

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 727**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2012 PCT/CN2012/000169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2012 E 12868748 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2816120**

54 Título: **Método para la estimación in vitro de tumorigénesis, metástasis o esperanza de vida y nucleótido artificial utilizado**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2018

73 Titular/es:
**BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
(100.0%)
52 Fu-Cheng Road Haidian District
Beijing 100036, CN**

72 Inventor/es:
**DENG, DAJUN;
ZHANG, JUN;
LIU, ZHAOJUN;
ZHOU, JING;
GU, LIANKUN y
ZHANG, BAOZHEN**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 675 727 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la estimación *in vitro* de tumorigénesis, metástasis o esperanza de vida y nucleótido artificial utilizado.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos de predicción de la capacidad de invasión de un tumor maligno, de metástasis *in vitro* y la duración del tiempo de supervivencia del paciente, y se refiere además a los fragmentos de nucleótidos utilizados en los métodos.

10

Antecedentes de la técnica

La invasión y la metástasis son los motivos predominantes del mal pronóstico de los cánceres. La destrucción de órganos vecinos y distantes mediante la invasión y metástasis del cáncer conducen a la pérdida de la oportunidad de resección quirúrgica y a la recurrencia después de los tratamientos curativos. Los biomarcadores sensibles para la detección del potencial de invasión y metástasis mejorarían en gran medida la gestión clínica personalizada de los pacientes de cáncer. Por lo tanto, existe una gran demanda de predicción del potencial de invasión y metástasis de los cánceres.

15

20

Es un hecho ampliamente reconocido que resulta prácticamente imposible identificar el potencial de metástasis de los cánceres basándose únicamente en la histopatología. Por lo tanto, se espera que deba llevarse a cabo el subtipado molecular mediante métodos de biología molecular. Durante las últimas décadas se han realizado grandes avances en la modificación de la expresión de las proteínas y el ARN. Aunque existen muchos estudios sobre la biología del cáncer, todavía no se dispone de un método efectivo para reconocer con precisión la capacidad metastásica de las células cancerosas.

25

Con el rápido desarrollo de la biología molecular, se ha obtenido una comprensión integral de los mecanismos de la carcinogénesis. Además de la inactivación o activación genética de los genes de tipo tumoral (incluyendo p53, APC y Ras, etc.), la inactivación epigenética de los genes supresores tumorales (incluyendo p15, p16 y hMLH1, etc.) mediante hipermetilación y la reactivación de los protooncogenes mediante hipometilación de islas de CpG son otros tipos de sucesos frecuentes en los cánceres. Es bien conocido que la detección de las alteraciones de los niveles de proteínas y de los niveles de ARNm de los genes en unas cuantas células anormales en muestras de tejido resulta muy difícil utilizando los ensayos de expresión génica debido a que su visibilidad se reduce mucho por la coexistencia de poblaciones celulares principales en las que no ha cambiado la expresión génica. En contraste, las islas de CpG metiladas y desmetiladas pueden analizarse con ensayos específicos de metilación y de desmetilación, respectivamente. Lo anterior hace que la detección del estado de metilación de las islas de CpG sea tan sensible que puedan visualizarse claramente las alteraciones de la metilación que se han producido en unas cuantas células en un tejido de ensayo. Ello hace que la metilación del ADN constituya un biomarcador óptimo para la estratificación molecular de los cánceres.

30

35

40

El receptor GFRa1 se combina con el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), formando la fosfotirosina cinasa [Cell 85(7):1113-1124, 1996] del oncogén RET, que es capaz de activar rutas de señalización tales como SRC, MAPK, AKT y Rho, etc. Se encuentra estrechamente relacionado con la proliferación, diferenciación y migración de las células [Nature Reviews Neuroscience 3(5):383-394, 2002]. Se ha encontrado que la expresión de GFRa1 se encuentra elevada en los tejidos de algunos cánceres (tales como el cáncer pancreático, el cáncer de mama, el carcinoma de las células olfativas y el tumor de las células gliales). La expresión elevada de dicho gen estimula la aparición, desarrollo y metástasis de dichos cánceres [Cancer Research 65(24):11536-11541, 2005; Cancer Research 67(24):11733-11741, 2007]. También se ha informado de que la desactivación mediante metilación de GDNF, el ligando de GFRa1, se relaciona con la incidencia de cáncer gástrico [Gastroenterology 136:2149-2158, 2009]. Se ha encontrado que el cáncer de próstata está asociado a la metilación de las islas de CpG en los promotores de más de 30 genes. Un nivel elevado de metilación de las islas de CpG en dichos genes es indicativo de la presencia de un cáncer (documento n° WO 2007/102891).

55

Sin embargo, no existe ningún informe sobre un método de utilización de la metilación y la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 para la estimación de la incidencia, metástasis y supervivencia de tumores en el estómago, el colon o el hígado.

60

Descripción detallada de la invención

Por una parte, la presente invención proporciona un ensayo de detección *in vitro* de la incidencia, metástasis y tiempo de supervivencia del tumor en estómago, colon o hígado, y el nucleótido artificial utilizado en el método. Ayudará en el descubrimiento precoz y el diagnóstico definitivo del tumor, en la estimación exacta de la capacidad de metástasis del tumor y del tiempo de supervivencia postoperatorio del paciente con el fin de proporcionar ayuda al diagnóstico y tratamiento del tumor.

65

Con el fin de obtener lo expuesto anteriormente, la invención proporciona la propuesta técnica siguiente.

En la invención se da a conocer un ensayo de detección *in vitro* de la incidencia de tumor en estómago, colon o hígado, que incluye las etapas siguientes:

- a) extracción de muestras de ADN genómico o de ADN libre de plasma a partir de pacientes de cáncer y pacientes sin cáncer, respectivamente,
- b) detección y cálculo de la proporción de metilación o desmetilación de islas de CpG ene GFRa1, determinando un valor de corte de la metilación o desmetilación de un tumor,
- c) extracción del ADN genómico o del ADN libre de plasma a partir del ensayo de pacientes *in vitro* y detección y cálculo de la proporción de metilación o desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en las muestras de ADN,
- d) comparación de la proporción de metilación o desmetilación determinada en la etapa c) con el valor de corte de metilación o desmetilación determinada en la etapa b),
- e) en el caso de que la proporción de metilación o desmetilación determinada en la etapa c) sea inferior o igual al valor de corte determinado en la etapa b), debe considerarse la incidencia de un tumor, o
en el caso de que la proporción de metilación o desmetilación en la etapa c) sea superior o igual al valor de corte determinado en la etapa b), no se considera la incidencia de un tumor.

Además, los métodos de detección y cálculo de la proporción de metilación o desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en las etapa b) y c) son los siguientes: la modificación química de la citosina no metilada; la selección y síntesis de cebadores de PCR que se correspondan con las islas de CpG metiladas o desmetiladas de las secuencias de GFRa1 modificadas; la amplificación de las islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas utilizando dichos cebadores; la detección y cálculo de la proporción de metilación o desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 utilizando ensayos cuantitativos de metilación. También pueden utilizarse otros métodos de la técnica para analizar el nivel de metilación de GFRa1, tales como la secuenciación basada en el enriquecimiento en ADN metilado y la combinación con otras tecnologías.

Además, el valor de corte de la proporción de metilación o desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 se determina mediante el método de la curva ROC en la etapa b).

La invención se refiere además a secuencias de ADN modificado de las islas de CpG de GFRa1 mencionadas en las etapas b) y c), que se muestran en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

Además, la proporción de metilación o desmetilación de GFRa1 en las etapas b) y c) se cuantifica mediante DHPLC, secuenciación por bisulfito o PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas (MethyLight).

Preferentemente, los juegos de cebadores en el análisis de metilación cuantitativo mediante DHPLC o secuenciación por bisulfito son:

- a) el juego de cebadores las secuencias de bases del cual se muestran en SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6, o
- b) el juego de cebadores las secuencias de bases del cual se muestran en SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.

Preferentemente, los juegos de cebadores y las sondas en el análisis MethyLight son:

- a) el grupo de oligonucleótidos constituido por el juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales se muestran en SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 y la sonda cuya secuencia de bases se muestra en SEC ID nº 11, o
- b) el grupo de oligonucleótidos constituido por el juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales se muestran en SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13 y la sonda cuya secuencia de bases se muestra en SEC ID nº 14.

Los tumores mencionados en la presente invención se seleccionan de entre cáncer de colon, cáncer gástrico o cáncer de hígado.

La presente invención proporciona además un método de ensayo de detección *in vitro* del riesgo de metástasis de cáncer en el estómago, colon o hígado, y un método de tiempo de supervivencia postoperatoria que incluye las etapas siguientes:

- 5 a) extracción del ADN a partir de los tejidos tumorales de los pacientes con cáncer metastásico y de los tejidos tumorales de pacientes con cáncer no metastásico,
- b) detección y cálculo de la proporción de metilación (o desmetilación) de las islas de CpG de GFRa1 y determinación del valor de corte para la predicción de la metástasis del cáncer,
- 10 c) extracción del ADN tumoral del paciente de cáncer de ensayo, detección y cálculo de la proporción de metilación (o desmetilación) de las islas de CpG de GFRa1 en el tejido tumoral,
- d) comparación entre la proporción de metilación (o desmetilación) de GFRa1 determinada en la etapa c) y el valor de corte de metilación (o desmetilación) determinado en la etapa b).
- 15 e) en el caso de que la proporción de metilación (o desmetilación) determinada en la etapa c) sea inferior (o superior) o igual al valor de corte determinado en la etapa b), se considerará que el paciente presenta un riesgo elevado de metástasis tumoral y una corta supervivencia postoperatoria, o
- 20 en el caso de que la proporción de metilación (o desmetilación) determinada en la etapa c) sea superior (o inferior) al valor de corte determinado en la etapa b), se considerará que el paciente presenta un riesgo bajo de metástasis tumoral y una supervivencia postoperatoria larga. En caso contrario, se considerará que le paciente presenta un riesgo elevado de metástasis tumoral y una supervivencia postoperatoria corta.

25 Además, el método de detección y cálculo de la proporción de metilación (o desmetilación) determinada en las etapas b) y c) es el siguiente: modificación química de la citosina no metilada; selección y síntesis de cebadores de PCR que se correspondan con las islas de CpG metiladas (o desmetiladas) en las secuencias de GFRa1 modificadas; amplificación de las islas de CpG de GFRa1 metiladas (o desmetiladas) utilizando dichos cebadores; detección y cálculo de la proporción de metilación (o desmetilación) de las islas de CpG de GFRa1 utilizando los ensayos cuantitativos de metilación. También pueden utilizarse otros métodos para analizar el nivel de metilación de GFRa1, tales como la secuenciación basada en el enriquecimiento en ADN metilado y la combinación con otras tecnologías.

30

Además, el valor de corte de proporción de GFRa1 metilado (o desmetilado) calculado en la etapa b) se determina mediante el método de la curva ROC.

35 Además, la secuencia oligonucleótida de las islas de CpG en la secuencia modificada de GFRa1 en las etapas b) y c) es la mostrada en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.

40 Además, se llevó a cabo el análisis cuantitativo del contenido de metilación de GFRa1 en las etapas b) y c) mediante DHPLC, secuenciación por bisulfito y MethyLight (PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas).

Además, en el análisis cuantitativo de metilación en el ensayo DHPLC y en la secuenciación por bisulfito, el juego de cebadores mencionado en la presente invención es:

- 45 a) el juego de cebadores constituido de oligonucleótidos las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en las SEC ID nº 5 y nº 6, o
- b) el juego de cebadores que está constituido de oligonucleótidos las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en SEC ID nº 7 y nº 8.
- 50

Además, en el método de análisis cuantitativo de metilación en el ensayo MethyLight, el grupo oligonucleótido mencionado en la presente invención es:

- 55 a) el grupo oligonucleótido que está constituido del juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en SEC ID nº 9 y nº 10, y la sonda cuya secuencia de bases es la mostrada en SEC ID nº 11, o
- b) el grupo oligonucleótido que está constituido del juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, y la sonda cuya secuencia de bases se muestra en SEC ID nº 14.
- 60

El tumor mencionado en la presente invención se refiere al cáncer de estómago, colon o hígado.

65 La presente invención proporciona además un tipo de molécula de ADN cuya secuencia de bases es la mostrada en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.

La presente invención proporciona además un tipo de juego de cebadores, la secuencia de bases del cual es la mostrada en SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6.

5 La presente invención proporciona además otro tipo de juego de cebadores, la secuencia de bases del cual es la mostrada en SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.

10 La presente invención proporciona además un tipo de grupo de oligonucleótidos, que incluye un juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10, y la sonda con la secuencia de bases mostrada en SEC ID nº 11.

15 La presente invención proporciona además un tipo de grupo de oligonucleótidos, que incluye un juego de cebadores las secuencias de bases de los cuales son las mostradas en SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13, y la sonda con la secuencia de bases mostrada en SEC ID nº 14.

20 La presente invención proporciona además un método para detectar la reactivación anormal de la expresión de GFRa1 en el cáncer de colon, estómago o hígado. La característica del método es: el análisis de la desmetilación total de los sitios CpG en torno al sitio de inicio de transcripción del gen de GFRa1. La primera mención en todo el mundo de este método es de los inventores de la invención. Además, la invención proporciona un juego de ensayos para detectar la reactivación anormal de GFRa1 para la determinación de la incidencia y metástasis de cáncer de colon, estómago o hígado y de la supervivencia postoperatoria del paciente.

Con el fin de conseguir los objetivos anteriormente indicados, se proporcionan dichos métodos basándose en los resultados de investigación siguientes.

