteración en la secuencia o el nivel de expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *EGFR* (*pulmón*) y/o *EML-ALK4*, en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada.
10. El método según la reivindicación 9, en el que el sujeto es fumador, tiene pólipos o adenomas en el colon o antecedentes familiares de cáncer.
11. Un método in vitro según la reivindicación 1, para detectar o caracterizar cáncer pancreático en una muestra de suero o plasma derivada de un sujeto, comprendiendo el método detectar la metilación del gen *BNC1* y *ADAMTS1*, en donde la detección de la metilación detecta o caracteriza cáncer pancreático en el sujeto, comprendiendo además la etapa de detectar una alteración en la secuencia o la expresión de un gen o polipéptido *Brca1*, *Brca2*, *p16*, *K-ras*, *APC*, *PalB2* y/o *DPC4* con relación a una referencia, en donde el nivel de metilación presente en el promotor del gen *BNC1* y *ADAMTS1* se compara con una referencia seleccionada del nivel de metilación presente en una muestra de control obtenida de un paciente que no tiene una neoplasia, un nivel inicial de metilación presente en una muestra biológica derivada de un paciente, antes de, durante o después del tratamiento para una neoplasia o una curva estandarizada.
12. El método según la reivindicación 11, en el que el método detecta un incremento en la metilación con relación a una referencia.
13. El método según la reivindicación 11, en el que el sujeto se identifica como fumador, tiene una mutación *Brcal* o *Brca2*, un quiste pancreático, pancreatitis crónica o antecedentes familiares de cáncer.