25 Hipótesis

La incidencia y progresión del tumor es un proceso multifactor, y de múltiples vías y estadios. Las firmas epigenéticas y características biológicas de las células de cáncer pueden ser dependientes de la vía, que conducirá a un pronóstico diferente. Por ejemplo, el pronóstico del cáncer colorrectal con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H, relacionada con la inactivación de genes de reparación de apareamientos incorrectos, tales como MLH1) es mejor que el que presenta una baja inestabilidad de MSI; el pronóstico de los gliomas con inactivación mediante metilación del gen MGMT de reparación del ADN es mejor que aquellos sin metilación de MGMT. Existe una isla de CpG en torno al sitio de inicio de transcripción del gen GFRa1. GFRa1 resulta inactivado mediante metilación en la mayoría de tejidos adultos normales. Sin embargo, su expresión evidentemente se encuentra regulada positivamente en muchos cánceres. GFRa1 estimula la incidencia y progresión de los cánceres. En el contexto de la presente invención se ha descubierto en primer lugar que GFRa1 se encuentra desmetilado en los tejidos de cáncer y la desmetilación consecuentemente conduce a la regulación positiva de GFRa1 en los cánceres. De acuerdo con lo anterior, los inventores han planteado la hipótesis de que la detección de contenido de GFRa1 metilado (o desmetilado) podría utilizarse para determinar la incidencia de cáncer, para predecir la metástasis de cánceres y la supervivencia del paciente. Esta hipótesis ha sido validada en muchos cánceres, tal como se indica a continuación.

Validación

45 1. Clave: los datos de metiloma del ADN en todo el genoma de los presentes inventores muestran que la proporción de señal de metilación [cáncer gástrico (CG) vs. margen quirúrgico (MQ)] del promotor de GFRa1 detectado con sondas de micromatriz es significativamente inferior en el CG metastásico que en el CG no metastásico (figura 1). Lo anterior sugiere que la reactivación de GFRa1 mediante desmetilación del ADN podría ser un potencial biomarcador potencial. Por lo tanto, se llevaron a cabo los experimentos siguientes para confirmar dicha hipótesis en detalle.

50 2. Establecimiento de métodos para detectar cuantitativamente la metilación y desmetilación de GFRa1: se convirtieron los residuos de citosina no metilados en muestras de ADN genómico a residuos uracilo con bisulfito sódico. Se utilizó un juego de cebadores libres de cpG para amplificar los fragmentos de ADN diana tanto metilados como no metilados (522 pb) de islas de CpG en GFRa1. Se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturante (DHPLC) para separar y cuantificar las cantidades de moléculas de GFRa1 metilado y no metilado en los productos de PCR (figura 2). Los resultados de la secuenciación clonal por bisulfito, un ensayo semicuantitativo, son consistentes con el análisis de DHPLC (figura 3). Estos resultados indican que el ensayo de DHPLC podría utilizarse para el análisis cuantitativo de la proporción de alelos de GFRa1 metilados a no metilados. Con el fin de detectar la metilación de GFRa1 en muestras de ADN de tejidos incluidos en parafina, en los que las moléculas grandes de ADN se fragmentan en moléculas pequeñas de ADN, se prepara un ensayo cuantitativo de PCR específico de metilación basado en sondas (MethyLight) para determinar el nivel de metilación en un fragmento de 158 pb dentro de la isla nuclear de CpG del gen. Tras normalizar respecto al ADN de entrada utilizando la región libre de CpG en el gen de referencia *COL2A1* (Widschwendter et al., Cancer Res. 64:3807-3813, 2004), los resultados del análisis de MethyLight son altamente consistentes con el análisis de DHPLC

($r=0,5$; $p=0,000$; figura 4). Pudo observarse una asociación similar entre la metilación de GFRa1 y las características del cáncer tanto en la DHPLC como en el análisis de MethyLight.

3. Reactivación de la expresión de GFRa1 mediante desmetilación de las islas de CpG: en líneas celulares y muestras de tejido con diferentes estados de metilación de GFRa1, se analizó el nivel de ARNm del gen GFRa1 con una RT-PCR cuantitativa basada en sondas fluorescentes. Los resultados demuestran que se detecta ARNm de GFRa1 en 4 líneas celulares positivas para desmetilación de GFRa1 pero no en 15 líneas celulares negativas para desmetilación ($P<0,001$, figura 5A). De manera similar, se observó que los niveles de ARNm de GFRa1 se encontraban inversamente correlacionados con los niveles de metilación de GFRa1 en muestras de tejido gástrico ($P=0,041$, figura 5B). También se observó el mismo fenómeno en los tejidos de colon. En resumen, dichos resultados indican que la desmetilación del ADN de promotor podría reactivar la expresión de GFRa1.

4. Desmetilación de GFRa1 en tejidos gástricos es un biomarcador potencial de cribado de cáncer gástrico: los niveles de desmetilación en biopsias normales/gástricos procedentes de 48 pacientes de control no de cáncer (10 normales y 38 con gastritis crónica), 98 cánceres gástricos y las muestras de tejido "normal" del margen quirúrgico correspondientes se analizaron mediante la utilización de DHPLC. Los resultados muestran que la proporción de GFRa1 metilado:desmetilado en biopsias normales/de gastritis (mediana: 60,4%) es significativamente más alta que en muestras de CG (51,0%, $P=0,043$) o en muestras del MQ (14,5%, $P<0,01$). Indica que GFRa1 resulta desmetilado durante el desarrollo del cáncer gástrico y que la desmetilación se produce tanto en los tejidos de cáncer gástrico como en tejidos no cancerosos contiguos a modo de efecto de campo. Por lo tanto, resulta muy útil para el cribado del cáncer gástrico en un estadio precoz utilizando biopsias gástricas, en las que las células de cáncer podrían no incluirse en la muestra en algunos casos.

Con el fin de investigar la viabilidad del cribado de los carcinomas gástricos utilizando GFRa1 como biomarcador, se calculó el valor de corte de la proporción de metilación:desmetilación de GFRa1 utilizando la curva característica de receptor-operador (ROC). La superficie bajo ROC era de 67,3% ($P<0,001$, figura 6B) según los resultados anteriores de metilación de GFRa1 de pacientes de cáncer gástrico y sin cáncer. Al fijar el valor de corte en 22,8% ($\leq 22,85\%$ los positivos para desmetilación y $>22,8\%$ los negativos para desmetilación), la tasa de positivos para desmetilación en muestras normales/de gastritis (15/48=31,2%) era mucho más baja que en el margen quirúrgico (77/98=78,5%) y que en tejidos de cáncer gástrico (60/98=61,2%) ($P<0,001$). La sensibilidad y especificidad de GFRa1 positivo para desmetilación en el tejido del margen quirúrgico para el cribado del cáncer gástrico eran de 79% y 69%, respectivamente.

5. La desmetilación de GFRa1 es un potencial biomarcador para la predicción de metástasis de los carcinomas gástricos y la supervivencia global del paciente: en el análisis de la relación entre la desmetilación de GFRa1 y la metástasis del cáncer gástrico o la supervivencia global del paciente, se encontró que la proporción de GFRa1 metilado en 49 carcinomas gástricos no metastásicos era significativamente más elevada que en 49 carcinomas metastásicos (mediana, 60,6% vs. 22,8%, $P=0,044$). Por lo tanto, se utilizó el estado de metástasis del carcinoma gástrico como estándar de oro para calcular la curva ROC a fin de evaluar la eficiencia para utilizar la metilación de GFRa1 como clasificador para la predicción de la metástasis de cáncer. Se encontró que la superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 65,6% ($P=0,004$, figura 7). Al fijar el valor de corte de la proporción de GFRa1 metilado en 16,4% ($\leq 16,4\%$ para elevada desmetilación de GFRa1 y $>16,4\%$ para baja desmetilación), la tasa de alta desmetilación en carcinomas gástricos metastásicos de 17% (35/49) era significativamente superior a la observada en carcinomas gástricos no metastásicos, de 49% (24/49, $P=0,038$) (sensibilidad de 71% y especificidad de 51%). El análisis de Kaplan-Meier mostraba que la supervivencia global del paciente con alta desmetilación de GFRa1 era más corta que en pacientes con baja desmetilación (tasa de supervivencia a 5 años de 32,8% frente a 62,2%; prueba de rangos logarítmicos, $P=0,001$; análisis multivariante, $P=0,002$, figura 8).

Los resultados anteriores se validaron adicionalmente en 120 pacientes independientes con carcinoma gástrico sin metástasis distante. Nuevamente se encontró que la proporción de GFRa1 metilado en 47 tejidos de cáncer no metastásico era significativamente más alta que en 73 casos de metástasis a ganglio linfático (mediana, 49,0% vs. 30,6%, $P<0,001$). Utilizando el mismo valor de corte (16,4%), la tasa de alta desmetilación de GFRa1 en los casos metastásicos (46/73) era significativamente más alta que en casos no metastásicos (19/47) (63,1% vs. 40,4%, $P=0,024$; sensibilidad de 63% y especificidad de 60%). El análisis de Kaplan-Meier también mostró que los pacientes con alta desmetilación presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes con baja desmetilación (tasa de supervivencia a 5 años: 47,7% vs. 71,7%; prueba de rangos logarítmicos, $P=0,015$; análisis multivariante, $P=0,025$; figura 9). Los resultados de los estudios de descubrimiento y validación muestran que los niveles de desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en los carcinomas gástricos se encuentran estrechamente relacionados con la metástasis de cáncer y la supervivencia global de los pacientes. Estos resultados indican que la desmetilación de GFRa1 podría ser un biomarcador útil para la predicción de la

metástasis del cáncer.

6. La desmetilación de GFRa1 es un biomarcador para predecir la incidencia y metástasis del cáncer de colon y la supervivencia del paciente. Con el fin de estudiar la relación entre la desmetilación de GFRa1 y el pronóstico de otros cánceres, se analizaron mediante ensayo de DHPLC los niveles de desmetilación de GFRa1 en muestras de biopsia de mucosa del colon procedentes de 21 pacientes sin cáncer, 97 cánceres de colon y los tejidos del margen quirúrgico correspondientes. Los resultados demuestran que la proporción de GFRa1 metilado en las biopsias de colon (mediana: 64,1%) es significativamente más alta que en carcinomas de colon (31,6%, $P=0,001$) y en los tejidos de margen quirúrgico (26,6%, $P<0,001$, figura 10). La superficie bajo la curva ROC era de 74,1% según los resultados del análisis de metilación utilizando tejidos de cáncer y biopsias de control procedentes de pacientes sin cáncer ($P<0,001$, figura 11). Al fijar el valor de corte en 34,5% ($\leq 34,5\%$ para los positivos para desmetilación y $>34,5\%$ para los negativos para desmetilación), la tasa de positivos para desmetilación de GFRa1 en 7/21 biopsias de control procedentes de pacientes sin cáncer (33,3%) era significativamente más baja que en 93/97 muestras de margen quirúrgico (95,8%, $P<0,001$) y que en 60/97 muestras de cáncer (61,9%, $P<0,001$). Al utilizar la tasa de positivo para desmetilación de GFRa1 en biopsias sin cáncer o en muestras de margen quirúrgico como biomarcador para el cribado del cáncer de colon, se obtuvo una sensibilidad y una especificidad de 95,8% y 66,7%, respectivamente.

Además, también se analizó la relación entre la desmetilación de GFRa1 y la metástasis del cáncer de colon en dichos 97 pacientes de cáncer de colon (49 cánceres no metastásicos y 48 metastásicos). La proporción de GFRa1 metilado en los 49 casos metastásicos era significativamente más alta que en los 48 casos de metástasis (mediana, 45,6% vs. 25,0%, $P=0,016$). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 62,6% ($P=0,033$, figura 12). Al fijar el valor de corte en 27,6% ($\leq 27,6\%$ para alta desmetilación de GFRa1 y $>27,6\%$ para baja desmetilación), la tasa positiva para alta desmetilación de GFRa1 en los 48 cánceres metastásicos (33/48=68,8%) era significativamente más alta que en los 49 cánceres no metastásicos (22/49=44,9%, $P=0,024$; sensibilidad de 69% y especificidad de 55%). El análisis de Kaplan-Meier demostró que los pacientes de cáncer con alta desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes con baja desmetilación (tasa de supervivencia a los 3 años, 41,8% vs. 66,7%; prueba de rangos logarítmicos, $P=0,019$; análisis multivariante, $P=0,031$, figura 13).

Se observaron resultados similares al utilizar una PCR cuantitativa de fluorescencia específica de metilación para detectar el nivel de desmetilación de GFRa1 en dichos tejidos. La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 61,7% ($P<0,05$, figura 14). Al fijar el valor de corte en 22,3% ($\leq 22,3\%$ para alta desmetilación de GFRa1 y $>22,3\%$ para baja desmetilación), la tasa positiva para alta desmetilación de GFRa1 en los 48 cánceres metastásicos (40/48) era significativamente más alta que en los 48 cánceres no metastásicos (31/49) (83,3% vs. 63,3%, $P=0,038$; sensibilidad de 83% y especificidad de 37%). El análisis de Kaplan-Meier demostró que los pacientes de cáncer de alta desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes de baja desmetilación (tasa de supervivencia a 3 años, 46,5% vs. 69,2%, figura 15).

7. La desmetilación de GFRa1 es un biomarcador para predecir la incidencia y metástasis de otros cánceres y la supervivencia del paciente. También se analizó la relación entre la desmetilación de GFRa1 y el pronóstico de los carcinomas hepatocelulares (CHC). Los resultados demuestran que la proporción de alelos de GFRa1 metilados en 20 CHC no metastásicos era más alta que en los 17 CHC metastásicos (mediana, 55,6% vs. 41,4%, $P=0,065$). La supervivencia bajo la curva ROC (AUC) era de 68,4% (figura 16). Al fijar el valor de corte en 49,3% ($\leq 49,3\%$ para alta desmetilación de GFRa1 y $>49,3\%$ para baja desmetilación), la tasa de positivo para alta desmetilación de GFRa1 en 17 CHC metastásicos (12/17) era significativamente más alta que en 20 CHC no metastásicos (11/20) (70,5% vs. 55%, $P=0,024$; sensibilidad de 70% y especificidad de 45%). El análisis de Kaplan-Meier también demostró que los pacientes con alta desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global más corta que los pacientes con baja desmetilación de GFRa1 (figura 17).

Además, se encontró que las islas de CpG de GFRa1 se encontraban completamente desmetiladas en las células de cáncer pulmonar A549 y en las células de cáncer de próstata PC-3. Los resultados indicados anteriormente indican que la desmetilación de GFRa1 está asociada a la incidencia de múltiples cánceres.

En resumen, los presentes datos demuestran que la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 es un biomarcador potencial para el cribado de diversos cánceres y puede utilizarse el nivel elevado de desmetilación de GFRa1 para predecir la metástasis de múltiples cánceres y el tiempo de supervivencia global del paciente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 se refiere a la comparación de la intensidad de la señal de metilación del ADN en diferentes sectores de islas de CpG en GFRa1 en la base de datos del metiloma de ADN de carcinomas gástricos y de

- 5 tejidos de margen quirúrgico. La figura 1A son las localizaciones del amplicón de 522 pb (las líneas gruesas negras) y de las sondas de micromatriz para la detección de la metilación (los cuadrados negros) de las islas de CpG en GFRa1. La figura 1B es la comparación entre la intensidad de la señal de metilación del ADN en diferentes sectores de islas de CpG de GFRa1 en la base de datos del metiloma de ADN. Se observó una metilación diferencial en la región de promotor en carcinoma gástrico metastásico (M+) y cáncer gástrico no metastásico (M-).
- 10 La figura 2 son cromatogramas del amplicón de 522 pb de islas de CpG de GFRa1 metiladas y desmetiladas en el análisis por bisulfito-DHPLC. La figura 2A se refiere al resultado de GFRa1 desmetilado de líneas celulares humanas; la figura 2B es para el tejido gástrico; se utilizó el ADN genómico de los glóbulos blancos periféricos a modo de control negativo; se utilizó ADN sanguíneo metilado con M.sssl, a modo de control positivo.
- 15 La figura 3 es el resultado de la secuenciación por bisulfito de clones de PCR de 522 pb de islas de CpG de GFRa1 de líneas celulares humanas. Los puntos remarcados en negro representan los sitios de CpG metilados; GFRa1 se encuentra totalmente metilado en las células Du145, MKN45 y BGC823, parcialmente metilado en las células MKN74 y desmetilado en las células GES-1.
- 20 La figura 4 es el análisis de correlación entre los niveles de metilación de GFRa1 detectados mediante HPLC y el análisis de PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas de fluorescencia (MethyLight).
- 25 La figura 5 muestra la relación entre la desmetilación de GFRa1 y el nivel de transcripción. La figura 5A es un análisis de correlación que utiliza 19 líneas celulares humanas; la figura 5B es un análisis de correlación en carcinomas gástricos y tejidos de margen quirúrgico.
- 30 La figura 6 muestra una comparación entre el nivel de metilación de GFRa1 en biopsias normales o de gastritis procedentes de pacientes sin cáncer y de carcinomas gástricos y muestras de margen quirúrgico. La figura 6A muestra los porcentajes de GFRa1 metilado en tejidos gástricos en diferentes estados patológicos; la figura 6B muestra el valor de corte de la curva ROC de detección de carcinoma gástrico utilizando el contenido de metilación de GFRa1 en los tejidos gástricos de pacientes de cáncer y sin cáncer.
- 35 La figura 7 es la curva ROC de detección de la metástasis del cáncer gástrico mediante la utilización del contenido de desmetilación de GFRa1 como clasificador.
- 40 La figura 8 muestra la curva de Kaplan-Meier de tiempo de supervivencia global postoperatoria de 98 pacientes de cáncer gástrico de alta desmetilación o baja desmetilación de GFRa1 en la cohorte de descubrimiento.
- La figura 9 muestra la curva de Kaplan-Meier de supervivencia global postoperatoria de 120 pacientes de cáncer gástrico de alta o baja desmetilación de GFRa1 en la cohorte de validación.
- 45 La figura 10 es la comparación entre el nivel de metilación de GFRa1 en biopsias de colon procedentes de pacientes sin cáncer, y muestras de colon de cáncer y de margen quirúrgico.
- 50 La figura 11 es el valor de corte de la curva ROC de detección de carcinoma de colon utilizando el contenido de metilación de GFRa1 en biopsias de colon procedentes de pacientes sin cáncer y muestras de tejido de margen quirúrgico procedentes de pacientes con cáncer de colon.
- La figura 12 es la curva ROC de detección de metástasis y no metástasis de cánceres de colon utilizando el grado de desmetilación de GFRa1.
- 55 La figura 13 es la curva de Kaplan-Meier de tiempo de supervivencia global postoperatoria de 97 pacientes de cáncer de colon de alta o baja desmetilación de GFRa1.
- 60 La figura 14 es la curva ROC de detección de metástasis y ausencia de metástasis de cáncer de colon utilizando la alta o baja desmetilación de GFRa1, determinada mediante la utilización de un ensayo de PCR cuantitativo específico de metilación basado en sondas (MethyLight), a modo de clasificador.
- La figura 15 es la curva de Kaplan-Meier del tiempo de supervivencia global postoperatoria de 97 pacientes con cáncer de colon que contenían un nivel elevado o bajo de desmetilación de GFRa1 en el análisis de PCR cuantitativo específico de metilación basado en sondas (MethyLight).
- 65 La figura 16 es la curva ROC de detección de metástasis y ausencia de metástasis de CHC mediante la utilización de una alta o baja desmetilación de GFRa1.
- La figura 17 es la curva de Kaplan-Meier del tiempo de supervivencia global postoperatoria de 37 pacientes

con diferente grado de desmetilación de GFRa1.

La figura 18 son los resultados de secuenciación por bisulfito de los productos de PCR de 522 pb de las islas de CpG de GFRa1 en muestras de tejido gástrico. Los puntos remarcados en negro representan sitios de CpG metilados; GFRa1 se encuentra completamente desmetilado en las muestras F1309 y F1311 pero no desmetilado en otras muestras representativas.

A continuación, se proporciona una ilustración detallada de la invención mediante ejemplos vivos. Cuando no se indique, los materiales, métodos y equipos son todos los materiales, métodos y equipos habituales en el campo de la invención.

Formas de realización óptimas

Ejemplo 1: cribado para cáncer gástrico mediante la detección de la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en tejido gástrico mediante la utilización de DHPLC.

1. Sujetos: biopsias de mucosa gástrica procedentes de 48 pacientes sin cáncer (10 casos sin cambios patológicos observados en el estómago y 38 casos con gastritis crónica), carcinomas gástricos y las muestras correspondientes de tejido congelado de margen quirúrgico procedentes de 98 pacientes.
2. Digestión habitual de proteínas tisulares utilizando proteinasa K seguido de la extracción del ADN genómico (aproximadamente 10 µg) utilizando el método habitual de precipitación con etanol.
3. Modificación de los residuos de citosina no metilados en muestras de ADN utilizando bisulfito sódico 5 M, que incluía las etapas siguientes:
 - 1) Adición y disolución de 2 µg del ADN genómico preparado en la etapa 2 en 18 µl de agua destilada estéril; incubación del tubo en un baño de agua a 95°C durante 20 min, seguido de la incubación en un baño de hielo.
 - 2) Adición de 2 µl de NaOH 3 M, mezcla e incubación a 42°C durante 20 min para desnaturalizar el ADN de doble cadena.
 - 3) Preparación de solución de bisulfito sódico 5 M (NaHSO₃, 4 ml); adición de 1,9 g de Na₂S₂O₅ en 2,5 ml de agua destilada estéril; adición de 0,7 ml de solución de NaOH 2 M y 0,5 ml de hidroquinona 1 M; incubación en un baño de agua a 50°C, con inversión y mezcla repetidas hasta la disolución completa.
 - 4) Adición de 380 µl de solución fresca de NaHSO₃ 5 M y mezcla. Cobertura de la parte superior de la reacción con 200 µl de parafina líquida para evitar la evaporación de la reacción. Incubación en el baño de agua a 50°C durante la noche para convertir los residuos de citosina no metilados en residuos de uracilo.
 - 5) Retirada de la parafina líquida. Purificación del ADN modificado con el sistema de lavado de ADN Wizard (Promega A7280) siguiendo las instrucciones del kit: adición de 1 ml de la mezcla de resina y dejar en reposo durante 5 minutos después de la mezcla; transferir la mezcla de resina-ADN a un tubo inyector conectado a un filtro de microcolumna; eliminación de la fase líquida y transferencia de la muestra de ADN a la fase sólida en el filtro de microcolumna bajo vacío; adición de 2 ml de alcohol isopropílico al 80%, eliminación del líquido en el filtro inyector bajo vacío y desconexión del tubo inyector; ajuste del filtro de microcolumna a otro tubo de centrifuga (1,5 ml), centrifugación a alta velocidad (10.000g, 20 segundos) para eliminar el líquido residual en el filtro de columna, fijación del filtro de microcolumna a otro tubo de centrifuga.
 - 6) Adición de 50 µl de agua destilada estéril (precalentada a 80°C) a la microcolumna, reposo durante 15 min, centrifugación a alta velocidad (10.000g, 20 segundos) para recoger el eluyente. Repetición de dicho procedimiento de lavado. Agrupado de la solución de eluyente.
 - 7) Adición de 11 µl de solución de NaOH 3 M, mezcla e incubación en el baño de agua a 37°C durante 15 min para terminar cualquier modificación posterior.
 - 8) Adición de 166 µl de NaOAc 5 M y 750 µl de etanol frío al 100%, mezcla y almacenamiento a -20°C durante 4 horas para precipitar el ADN. Centrifugación a 10.000g durante 30 min y descarte de la solución. Adición de 200 µl de etanol frío al 80% para lavar el ADN. Nueva centrifugación y descarte de la solución.
 - 9) Resuspensión del ADN en 3~6 µl de agua estéril o tampón TE. Utilización inmediata o almacenamiento a -20°C.

4. Diseño de los juegos de cebadores de PCR. Según la secuencia de la cadena de sentido de GFRa1 modificado (SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2), diseño y síntesis de juegos de cebadores universales libres de CpG (SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 o SEC ID nº 7; SEC ID nº 8).
5. Amplificación por PCR. Se amplificaron tanto los fragmentos metilados como desmetilados (522 pb o 463 pb) en los alelos de GFRa1 en la muestra de ADN modificado mediante la utilización de una PCR de inicio en caliente.
6. Detección de las islas de CpG de GFRa1 metiladas y desmetiladas en el producto de PCR mediante la utilización de DHPLC. Cálculo de la proporción de superficie bajo el pico para GFRa1 desmetilado:
- porcentaje de GFRa1 desmetilado = [superficie del pico para GFRa1 desmetilado] / [total de las superficies de pico de los productos de PCR de GFRa1 desmetilado y metilado] x 100%,
- o cálculo del GFRa1 metilado:
- porcentaje de GFRa1 metilado = [superficie del pico para GFRa1 metilado] / [total de las superficies de pico de los productos de PCR de GFRa1 desmetilado y metilado] x 100%, o
- el porcentaje de GFRa1 metilado = 1- (la proporción de superficie de pico para GFRa1 desmetilado).
7. Resultados: la proporción media de superficie de pico para GFRa1 metilado en biopsias gástricas normales era similar a la misma en biopsias de gastritis y el porcentaje medio de GFRa1 metilado en dichas muestras normales/ de gastritis era de 60,4% (mediana), que era significativamente superior a la observada en carcinomas gástricos y en las muestras de margen quirúrgico (51,0%, p=0,043, y 14,5%, p=0,000, figura 6A), respectivamente. Por lo tanto, se calculó la curva característica del receptor-operador (ROC) para el cribado de los carcinomas gástricos utilizando el porcentaje de metilación de GFRa1 como biomarcador. Al fijar el valor de corte en 22,8% ($\leq 22,8\%$ positivo para desmetilación y $> 22,8\%$ negativo para desmetilación), la tasa de positivo para desmetilación en muestras normales/de gastritis (15/48=31,2%) era mucho más baja que en el margen quirúrgico (77/98=78,5%) y que en tejidos de cáncer gástrico (60/98=61,2%) (P<0,001). La sensibilidad y especificidad de la positividad para desmetilación de GFRa1 en tejido de margen quirúrgico para el cribado de cáncer gástrico era de 79% y 69%, respectivamente (figura 2B).

Ejemplo 2: detección de metástasis de carcinomas gástricos y supervivencia del paciente mediante la detección de la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 mediante la utilización de DHPLC

1. Sujetos: muestras de tejido congelado de carcinoma gástrico procedentes de 98 pacientes (incluyendo 49 pacientes con carcinomas gástricos con metástasis a linfa o sitios distantes y émbolo y 49 pacientes con carcinomas gástricos no metastásicos) en la cohorte de descubrimiento. Muestras de tejido congelado de carcinoma gástrico procedentes de 120 pacientes (incluyendo 73 carcinomas gástricos con linfa pero no metástasis distante y 47 carcinomas gástricos no metastásicos) en la cohorte de validación. Los datos clínico-patológicos y de seguimiento se encuentran disponibles para la totalidad de dichos sujetos.
2. Igual que las etapas 2 a 5 en el Ejemplo 1.
3. Igual que la etapa 6 en el Ejemplo 1.
4. Resultados:

La proporción media de superficie de pico para GFRa1 metilado en 49 muestras de carcinoma gástrico no metastásico era significativamente más elevada que en 49 muestras de carcinoma gástrico metastásico (mediana, 60,6% vs. 22,8%, P=0,044). Según la curva ROC para la detección de metástasis de carcinoma gástrico utilizando la metilación de GFRa1 como clasificador, la superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 65,6% (P=0,004, figura 7). Al fijar el valor de corte en 16,4% ($\leq 16,4\%$ para alta desmetilación de GFRa1 y $> 16,4\%$ para baja desmetilación), la tasa de alta desmetilación en carcinomas gástricos metastásicos (35/49=71%) era significativamente más alta que en carcinomas gástricos no metastásicos (24/49=49%) (P=0,038; sensibilidad de 71% y especificidad de 51%). El análisis de Kaplan-Meier demostró que la supervivencia global del paciente con alta desmetilación de GFRa1 era más corta que en pacientes con baja desmetilación (tasa de supervivencia a 5 años, 32,8% vs. 62,2%; prueba de rangos logarítmicos, P=0,001; análisis multivariante, P=0,002, figura 8).