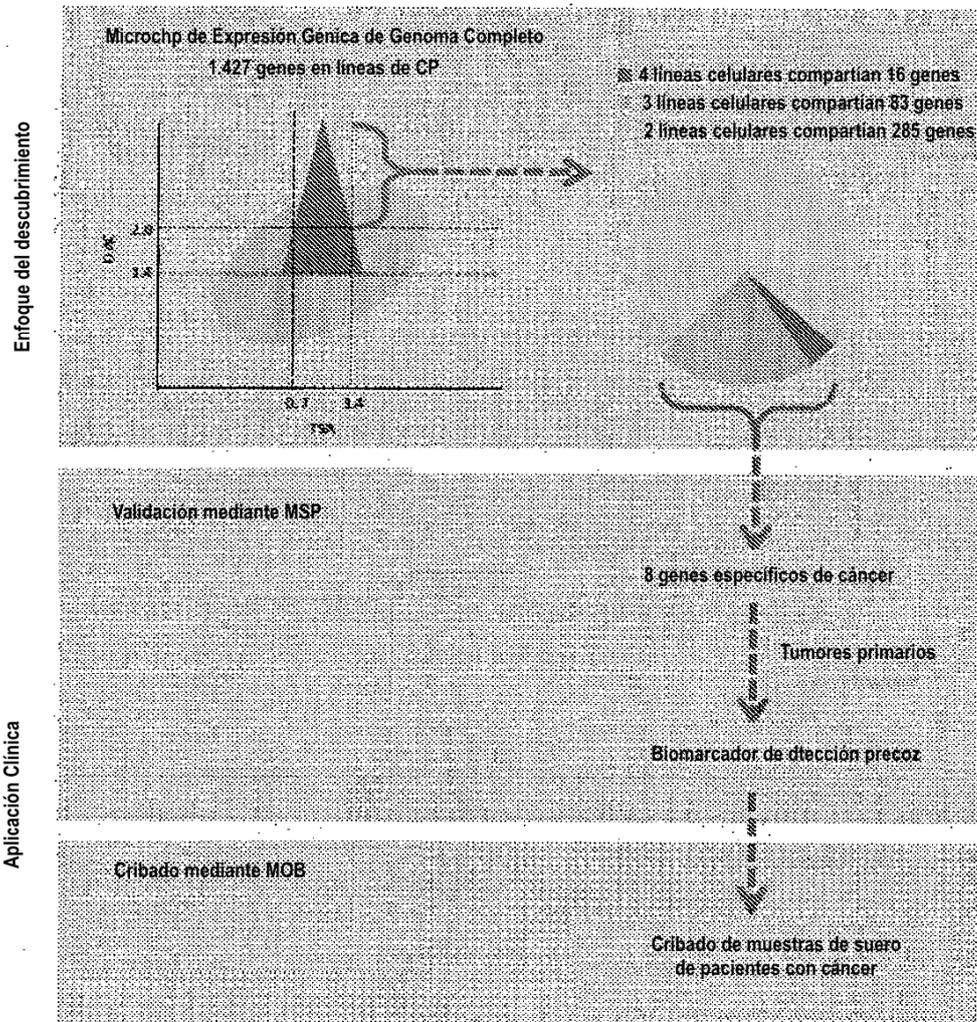
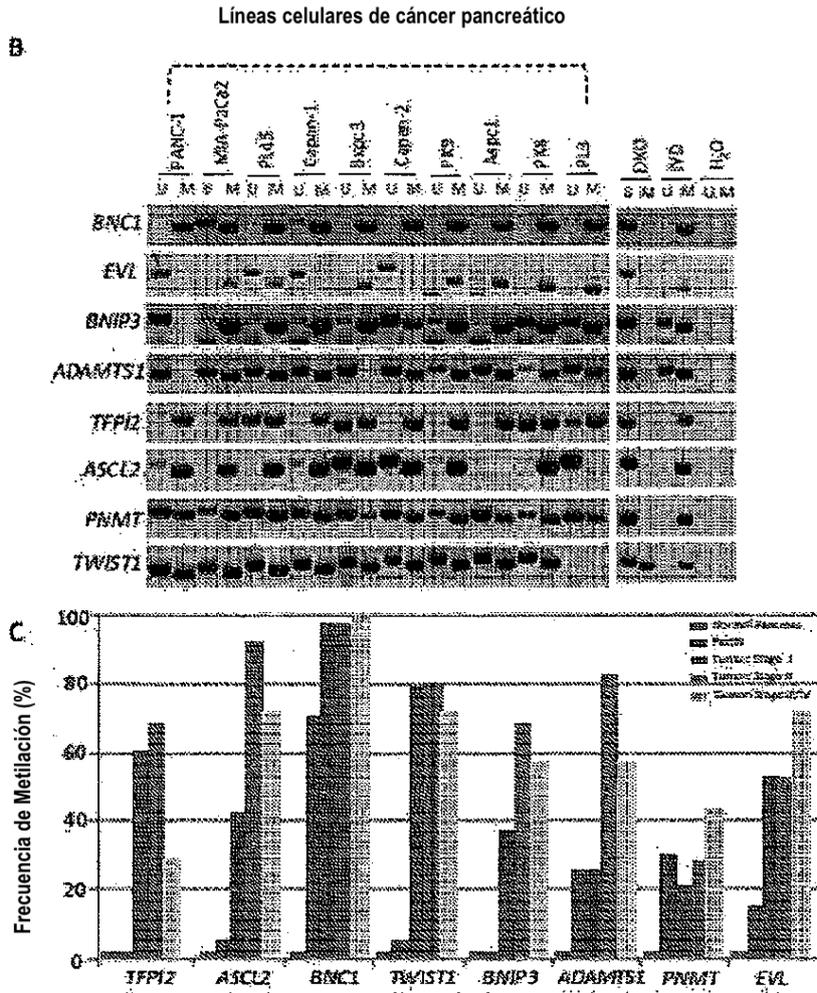