En la cohorte de validación, la proporción media de superficie de pico para GFRa1 metilada en 47 tejidos de cáncer no metastásico era significativamente más alta que en 73 casos metastásicos (mediana, 49,0% vs. 30,6%, P<0,001). Utilizando el mismo valor de corte (16,4%) utilizado en la cohorte de descubrimiento anterior, la tasa de alta desmetilación de GFRa1 en los casos metastásicos (46/73=63,1%) era significativamente más alta

que en casos no metastásicos (19/47=40,4%) (P=0,024; sensibilidad de 63% y especificidad de 60%). El análisis de Kaplan-Meier también demostró que los pacientes de alta desmetilación presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes de baja desmetilación (tasa de supervivencia a 5 años, 47,7% vs. 71,7%; prueba de rangos logarítmicos, P=0,015; análisis multivariante, P=0,025, figura 9).

Ejemplo 3: cribado para cáncer gástrico mediante la detección de desmetilación de islas de CpG de GFRa1 en tejido gástrico utilizando la secuenciación por bisulfito

1. Igual que las etapas 1 a 5 en el Ejemplo 1.
2. Se clonaron los productos de PCR utilizando el kit AT-Clone y se secuenciaron (figura 18).
3. Resultados: se obtuvieron los mismos resultados que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4: detección de metástasis de carcinomas gástricos y supervivencia del paciente mediante la detección de desmetilación de islas de CpG de GFRa1 utilizando la secuenciación por bisulfito

1. Igual que las etapas 1 a 2 en el Ejemplo 2.
2. Igual que la etapa 2 en el Ejemplo 3.
3. Resultados: se obtuvieron los mismos resultados que en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5: cribado para cáncer de colon mediante detección de desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en tejido de colon mediante la utilización de DHPLC

1. Sujetos: muestras de biopsia de mucosa de colon procedentes de 21 pacientes sin cáncer y de cáncer de colon y muestras de margen quirúrgico procedentes de 97 pacientes.
2. Igual que las etapas 2 a 6 en el Ejemplo 1.
3. Resultados:

La proporción media de GFRa1 metilado en las biopsias de colon de pacientes sin cáncer (mediana, 64,1%) era significativamente más alta que en carcinomas de colon (31,6%, P<0,001) y que en tejidos de margen quirúrgico (26,6%, P=0,001, figura 10). La superficie bajo la curva ROC era de 74,1% según los resultados de análisis de metilación en tejidos de cáncer y biopsias de control procedentes de pacientes sin cáncer (P<0,001, figura 11). Al fijar el valor de corte en 34,5% ($\leq 34,5\%$ positivos para desmetilación y $>34,5\%$ negativos para desmetilación), la tasa de positivo para desmetilación de GFRa1 en 21 biopsias de control procedentes de pacientes sin cáncer (7/21=33,3%) era significativamente más baja que en 97 muestras de margen quirúrgico (93/97=95,8%, P<0,001) y que en 97 muestras de cáncer (60/97=61,9%, P<0,001). Utilizando la positividad de desmetilación de GFRa1 en biopsias sin cáncer o en muestras de margen quirúrgico como biomarcador para el cribado para cáncer de colon, la sensibilidad y especificidad fue de 95,8% y 66,7%, respectivamente.

Ejemplo 6: detección de metástasis de carcinomas de colon y supervivencia del paciente mediante la detección de desmetilación en islas de CpG de GFRa1 mediante la utilización de DHPLC

1. Sujetos: tejidos de cáncer de colon procedentes de 49 pacientes sin metástasis y tejidos de cáncer de colon metastásico procedentes de 48 pacientes de control. Se encuentran disponibles los datos clínico-patológicos y de seguimiento para todos los sujetos anteriormente indicados.
2. Igual que las etapas 2 a 6 en el Ejemplo 1.
3. Resultados: la proporción media de GFRa1 metilado en 49 cánceres de colon no metastásico era significativamente más alta que en 48 cánceres metastásicos (mediana, 45,6% vs. 25,0%, P=0,016). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 62,6% (P=0,033, figura 12). Al fijar el valor de corte en 27,6% ($\leq 27,6\%$ positivos para alta desmetilación de GFRa1 y $>27,6\%$ para baja desmetilación), la tasa de positivo para alta desmetilación de GFRa1 en 48 cánceres metastásicos (33/48) era significativamente más alta que en 49 cánceres no metastásicos (22/49) (68,8% vs. 44,9%, P=0,024, sensibilidad de 69% y especificidad de 55%). El análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes de cáncer con alta desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes de baja desmetilación (tasa de supervivencia a 3 años, 41,8% vs. 66,7%; prueba de rangos logarítmicos, P=0,019; análisis multivariante, P=0,031, figura 13).

Ejemplo 7: cribado para cáncer de colon mediante la detección de desmetilación de islas de CpG de GFRa1 en tejido de colon utilizando la PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas (MethyLight)

- 5 1. Sujetos: los mismos que en la etapa 1 en el Ejemplo 5.
2. Gestión de las muestras de ADN: igual que las etapas 2 a 3 en el Ejemplo 1.
- 10 3. De acuerdo con la secuencia de la cadena de sentido (SEC ID nº 1) o la cadena antisentido (SEC ID nº 3) de GFRa1 modificado con bisulfito, diseño y síntesis de los cebadores de PCR directo e inverso (SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10) y la sonda fluorescente específica de secuencia (SEC ID nº 11) para la secuencia de la cadena antisentido, o diseño y síntesis de los cebadores de PCR directo e inverso (SEC ID nº 12, SEC ID nº 13) y sonda fluorescente específica de secuencia (SEC ID nº 14) para la secuencia de la cadena de sentido.
- 15 4. Amplificación por PCR cuantitativa basada en sondas fluorescentes: el molde modificado con bisulfito de 158 pb en los alelos de GFRa1 tanto metilados como desmetilados se amplificó utilizando amplificación por PCR cuantitativa fluorescente.
- 20 5. Tal como se informa en la literatura (Widschwendter et al., Cancer Res. 64:3807-3813, 2004), el gen COL2A libre de islas de CpG (aunque sin limitarse a este gen) como gen de referencia para normalizar la cantidad de molde de ADN modificado con bisulfito de entrada, se amplificó utilizando el juego de cebadores correspondiente (SEC ID nº 15 y SEC ID nº 16) y la sonda fluorescente (TaqMan, secuencia SEC ID nº 17, 6FAM-Col2a^{sonda}-BHQ1).
- 25 6. Cálculo de la proporción de moldes de GFRa1 metilados: basándose en los valores de Ct para GFRa1 y COL2A1, se calculó el número relativo de copia de GFRa1 metilado utilizando la fórmula $[2^{-Ct_{GFRa1}} / 2^{-Ct_{COL2A1}}]$.
- 30 7. Resultados: la proporción media de GFRa1 metilado en biopsias de colon normal (mediana, 46,8%) era significativamente más elevada que en muestras de carcinoma de colon (12,6%, $P < 0,01$) o en los tejidos de margen quirúrgico correspondientes (0,0005%, $P < 0,01$). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 69,7% ($P < 0,05$). Al fijar el valor de corte en 1,3% ($\leq 1,3\%$ positivo para desmetilación de GFRa1 y $> 1,3\%$ negativo para desmetilación), la tasa de positivo para desmetilación en biopsias de colon procedentes de pacientes sin cáncer (8/20=40%) era significativamente más baja que en tejidos de margen quirúrgico (16/20=80%) y que en tejidos de cáncer de colon (97/97=100%, $P < 0,001$). La sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer de colon utilizando la alta desmetilación fue de 80~100% y 60%, respectivamente.

Ejemplo 8: detección de metástasis de carcinomas de colon y supervivencia del paciente mediante detección de desmetilación de islas de CpG de GFRa1 utilizando la PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas (MethyLight)

- 45 1. Sujetos: igual que la etapa 1 en el Ejemplo 6.
2. Gestión de muestras de ADN y cuantificación de GFRa1 metilado: igual que las etapas 2 a 6 en el Ejemplo 7.
- 50 3. Fijación del valor de corte. El número de copia relativo medio de GFRa1 metilado en 49 cánceres de colon metastásicos era significativamente más elevado que en 48 muestras de cáncer de colon metastásico (mediana, 13,6% vs. 9,7%, $P = 0,047$). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 61,7% ($P = 0,047$, figura 14). Al fijar el valor de corte en 22,3% ($\leq 22,3\%$ para alta desmetilación de GFRa1 y $> 22,3\%$ para baja desmetilación), la tasa de positivo para alta desmetilación en 48 cánceres metastásicos (40/48) era significativamente más elevada que en 49 cánceres no metastásicos (31/49) (83,3% vs. 63,3%, $P = 0,038$; sensibilidad de 83% y especificidad de 37%). El análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes de cáncer con alta desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global significativamente más corta que los pacientes de baja desmetilación (tasa de supervivencia a 3 años, 46,5% vs. 69,2%, $P = 0,056$, figura 15).

Ejemplo 9: cribado para cánceres mediante detección de la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 en ADN libre de plasma utilizando la PCR cuantitativa específica de metilación basada en sondas (MethyLight)

- 65 1. Sujetos: igual que los Ejemplos 1 y 5; se prepararon 0,3 ml de plasma venoso anticoagulado a partir de dichos sujetos en ayuno.

2. Según el manual de instrucciones del kit de extracción de ADN de sangre (QIAGEN, Alemania), se extrajo una muestra libre de ADN a partir de 0,3 ml de muestra de plasma procedente de sujetos con cáncer y de sujetos de control sin cáncer.
- 5 3. Igual que la etapa 3 en el Ejemplo 1.
4. Igual que las etapas 3 a 6 en el Ejemplo 7.
- 10 5. Resultado: la proporción media de GFRa1 metilado en la muestra de ADN libre de plasma procedente de sujetos de control sin cáncer era significativamente más elevada que en sujetos de cáncer de colon (mediana, 66,5% vs. 10,2%, $P < 0,01$). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 79,5% ($P < 0,01$). Al fijar el valor de corte en 2,3% ($\leq 2,3\%$ positivo para desmetilación de GFRa1 y $> 2,3\%$ negativo para desmetilación), la tasa de positivos para desmetilación de GFRa1 en las muestras de plasma procedentes de sujetos sin cáncer (4/20=20%) era significativamente más baja que la de pacientes de cáncer de colon (97/97=100%). La sensibilidad y especificidad para el cribado del cáncer de colon utilizando la desmetilación de GFRa1 en plasma como biomarcador eran de 100% y 80%, respectivamente.

Ejemplo 10: detección de metástasis de carcinomas hepatocelulares y supervivencia del paciente mediante la detección de la desmetilación de las islas de CpG de GFRa1 mediante la utilización de DHPLC

- 20 1. Sujetos: muestras de carcinoma hepatocelular procedentes de 37 pacientes, incluyendo 17 casos con metástasis/recurrencia y 20 casos sin metástasis/recurrencia. Los datos clínico-patológicos y de seguimiento se encuentran disponibles para la totalidad de dichos sujetos.
- 25 2. Gestión del ADN y análisis de GFRa1 metilado: igual que las etapas 2 a 6 en el Ejemplo 1.
- 30 3. Resultados: la proporción media de GFRa1 metilado en 20 carcinomas hepatocelulares no metastásicos era significativamente más alta que en 17 casos de metástasis (mediana, 55,6% vs. 41,4%, $P = 0,065$). La superficie bajo la curva ROC (AUC) era de 68,4% ($P = 0,060$, figura 16). Al fijar el valor de corte en 49,3% ($\leq 49,3\%$ alta desmetilación de GFRa1 y $> 49,3\%$ para la baja desmetilación, la tasa de positivos para alta desmetilación de GFRa1 era más elevada en los cánceres metastásicos (12/17=70,5%) que en cánceres no metastásicos (11/20=55,0%) ($P = 0,067$). La sensibilidad y especificidad de detección de la metástasis de cáncer de hígado utilizando la alta desmetilación de GFRa1 como biomarcador era de 70% y 45%, respectivamente. El análisis de Kaplan-Meier mostró que los pacientes con cáncer de hígado con elevada desmetilación de GFRa1 presentaban una supervivencia global más corta que los pacientes con cánceres de hígado con baja desmetilación de GFRa1 (figura 17).

Listado de secuencias

- 40 <110> BEIJING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
- <120> MÉTODOS Y FRAGMENTOS NUCLEOTÍDICOS DE PREDICCIÓN DE LA INCIDENCIA, LA METÁSTASIS DE CÁNCERES Y LA SUPERVIVENCIA POSTOPERATORIA DE PACIENTES *IN VITRO*
- 45 <130> CNB1U1200001
- <160> 17
- 50 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2567
- <212> ADN
- 55 <213> Síntesis artificial

ES 2 675 727 T3

<400> 1

gggauuuuat	tguuutgaaa	gaataaataa	gtaataaauu	aaautggutu	utcgucguag	60
utggacgcgg	tcggttgagt	uuaggttggt	gguatttggg	gtttttttcg	ttutgtttgg	120
gaauuuattg	ucgutttuucg	tuuuttuuuu	uuautuuttu	ttuuuuuuuu	utucgguuau	180
uuuttttttt	ttgutggcgt	utuuaaautt	taggguuucgg	ggggcgutcg	tggcgucggg	240
utguauutgu	cgggguacgu	cgggautgcg	ggucggcgcg	utcguuutgg	gutgggggtgc	300
ggaagcguuc	gagt uuttggg	uaucgggcga	gagtgtgaga	ggagcggacg	uuuaggaggg	360
agucgaggac	gcgcggcggg	tagggggtag	gggcguagga	aucgggtttu	aguuuuagtc	420
gggauatcgg	ttuuuuutgg	utggcgguu	tutggaggga	gacgagtuuc	ggggagaagg	480
agggcggcga	utggggtag	ggattggcga	tcggagtggg	gaggucgggc	ggutgagcga	540
gutcgutggu	tgacgcgagg	agggggaggu	uaautttuucg	ggagaagggg	uttttcggc	600
guuagggtg	gutagggagu	tgucgucguc	guuauucagg	gutcggautu	uagguagutg	660
uaggutucgu	tcgcgacguc	cggaaagtau	cgtttattta	tttattttgut	tgcgttuagc	720
gtutcggtt	gaauuuuaa	gauuuuuuu	tggautttag	gaauuuttt	uagauututu	780
uaguuutuau	utuuaatuuu	gtgtuagcgg	uuuutggaaa	auacguauat	guauuucgau	840
utgggtgggg	gtgggtuutu	auuucgggtg	tggaaattuu	uuaaagggcg	gaacggggga	900
ggggagagg	ttutgtgggg	ggagtutucg	gcgututucg	ututuatuuu	aaagcgcguu	960
utuuttuaa	ggttgggtcg	gauutgaauu	uuta aaagcg	gaaucguutu	ucguuutcg	1020
uatuucggag	utgagtcguc	ggcggcggtg	gutgutguua	gauucggagt	ttuuttttt	1080
autggatgga	gutgaauttt	ggcggguuag	aguaguauag	utgtucgggg	atcgutguac	1140
gutgagutuu	utcguaaaga	uuuagcggcg	gutcgggatt	tttttggggg	ggcgggggau	1200
aguuucgcu	cgguaauatg	ttuutggcga	uuutgtautt	cgcgutgucg	utttgggta	1260
agtcgagguu	cgucgcgggu	ttuttuuuu	tutgagtutt	tuutagggtc	guttguagua	1320
guuuuuucg	uuutucguau	uaaaattggg	gcgcgggtgt	ggtggatgtg	gaaggaagaa	1380
gtgtuttttt	ggggaatggg	atcgcaatu	uucgggttag	ggagggcgtg	gcggcgcgcg	1440
gutguutgaa	guttttcggg	uttggttttg	atuuutgtg	gtttttaatg	auuuauuttg	1500
gcgggggaut	aagaaguuut	uuaguuuagg	guuutguuuu	uuuagagagt	ututgggagu	1560
tcgcgaguc	gcggcgguua	ggtggagttg	gggaguattg	gggucgggag	aguauuuttg	1620
gaagagaaaa	gtttttuucg	agtaguttut	ggguaututu	cguucggcgg	aucgutgauu	1680
atggutgguu	tguuucgcuu	uuagcgcgcg	uucgggtguu	agtucgucgu	cguauttttu	1740
utcgaaaagc	guutgagttt	uagucgggcg	gagcgggtgg	utggagucgg	gggtggguucg	1800
ggaguucggg	tcgttgutua	gguuaggatg	uuucggggcg	gaggguucgac	gtgcgcggtg	1860
gguagcguag	gututggagu	aaauuttgga	aguucgcggg	utgaguutgc	guuauttttu	1920
uttgcggguu	cgggagggag	agagaggagu	tggaaattua	ggggcgggga	aaatggautu	1980
ucggatggtc	gagaggtgga	uucgutuuua	gaguagggcg	uuuucgaagg	utggtuaagu	2040
atuuutgaaa	cgggcgcgcg	uuutcgucg	gaguaggggc	ggucggggtu	uucguucguc	2100
gautuaggu	tuuutuuuu	utguuucgua	gauttgutuu	tgtcggucga	agtgagcggc	2160
ggagaucguu	tggattgcgt	gaaaguuagt	gatuaagtgu	tgaaggagua	gagutguagu	2220
auuaagtauc	guacgutaag	guagtgcgtg	gcggguuagg	agauuaautt	uaguutggua	2280
tucgguutgg	agguuaagga	tgagtgucgu	agcguuatgg	agguuutgaa	guagaagtcg	2340
ututauaaut	gucgutguaa	gcggggtatg	aagaaggaga	agaaugtuut	gcguatttau	2400
tggaguatgt	auuagaguut	guagggtagc	cgtggaauut	uuuuuuuuu	uuucgtgtuu	2460
utuucgaaag	guagcggguu	utttcgtuuu	tggguuagut	gatutuatu	tuuautuaut	2520
tutuuiuagu	tguagagtga	ggauutttuu	ttgguuuuua	gggaaaua		2567

<210> 2

<211> 2567

<212> ADN

<213> Síntesis artificial

5

ES 2 675 727 T3

<400> 2

gggauuuuat	tguuutgaaa	gaataaataa	gtaataaaau	aaautggutu	utuguuguag	60
utggauugug	tuggttgagt	uuaggttggt	gguatttgga	gtttttttug	ttutgtttg	120
gaauuuattg	uuguttuuug	tuututtuu	uuautuuttu	ttuuuuuuu	utuugguuau	180
uuuttutttt	ttgutggugt	utuuuaautt	tagguuuugg	ggguugutug	tgguguuggg	240
utguauutgu	ugggguaugu	uggautgug	gguggugug	utuguuutgg	gutggggtgu	300
ggaaguguuu	gagtuutggg	uaugggguga	gagtgtgaga	ggaguggaug	uuuaggaggg	360
aguugaggau	guguggggg	tagggggtag	gggugaagg	auugggtttu	aguuuuagtu	420
gggauatugg	ttuuuuutgg	uttggugguu	tutggaggga	gaugagtuuu	gggggagaagg	480
agggugguga	utggggutag	ggattgguga	tuggagtggg	gaggguuggu	ggutgaguga	540
gutugutggu	tgauugagg	agggggaggu	uaauttuug	ggagaagggg	ututtuggu	600
guuagggutg	gutagggagu	tguuguuguu	guuuuagg	gutuggautu	uagguagutg	660
uaggutuugu	tugugaugut	uggaaagtau	ugtttattta	tttatttgut	tgugttuagu	720
gtutugggtt	gaauuuaua	gauuuuuut	tggautttag	gaauuuttt	uagauututu	780
uaguuuuau	utuuaatuuu	gtgtuagugg	uuuutggaaa	auauguauat	guuuuuugau	840
utgggtgggg	gtgggtuutu	auuuuggtgt	tggaaattuu	uuaaaggugg	gaauggggga	900
ggggagaggg	ttutgtgggg	ggagtutuug	gugututuug	ututuatuutu	aaaguguguu	960
utuuttuuu	ggttgggtug	gauutgaauu	uutaaaagug	gaauguutu	uuguuutugu	1020
uatuuuggag	utgagtuguu	ggugguggtg	gutgutguua	gaauggagtg	ttuuttttu	1080
autggatgga	gutgaauttt	gggugguuag	aguaguauag	utgtuugggg	atugutguau	1140
gutgagutuu	utugguaaga	uuuaguggug	gutugggatt	tttttggggg	ggugggggaa	1200
aguuuugugu	uggauuuatg	ttuutgguga	uuutgtautt	ugugutguug	ututtgggtg	1260
agtugagggu	uguugugggu	ttuttuuuu	tutgagtutt	tuutagggtu	guttguagua	1320
guuuuuuuug	uuutuuguau	uaaaattggg	gugugggtgt	ggggatgtg	gaaggaagaa	1380
gtgtuttttt	ggggaatggg	atugugaatu	uuugggttag	ggagguggtg	gugguguggu	1440
gutguutgaa	guttttuggg	uttggttttg	atttuutgtg	gtttttaatg	auuuauuttg	1500
gugggggaut	aagaaguut	uuaguuuagg	guuutguuu	uuuagagagt	ututgggagu	1560
tuguggaguu	guggugggua	ggtggagtgg	gggaguattg	ggguuggggg	aguuauuttg	1620
gaagagaaaa	gtttttuuug	agtaguttut	ggguaututu	uguuugggug	auugutgaa	1680
atggutgggu	tguuuugugu	uuagugugug	uuuggtguuu	agtuuguugu	uguautttu	1740
utuggaaagu	guutgagttt	uaguugggug	gagugggtgg	utggaguugg	gggtggguug	1800
ggaguuuugg	tugttgutua	gguuaggatg	uuuuggggug	gaggguugau	gtguguggtg	1860
gguaguguag	gututggagu	aaauuuttga	aguuuugggg	utgaguutgu	guuautttu	1920
uttguggguu	ugggaggagg	agagaggagu	tggaaattuu	ggggguggga	aaatggautu	1980
uuggatggtu	gagaggtgga	uuugutuua	gaguagggug	uuuuugaagg	utggtuaagu	2040
atuuutgaa	ugggugugug	uuutuguuug	gaguaggggu	gguuugggtu	uuuguuuguu	2100
guautuaggu	tuutuuuuu	utguuuugua	gauttgutuu	tgtugguuga	agtgaguggu	2160
ggagauguuu	tggattgugt	gaaaguagtg	gatuagtguu	tgaaggagua	gagutguagu	2220
auuaagtau	guaugutaag	guagtgugt	guggguagg	agauuaautt	uaguutggu	2280
tuugguutgg	agguuaagga	tgagtguugu	aguguuatgg	agguuutgaa	guagaagtug	2340
ututauaaut	guugutguaa	guugggtatg	aagaaggaga	agaautguut	guquatttau	2400
tggaguatgt	auuagaguut	guagggtaug	ugtggaaaut	uuuuuuuuu	uuuugtgtuu	2460
utuuuuugaag	guaguggggu	uttugtuuu	tggguuagut	gatutuatu	tuuautuaut	2520
tutuuuuagu	tguagagtga	ggauuttuu	ttgguuuuu	gggaa		2567

<210> 3

<211> 2567

<212> ADN

<213> Síntesis artificial

5

ES 2 675 727 T3

<400> 3

ttgtuuutgg	ggguuaagga	aaggtuutua	ututguagut	ggggagaagt	gagtggagga	60
tgagatuagu	tgguuuaggg	acgaaagguu	cguutguutt	cggggagggg	uacgggggtgg	120
ggtggggagg	ttuuacgcgt	auuutguagg	ututggtaua	tgutuuaagta	aatgcguagg	180
uagttuttut	uuttuttuat	auuucguttg	uagcgguaag	tgtagagcga	uttutguttu	240
aggguuuuua	tggcgutgcg	guautuatuu	ttgguuuuua	ggucggatgu	uaggutgaag	300
ttggtutuu	tguucguuac	guautguutt	agcgtgcggt	auttgggtg	guagututgu	360
tuuttuaggu	autgatuaut	ggtttuacg	uaatuuaggc	ggtutucguc	gutuauttcg	420
gucgauagga	guaagtutgc	ggguagaggg	ggagggaguu	tgagtgcggc	gggccccggu	480
uucggguuu	uutgutucgg	gcgagggcgc	gcguucgggt	uagggatgut	tgauuaguut	540
tcggggcgcu	uutgututgg	gagcgggtuu	auutucgau	uatucgggag	tuuattttuu	600
cguuuuutgg	aattuuagut	uutututuut	uutuucgggu	ucguaaggaa	gagtggcgua	660
ggtuaguuc	gcggguttua	agggtttg	uuagaguutg	cgutguuuau	cgcguaacct	720
gguuutucgu	uucgggguat	uutgguuatg	gaaacgauuc	gggtuucgg	guuuuuuucg	780
gutuuaguua	uucgutucgu	ucggutgaaa	utuagggcgt	ttucgaggag	aagtgcggcg	840
gcggautggg	uucgggccc	gcggtggggc	cgggguaggu	uaguuatggt	uagcgggtucg	900
ucgggcccgg	agtguuuaga	agutautcgg	gaaaaauttt	tututtuuua	gtttgtututu	960
ucgguuuuua	tgutuuuuua	utuauuutgu	ucgucgcggg	tucgcgagut	uuuagagaut	1020
ututgggggt	guaggguuut	gggtggagg	guttuttagt	uuuucguuaa	gttgggtuat	1080
taaaaauuuu	uucgagucgu	aaauaaguuc	gaaaaguttu	agguagcguc	gcgucguuuu	1140
cguutuuaa	auucggggat	tcgcgatuuu	attuuuuuaa	aagaaauttu	ttuuttuuau	1200
atuuuuuaa	uucgcguuuu	aattttgggt	cggagggcgg	ggtgggtgu	tguaagcgau	1260
uutaggaag	autuagaggg	taagaaaguu	cgcgccgggu	utcgauttau	uuuagagcgg	1320
uagcgcgaag	tauagggtcg	uuaggaauat	ggtgucggcg	cggggtgggt	uuuucguuuu	1380
uuaaaaaaat	uucgagucgu	cgutgggtut	tgucgaggga	gutuaquatg	uagcgatuuu	1440
cggauagutg	tgutgututg	gucguuuuaa	gttuagutuu	atuuaagtga	agaggaaaut	1500
ucgggtutgg	uaguaguuuu	cgucgucggc	gautuagutu	cgggatggcg	agggcgggag	1560
gcggttucgu	ttttaggggt	tuaggtucga	uuuuuutgg	aaggaggggc	gcgutttagg	1620
atgagucggg	agagcguccg	agautuuuuu	uuuagaauuu	tutuuuutuu	uucgttuucg	1680
uuttgaggga	atttuuuaa	ucgggggtgag	gauuuuuuuu	uuuuuaggtc	gggggtuatg	1740
tgcggtgttt	uuaggggucg	utgauacggg	gatggaggtg	agggutggag	aggtutgaag	1800
agggttuuta	aagtuaagg	gggtgtutgt	tgggttuauu	ucgagacgut	gaacguuagu	1860
aaataaataa	ataaacggta	uttucgagc	gtcgcgagcg	gaguuatguag	utguutggag	1920
tucgaguuuu	cggtggcggc	ggcgguaag	uuutaguuag	uuutggcguc	gaaagaguuu	1980
uttutuucgg	gaagttgggu	tuuuuuuuu	cgcgtauuu	agcgagutcg	utuagucguc	2040
gguuuuuuu	autucgatcg	uuuauuuta	guuuuagtcg	ucguuuuuu	tutuucgggg	2100
autcgtutuu	utuuaagaggu	cguuaaguua	gggggaucg	atgtuucgau	tggggtgaa	2160
auucggttuu	tgcguuuuu	uuuuuauuc	gucgcgcgtu	utcggtuuu	tuutgggctg	2220
ucgutuuut	uauaututcg	uucgggtuuu	aggtutcggg	cguttucgua	uuuuaguuuu	2280
gggcccggcg	gucgguuucg	agtuucggcg	tguuucggua	ggtguaguuc	ggcguuacga	2340
gcguuuuuucg	gguuuuaaag	ttgggagacg	uuaguaaaaa	gaaaggggtg	gucggaggag	2400
gggggaagaa	ggagtgggga	agagggacgg	gaagcguuaa	tggttuuuu	aaugaacga	2460
aaaaaautuu	aaatguuuu	aaautggaut	uaaucgaucg	cgtuuagutg	cggcgaggag	2520
uuagtttgtt	tatttautta	tttattuttt	uaggguaatg	gtgtuuu	2567	