Figura 1A



Figuras 1B y 1C

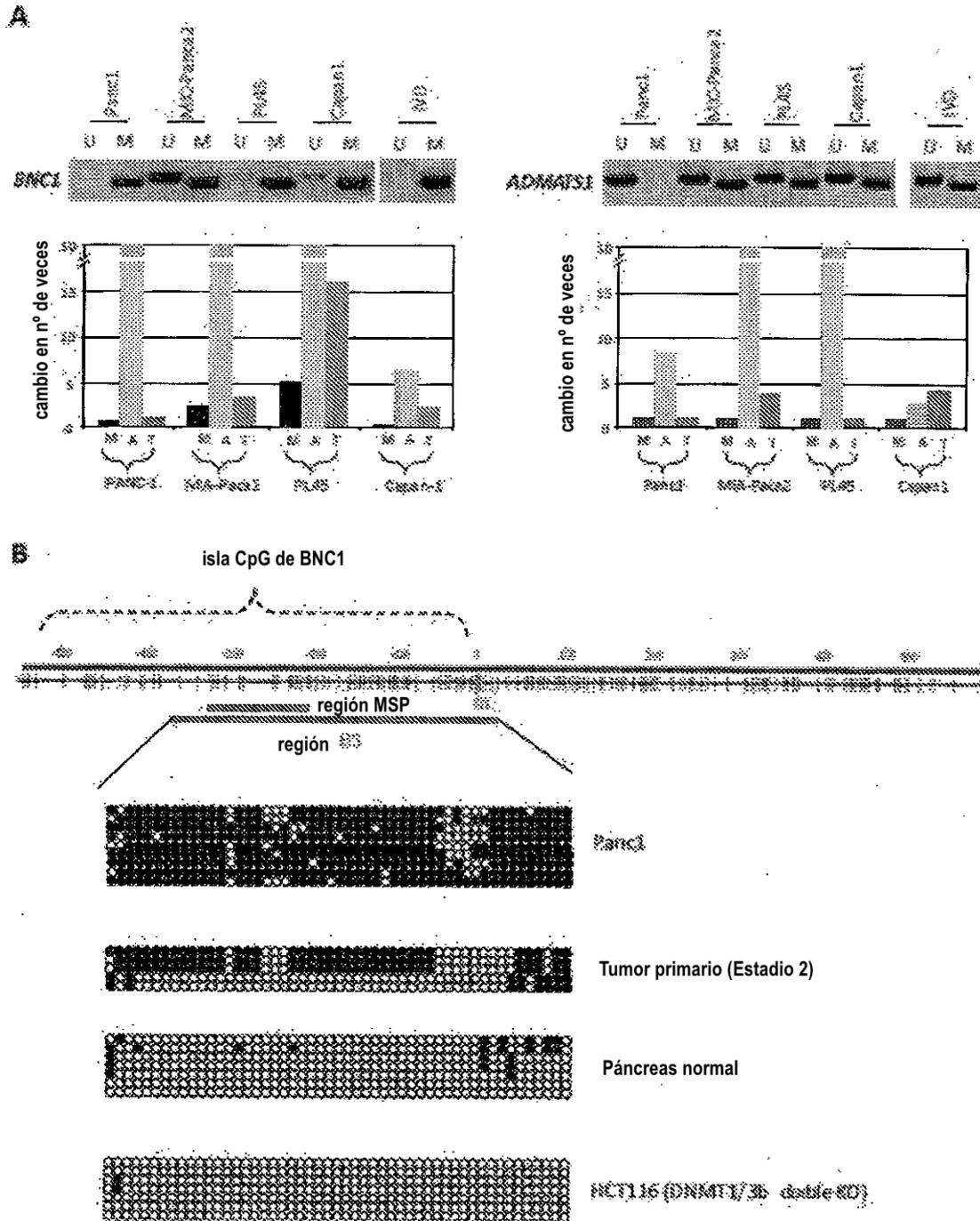


Figura 2A y 2B