- 5 <210> 4
- <211> 2567
- <212> ADN
- <213> Síntesis artificial

ES 2 675 727 T3

<400> 4
 ttgtuuutgg ggguaaagga aaggtuutua ututguagut ggggagaagt gagtggagga 60
 tgagatuagu tgguuuaggg augaaagguu uguutguutt ugaggagggga uagggggtgg 120
 ggtggggagg ttuuauugut auuutguagg ututggtaua tgutuuaagta aatguguagg 180
 uagttuttut uuttuttuat auuuuguttg uagugguagt tgtagaguga uttutguttu 240
 aggguuuuua tggugutgug guautuatuu ttgguuuuua gguuggatgu uaggutgaag 300
 ttggtutuuu tguuuguuau guautguutt agugtuggg auttgggtgut guagututgu 360
 tuuttuaggu autgatuaut gguttuauug uatuuaggu ggtutuuguu gutuauttug 420
 guugauagga gaaagtutgu gggguagagg ggaggggaguu tgagtugggg gggugggggau 480
 uuugguuguu uutgutuuug guaggggugug guguuugggt uagggatgut tgauuaguut 540
 tuggggguguu uutgututgg gagugggtuu auututugau uatuuaggag tuuattttuu 600
 uguuuuutgg aattuagut uutututuut uutuuugggu uuguaaggaa gagtggugua 660
 ggutuaguuu guggguttua agggtttgut uuagaguutg ugutguuuau uguguaugtu 720
 gguuutuugu uuugggguat uutggguutga guaauguuuu gggutuuumgg guuuuuuuug 780
 gutuuaguua uuugutuugu uuggutgaaa utuaggugut ttuugaggag aagtguggug 840
 guggautggg uauugggugug gugutgggug ugggguaaggu uaguuatggg uaguggtuug 900
 uugggugggag agtguuuaga agutautugg gaaaaauttt tututtuuua gtttgututu 960
 uuugguuuaa tgutuuuuua utuuauutgu uuguuguggu tuugugagut uuugagaut 1020
 ututgggggt guaggguuut gggutggagg guttuttagt uuuuuguuua gttgggtuat 1080
 taaaauuuuu aggaaatuaa aauuaaguuu gaaaaguttu agguaguguu guguuuuuuu 1140
 uguutuuaa auuuggggat tugugatuuu attuuuuuaa aagaaauttu ttuuttuuau 1200
 atuuuuuaa uuuguuuuu aattttgggtg uggagggugg ggtgggtgu tguuagugau 1260
 uutaggaaag autuagagg taagaaaguu uguggugggg utugauttau uuugagugg 1320
 uagugugaag tauagggtug uuaggaauat ggtguuggug uggggutggg uuuuuuuuu 1380
 uuaaaaaaat uuugaguugu ugutgggtut tgugaggga gutuaguatg uagugatuuu 1440
 uggauagutg tgutgututg guuuguuaaa gttuagutuu atuuagtga agaggaaaut 1500
 uuugggtutg uaguuuuuu uguuuuggu gautuagutu ugggatggug agggugggag 1560
 gugggtuuuu ttttaggggt tuaggtuuga uuuuuuutgg aaggaggggg gugutttgag 1620
 atgagagugg agaguuuug agautuuuuu uauagaauuu tutuuuuuu uuugttuuug 1680
 uutttgggga atttuuaaua uuugggtgag gauuuuuuu uuuuuaggtu ggggtguatg 1740
 tgugtgtttt uuagggguug utgaauggg gatggagggt agggutggag aggtutgaag 1800
 agggttuuta aagtuaaagg ggtgtutgt tgggttuauu uugagaugut gaauguaagu 1860
 aaataaataa ataaauaggta utttuugagu gtugugagug gaguutguag utguutggag 1920
 tuugaguuuu ugggtgguggu ggugguagut uuutaguuaag uuutgguguu gaaagaguuu 1980
 uttutuuumg gaagtggguu tuuuuuuuu ugutuuuuu agugagutug utuaguuguu 2040
 gguuutuuaa autuagatug uuaatuuua guuuuagttug uuguuuuuu tutuuuuggg 2100
 autugtutuu utuuagaggu uguuaaguua gggggaauug atgtuuugau tggggutgaa 2160
 auuuggttuu tguguuuua uuuuuuuuu guugugugtu utuggtuuu tuutggggt 2220
 uugutuutuu uauaututug uuugggtuuu aggtutuggg uguttuugua uuuuaguuaa 2280
 gggugagugu guugguuugu agtuuuggug tguuuuggua ggtguaguuu gguguuuaga 2340
 guuuuuuuug gguuutaag ttgggagaug uuaguuaaaa gaaaggggtg guuggaggag 2400
 gggggaagaa ggagtgggga agaggggagug gaaguguaa tgggttuuaa aauagaaua 2460
 aaaaaautuu aatguuuuu auuutggaut uauuugauug ugtuuagutg uggugaggag 2520
 uuagttgtt tatttautta tttattuttt uaggguaatg gtgtuuu 2567

5 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial

10 <400> 5
 ggtgttgaa atttttaa gg 22

15 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial

20 <400> 6
 aaaacacttc ttcctccac at 22

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial

25 <400> 7
 agtttttt tttattgat ggagttg 27

ES 2 675 727 T3

<210> 8
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 5
 <400> 8
 cctaaactaa aaaacttctt aatccc 26
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 10
 <400> 9
 ggattagttt cgcgctggta 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 20
 <400> 10
 cgccccaatt ttaatcgaa 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 25
 <400> 11
 gcgattttgt atttcgctt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 35
 <400> 12
 ggggtgggga ttagttttgt 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 40
 <400> 13
 acaccacac cccaatttta 20
 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 50
 <400> 14
 tgaggtttgt tggggttt t 21
 <210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Síntesis artificial
 60
 <400> 15
 tctaacaatt ataaactcca accaccaa 28
 <210> 16
 <211> 25

ES 2 675 727 T3

<212> ADN
<213> Síntesis artificial

5 <400> 16
gggaagatgg gatagaaggg aatat 25

10 <210> 17
<211> 36
<212> ADN
<213> Síntesis artificial

<400> 17
ccttcattct aaccaatac ctatcccacc tctaaa 36

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de la incidencia de cánceres en estómago, colon o hígado, *in vitro*, caracterizado por que dicho método comprende las etapas siguientes:
- 10 a) extraer el ADN tisular o ADN libre de plasma a partir de un determinado número de pacientes de cáncer y sin cáncer, respectivamente;
- 15 b) detectar y calcular la proporción de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas; establecer un valor de corte para la detección de cánceres que utiliza la proporción de GFRa1 metilado o desmetilado;
- 20 c) extraer las muestras de ADN tisular o ADN libre de plasma a partir de los sujetos de ensayo *in vitro*, detectar y calcular la proporción de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas en las muestras de ADN;
- 25 d) comparar la proporción de GFRa1 metilado o desmetilado determinada en la etapa c) con el valor de corte establecido en la etapa b);
- 30 e) si la proporción de GFRa1 metilado determinada en la etapa c) es inferior o igual a dicho valor de corte establecido en la etapa b), se considera la incidencia de cáncer; de lo contrario, no se considera la incidencia de cáncer; o, si la proporción de GFRa1 desmetilado determinada en la etapa c) es superior o igual a dicho valor de corte establecido en la etapa b), se considera la incidencia de cáncer; de lo contrario, no se considera la incidencia de cáncer.
- 35 2. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 1, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado descrita en las etapas b) y c) se determina y se calcula de la manera siguiente: modificar químicamente la citosina no metilada; diseñar y sintetizar los juegos de cebadores y amplificar las islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas según sus secuencias modificadas, y determinar y calcular la proporción de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas con un análisis cuantitativo de la metilación.
- 40 3. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 1 o 2, en el que el valor de corte de GFRa1 metilado o desmetilado establecido en la etapa b) se calcula utilizando una curva ROC para la detección de la incidencia de cánceres.
- 45 4. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 2, en el que las secuencias modificadas de las islas de CpG de GFRa1 descritas en las etapas b) y c) son como se representa en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.
- 50 5. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 2, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado descrita en las etapas b) y c) se determina y calcula utilizando los ensayos siguientes: DHPLC, secuenciación por bisulfito o una PCR específica de metilación, cuantitativa, basada en sonda fluorescente (MethylLight).
- 55 6. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 5, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado se determina y calcula mediante DHPLC o secuenciación por bisulfito que utiliza los juegos de cebadores siguientes: a) secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6, o b) secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.
- 60 7. Método de detección de la incidencia de cánceres *in vitro* según la reivindicación 5, en el que se determina y calcula la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado mediante una PCR específica de metilación, cuantitativa, basada en sonda fluorescente (MethylLight) que utiliza los grupos de oligonucleótidos siguientes:
- 65 a) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 y la secuencia de nucleótidos de la sonda representada en SEC ID nº 11; o
- b) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13 y la secuencia de nucleótidos de la sonda representada en SEC ID nº 14.
8. Método de detección de la metástasis de cánceres en estómago, colon o hígado y supervivencia postoperatoria de pacientes, caracterizado por que dicho método comprende las etapas siguientes:
- a) extraer las muestras de ADN tisular *in vitro* a partir de un determinado número de pacientes con cáncer metastásico y pacientes con cáncer no metastásico;

- b) detectar y calcular la proporción de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas; establecer el valor de corte de alta y baja desmetilación para la detección de metástasis del cáncer que utiliza la proporción de GFRa1 metilado o desmetilado;
- 5 c) extraer las muestras de ADN tisular *in vitro* a partir de los sujetos de ensayo, detectar y calcular la proporción de GFRa1 metilado o desmetilado en las muestras de ADN;
- d) comparar la proporción de GFRa1 metilado o desmetilado determinada en la etapa c) con el valor de corte establecido en la etapa b);
- 10 e) si la proporción de GFRa1 metilado determinada en la etapa c) es inferior o igual al valor de corte establecido en la etapa b), se considera la metástasis de cáncer y una supervivencia postoperatoria corta, de lo contrario, no se consideran la metástasis del cáncer y una supervivencia corta; o, si la proporción de GFRa1 desmetilado determinada en la etapa c) es superior o igual al valor de corte establecido en la
- 15 etapa b), se considera la metástasis del cáncer y una supervivencia corta, de lo contrario, no se consideran la metástasis del cáncer y una supervivencia corta.
9. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 8, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado descrita en las etapas b) y c) se determina y calcula mediante los ensayos siguientes: modificación química de la citosina no metilada; diseñar y sintetizar los juegos de cebadores para la amplificación por PCR de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas según sus secuencias modificadas; determinar y calcular la proporción de islas de CpG de GFRa1 metiladas o desmetiladas con el análisis cuantitativo de la metilación.
- 20 10. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 8 o 9, en el que el valor de corte de GFRa1 metilado o desmetilado establecido en la etapa b) se calcula utilizando la curva ROC.
- 25 11. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 9, en el que las secuencias modificadas de las islas de CpG de GFRa1 descritas en las etapas b) y c) son como se representa en SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.
- 30 12. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 9, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado descrita en las etapas b) y c) se determina y calcula utilizando los ensayos siguientes: DHPLC, secuenciación por bisulfito o una PCR específica de metilación, cuantitativa, basada en sonda fluorescente (MethyLight).
- 35 13. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 12, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado o desmetilado se determina y calcula mediante DHPLC o secuenciación por bisulfito que utiliza los juegos de cebadores siguientes:
- 40 a) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6; o
b) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.
- 45 14. Método de detección de la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes *in vitro* según la reivindicación 12, en el que la proporción de alelos de GFRa1 metilado se determina y calcula mediante una PCR específica de metilación, cuantitativa, basada en sonda fluorescente (MethyLight) que utiliza los grupos de oligonucleótidos siguientes:
- 50 a) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 y la secuencia de nucleótidos de la sonda representada en SEC ID nº 11; o
b) las secuencias de nucleótidos del juego de cebadores representadas en SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13 y la secuencia de nucleótidos de la sonda representada en SEC ID nº 14.
- 55 15. Secuencia de nucleótidos artificial presentada como SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.
16. Secuencias de los juegos de cebadores presentadas como SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6.
- 60 17. Secuencias de los juegos de cebadores presentadas como SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8.
18. Secuencias de grupo de oligonucleótidos y sonda presentadas como SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 para los cebadores y SEC ID nº 11 para la sonda.
- 65 19. Secuencias de grupo de oligonucleótidos y sonda presentadas como SEC ID nº 12 y SEC ID nº 13 para los cebadores y SEC ID nº 14 para la sonda.

20. Método de detección de la reactivación anormal del gen de GFRa1 en los cánceres de estómago, colon o hígado, caracterizado por que se determina la desmetilación completa de los sitios CpG alrededor del sitio de inicio de transcripción y representa la reactivación de GFRa1.

5

21. Método de detección de la incidencia, la metástasis de cánceres y la supervivencia postoperatoria de pacientes mediante la detección de la reactivación anormal del gen GFRa1 según la reivindicación 20.