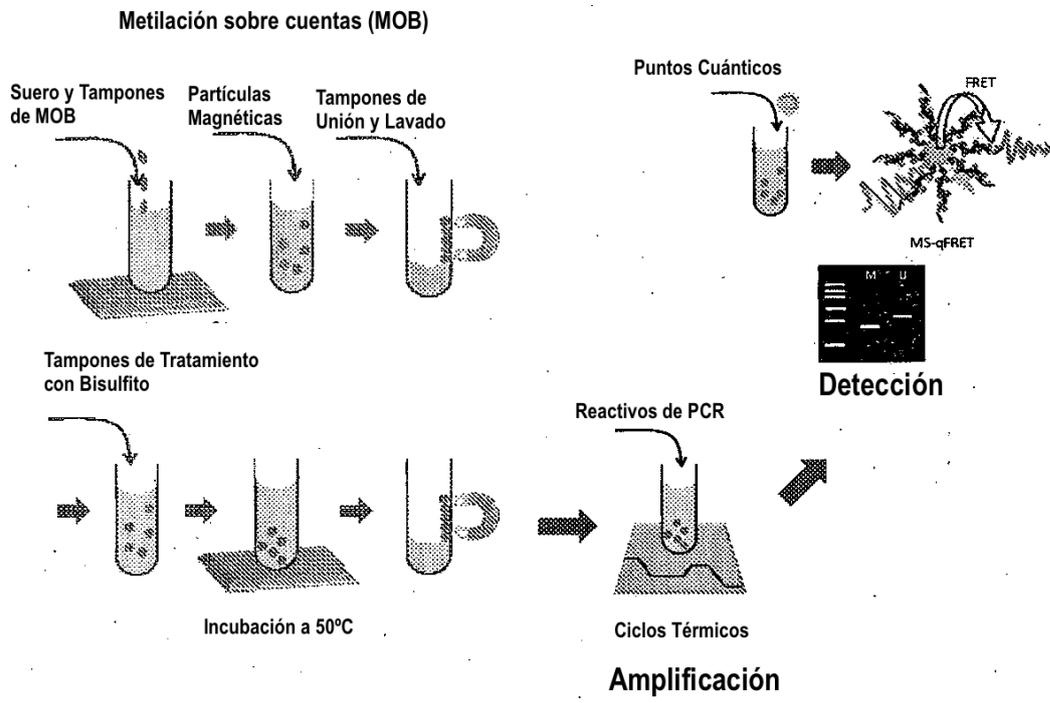


Figura 2C

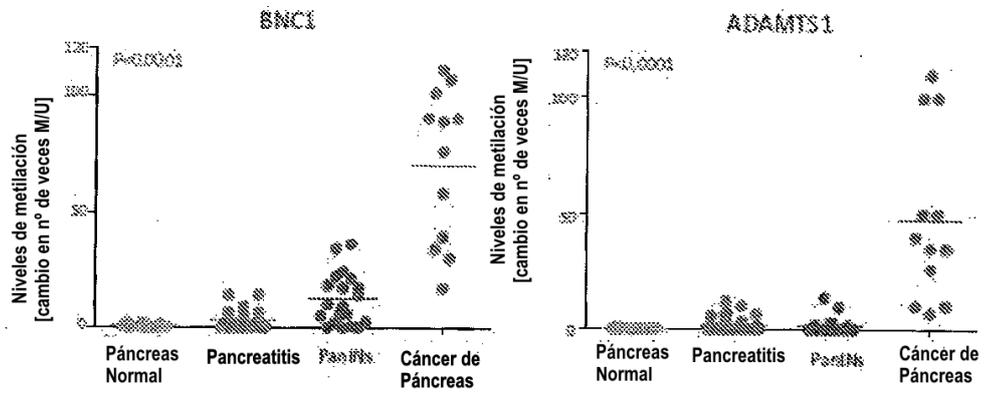


Figura 3

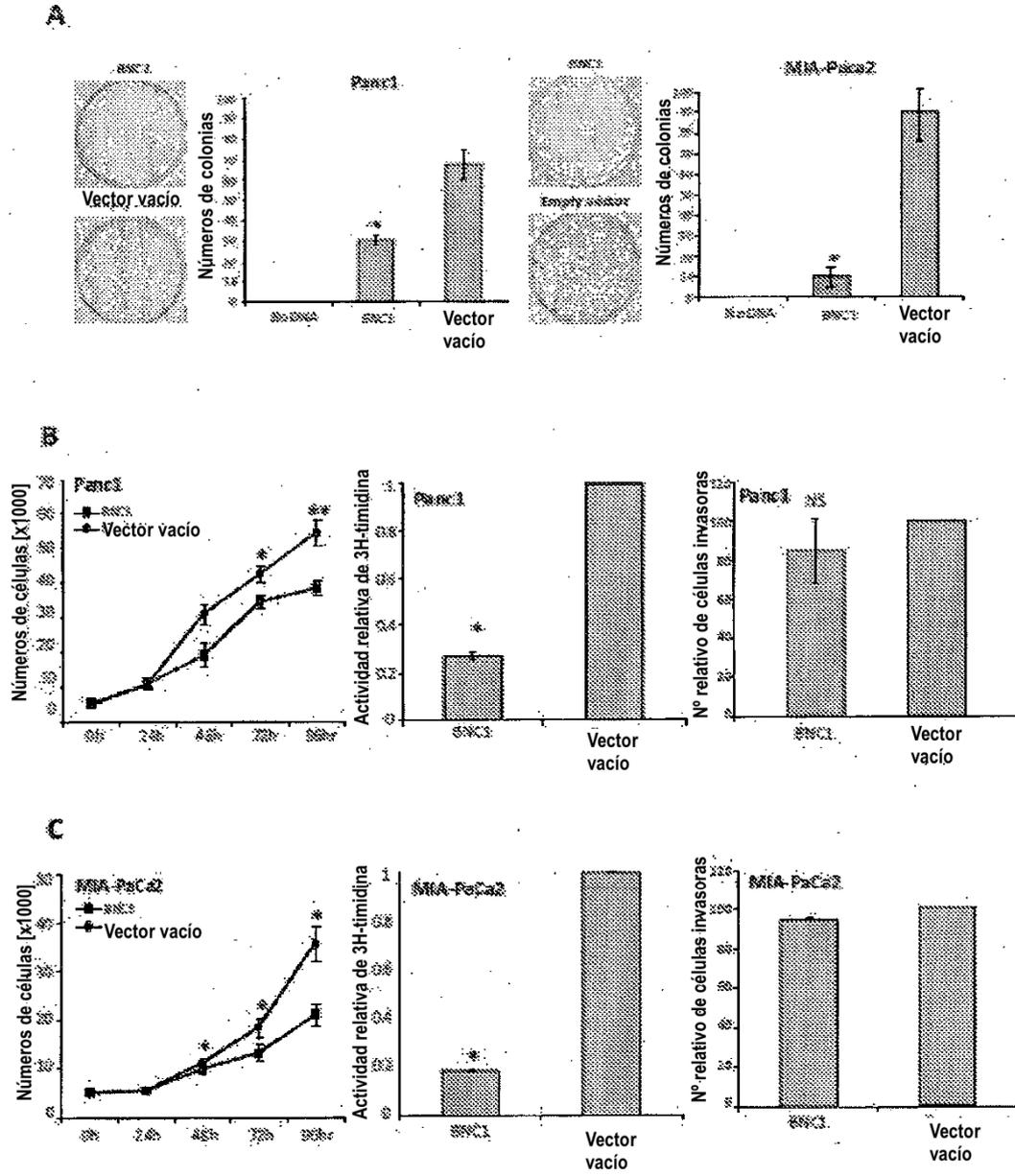


Figura 4A, 4B y 4C