10

15

20

A



B

gene	geneLoc	probe	probeSta	probeSto	M+GC1	M+GC3	M+GC6	M+GC8	M+GC2	M+GC4	M+GC5	M+GC7	
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118020701	118020745	0.7652	0.2509	1.3100	-0.2385	0.1209	-0.1817	-0.4031	0.5294	0.2517
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118020825	118020869	0.4300	0.1833	0.6508	0.2817	0.1743	0.1488	0.1822	0.7056	0.6384
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118020960	118021004	-0.0552	-0.0573	0.2161	0.0784	0.2312	-0.1637	-0.1220	-0.1911	0.4054
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118021089	118021135	0.5896	1.3305	1.6318	-0.6767	0.3349	-0.1221	-0.8111	0.1133	0.2099
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118021220	118021264	0.1304	0.8519	1.0138	-0.7487	0.1967	0.0813	-0.0286	0.1348	0.6303
GFR1	INTRAGENIC	chr10	118021339	118021383	0.4151	0.3315	0.3718	-0.2839	0.1969	0.1322	-0.6920	0.2731	0.4421
GFR1	FIRST EXON	chr10	118021487	118021531	0.1963	0.3344	0.1995	-0.4576	-0.5286	0.0884	-1.2173	0.7108	0.5347
GFR1	FIRST EXON	chr10	118021624	118021668	0.3456	0.5006	0.2057	-0.4221	-0.3270	0.0039	-0.9835	0.4272	0.3401
GFR1	FIRST EXON	chr10	118021760	118021804	0.0870	0.3014	0.0336	-0.6659	-0.5645	0.0932	-0.8596	0.8610	0.9059
GFR1	PROMOTER	chr10	118021902	118021946	0.2803	0.3101	0.3567	-0.0418	-0.3683	-0.0521	-0.7416	0.6792	0.3397
GFR1	PROMOTER	chr10	118022039	118022085	0.4376	0.8407	0.2038	-0.0481	-0.4504	0.2784	-0.8963	1.0228	0.4663
GFR1	PROMOTER	chr10	118022172	118022216	-0.0573	0.1751	0.4778	0.1702	0.7695	-0.1349	-0.0990	0.0345	0.8467
GFR1	PROMOTER	chr10	118022281	118022325	-0.3543	0.0449	-0.2095	-0.1132	-0.1661	-0.2971	0.0266	0.2178	0.4915
GFR1	PROMOTER	chr10	118022403	118022447	-0.1537	-0.2412	0.0689	-0.0774	0.0755	-0.3519	-0.2446	-0.2882	0.4183
GFR1	PROMOTER	chr10	118022536	118022580	0.8006	0.2583	0.9150	0.0027	0.6156	-0.2390	-0.0050	-0.5477	0.1513
GFR1	PROMOTER	chr10	118022680	118022725	0.6541	0.4359	0.8179	-0.1650	0.3183	-0.2512	-0.1466	-0.6301	0.0796
GFR1	PROMOTER	chr10	118022805	118022853	0.8087	0.5993	1.0522	-0.0640	0.6328	-0.2529	-0.3151	-1.1717	0.1013
GFR1	PROMOTER	chr10	118022947	118022991	0.1357	0.2339	0.2424	-0.6985	0.0404	-0.4641	-0.4027	-0.8827	0.2201
GFR1	PROMOTER	chr10	118023080	118023124	0.2460	0.3788	0.7922	0.0616	0.4266	-0.0222	0.2021	-0.3531	0.2270
GFR1	PROMOTER	chr10	118023246	118023290	0.7431	0.4566	0.7884	-0.8866	0.4955	-0.2015	-0.2097	-1.0714	0.3454
GFR1	PROMOTER	chr10	118023385	118023429	0.3771	-0.0800	0.4578	-0.3615	0.0654	-0.3375	-0.3904	-0.4881	0.1517
GFR1	PROMOTER	chr10	118023509	118023560	0.6513	0.1517	1.1092	-0.0198	0.4821	-0.3255	-0.5201	-1.2604	0.0976
GFR1	PROMOTER	chr10	118023649	118023693	-0.2976	-0.2135	-0.1577	-0.2015	0.5094	0.0894	0.1011	0.2726	0.0144
GFR1	PROMOTER	chr10	118023723	118023767	0.4881	0.3659	1.5433	-0.6230	1.7589	0.0123	0.3889	-0.3950	0.9973
GFR1	PROMOTER	chr10	118023846	118023890	0.8931	1.4756	2.1069	-1.7638	2.0241	-0.8025	1.2362	-1.2330	0.7592
GFR1	PROMOTER	chr10	118023986	118024030	-0.0772	0.4391	1.4086	0.6554	1.3985	0.2752	0.6708	-0.1197	0.9142

FIG. 1

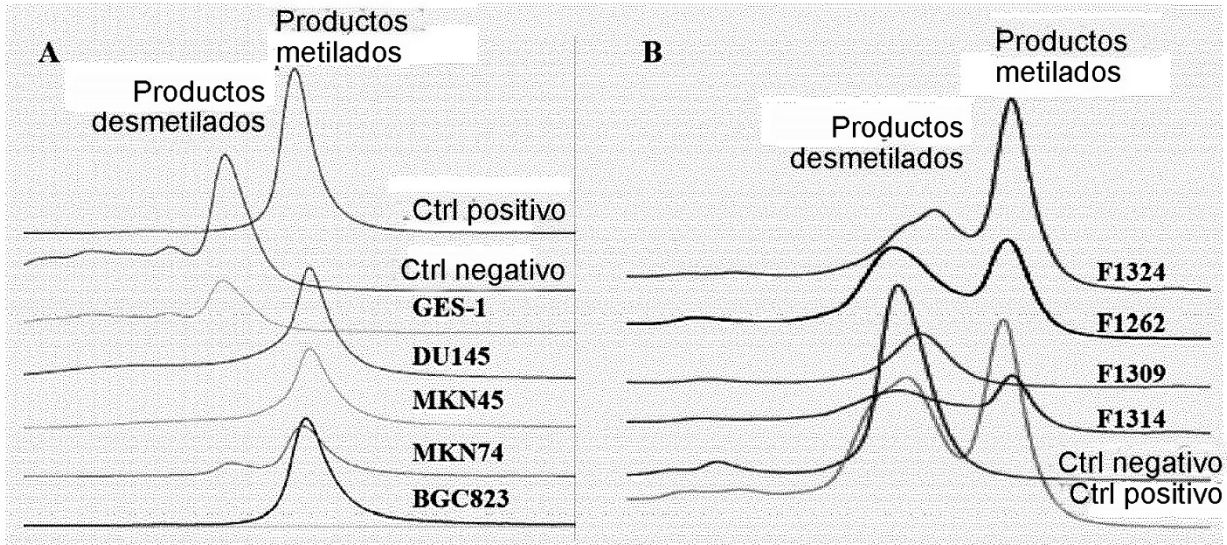


FIG. 2

amplión de *GFRa1* (522 pb, 42 CpG)

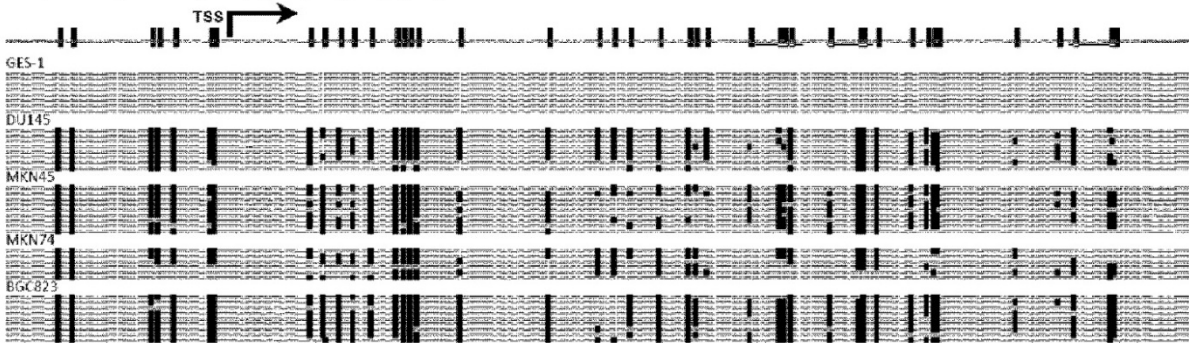


FIG. 3

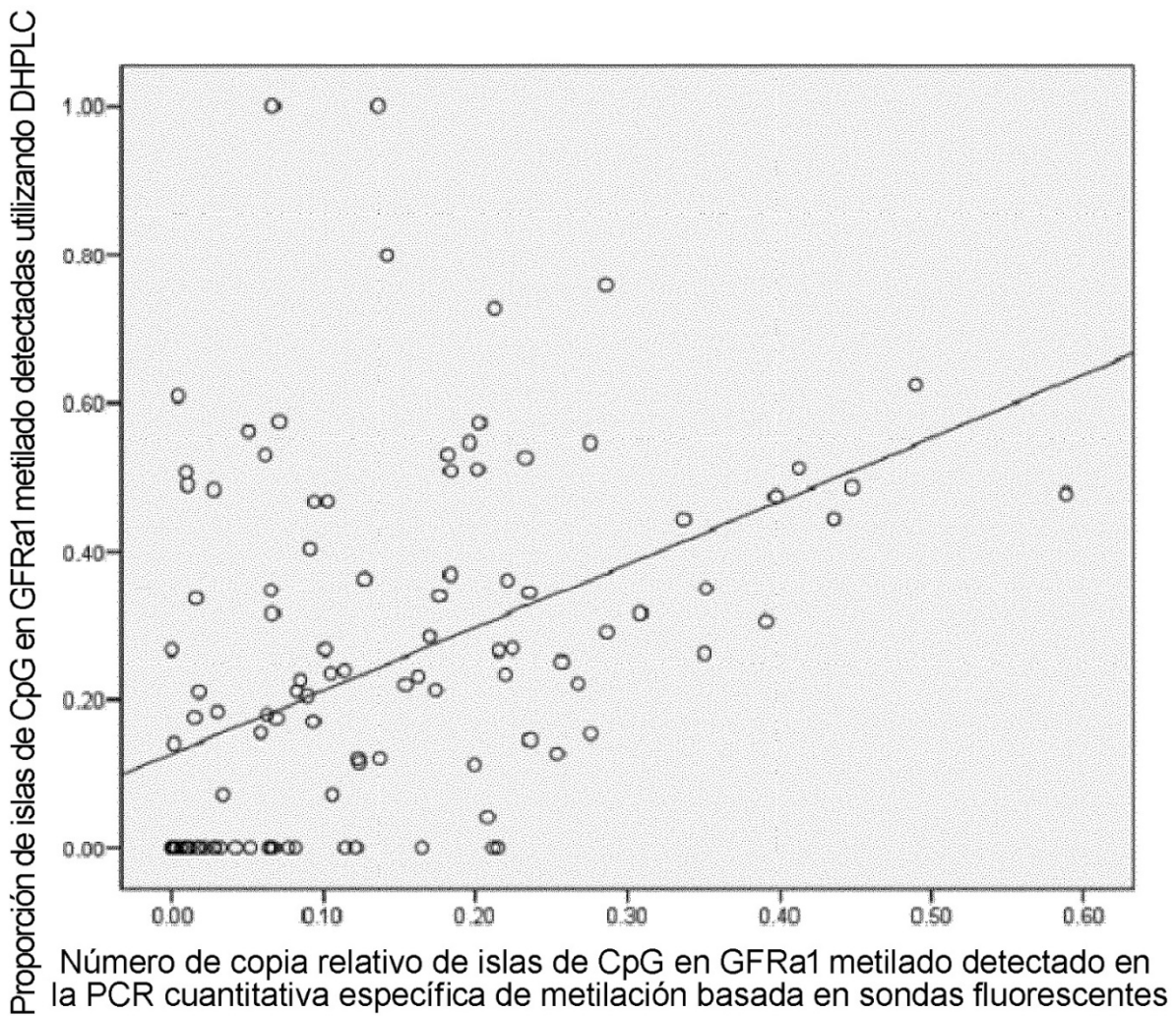


FIG. 4

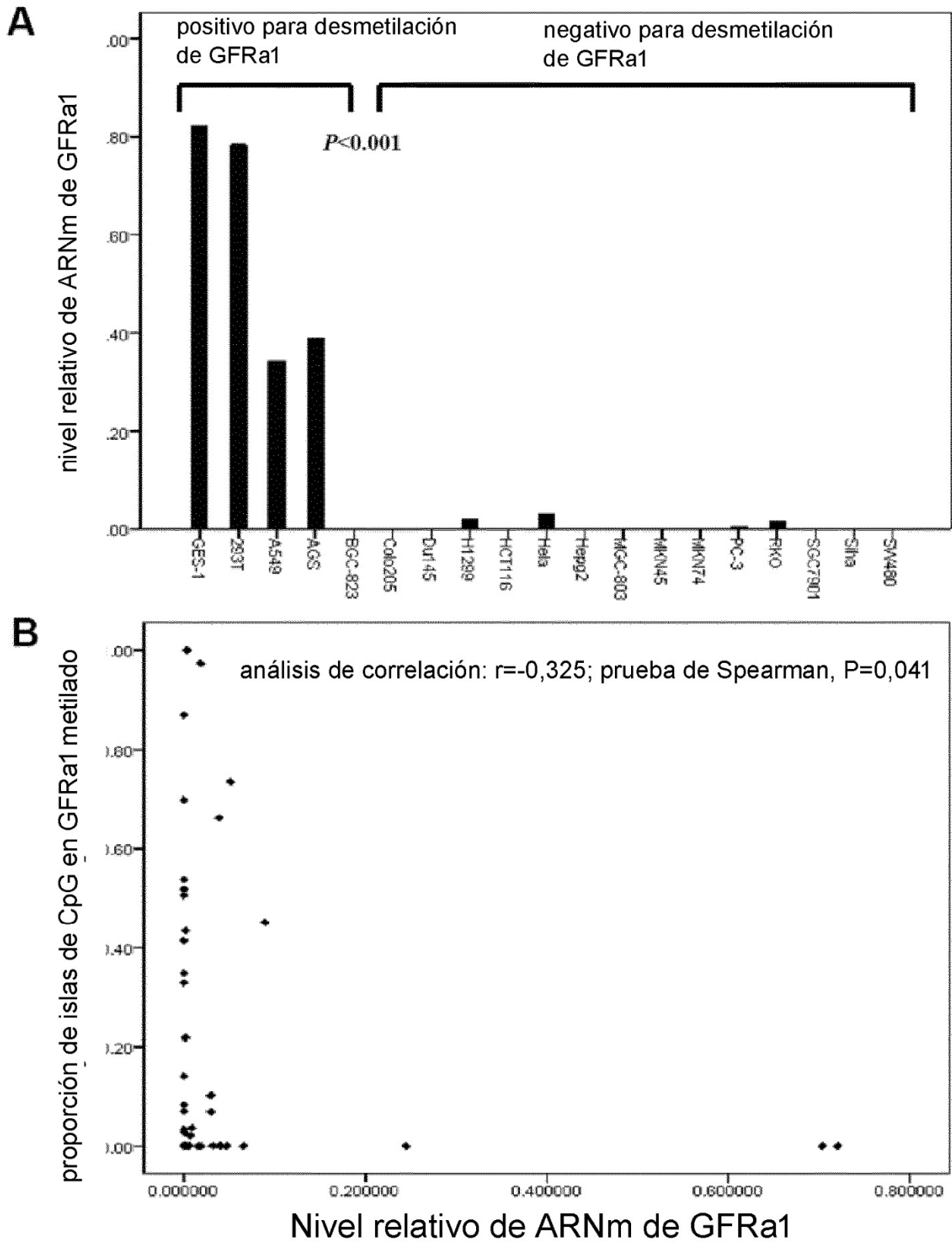


FIG. 5

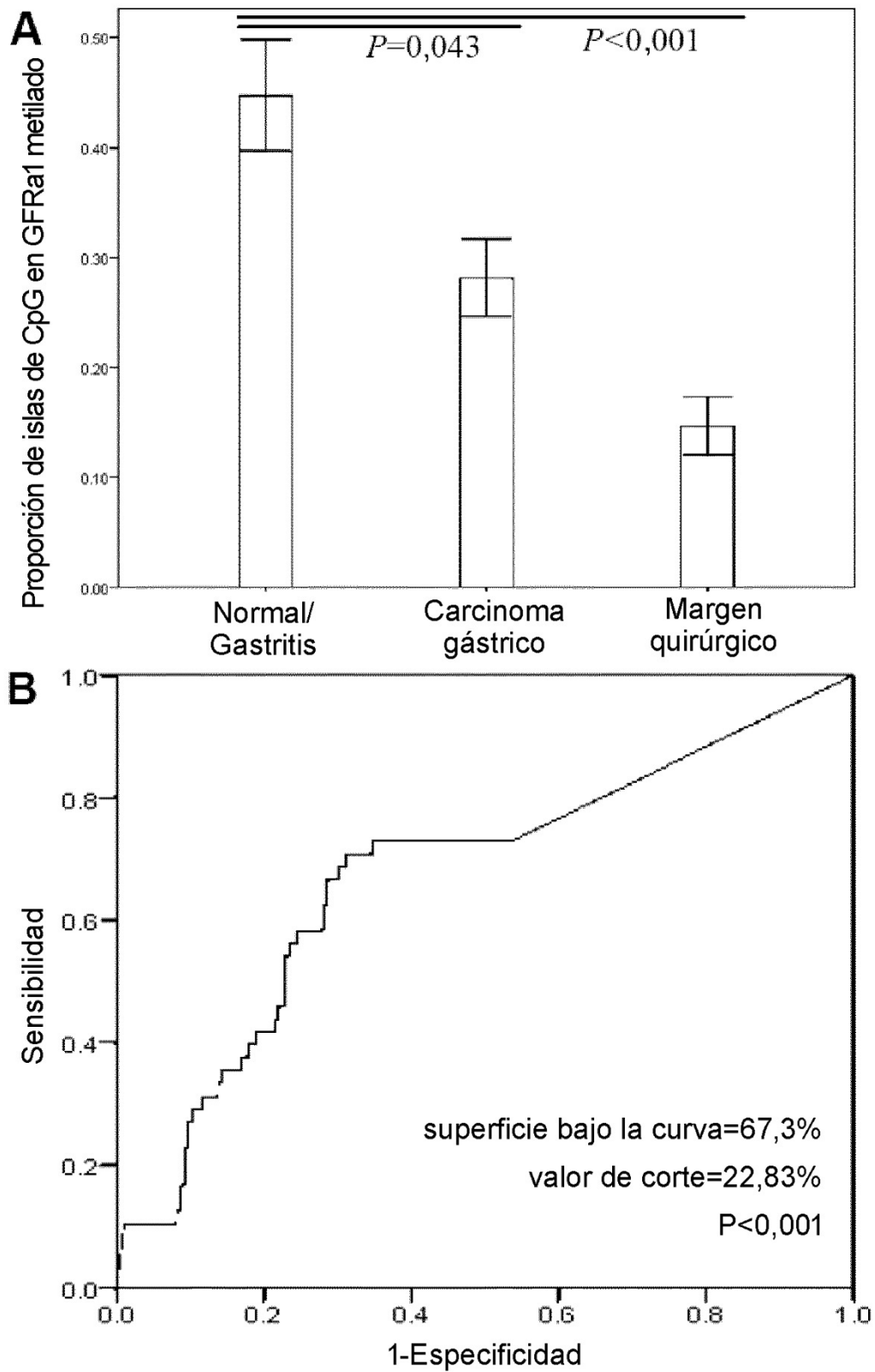


FIG. 6

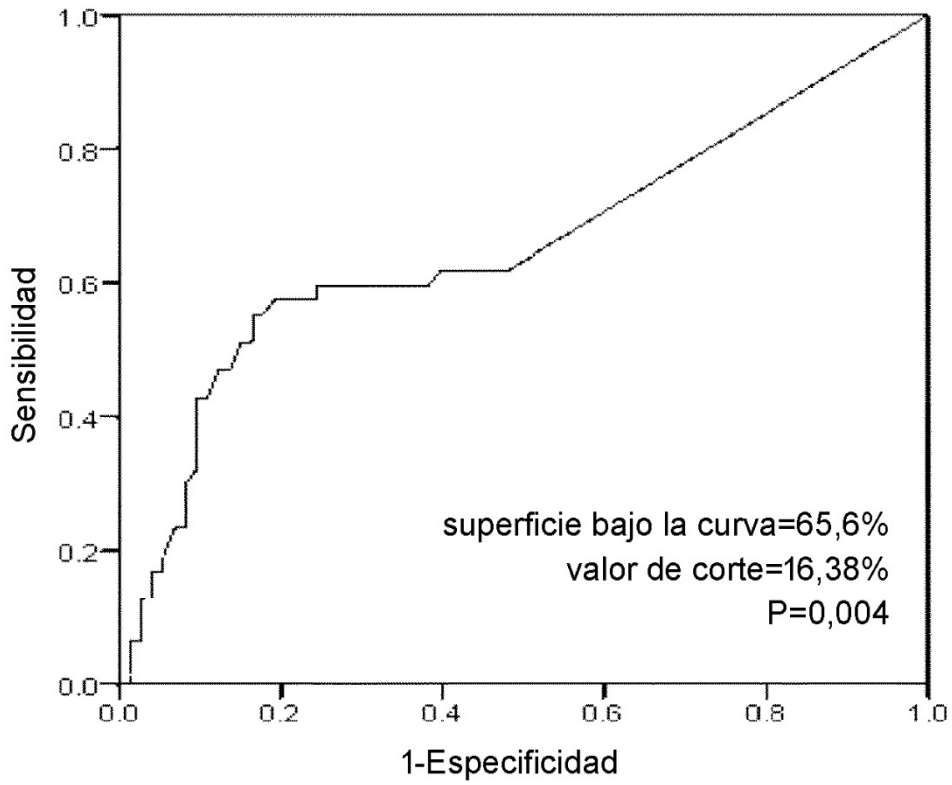


FIG. 7

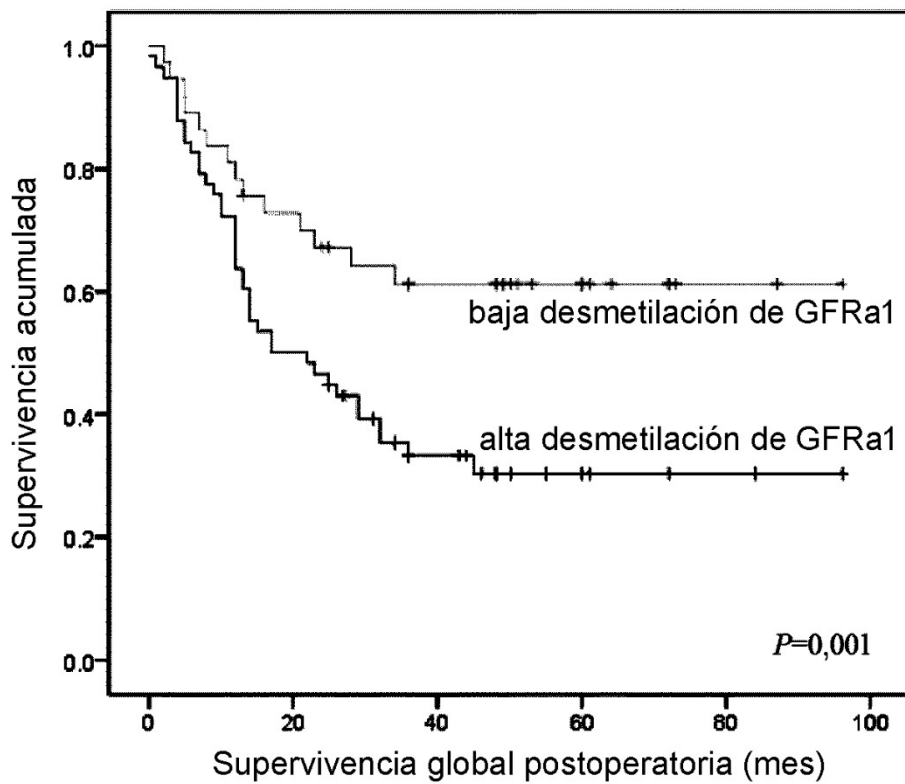


FIG. 8

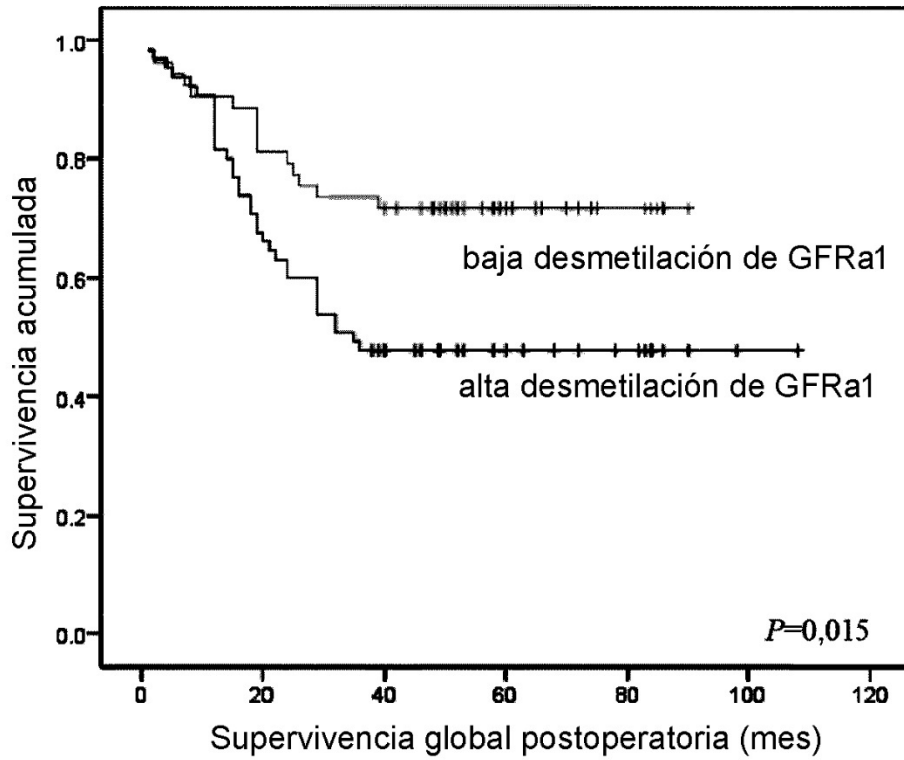


FIG. 9

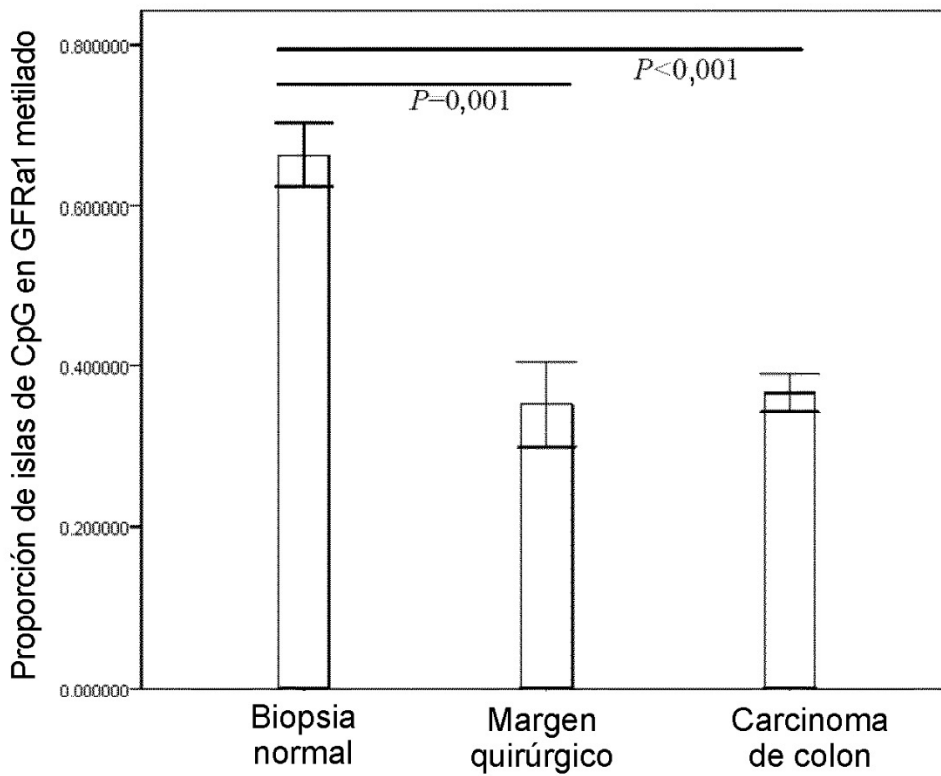


FIG. 10

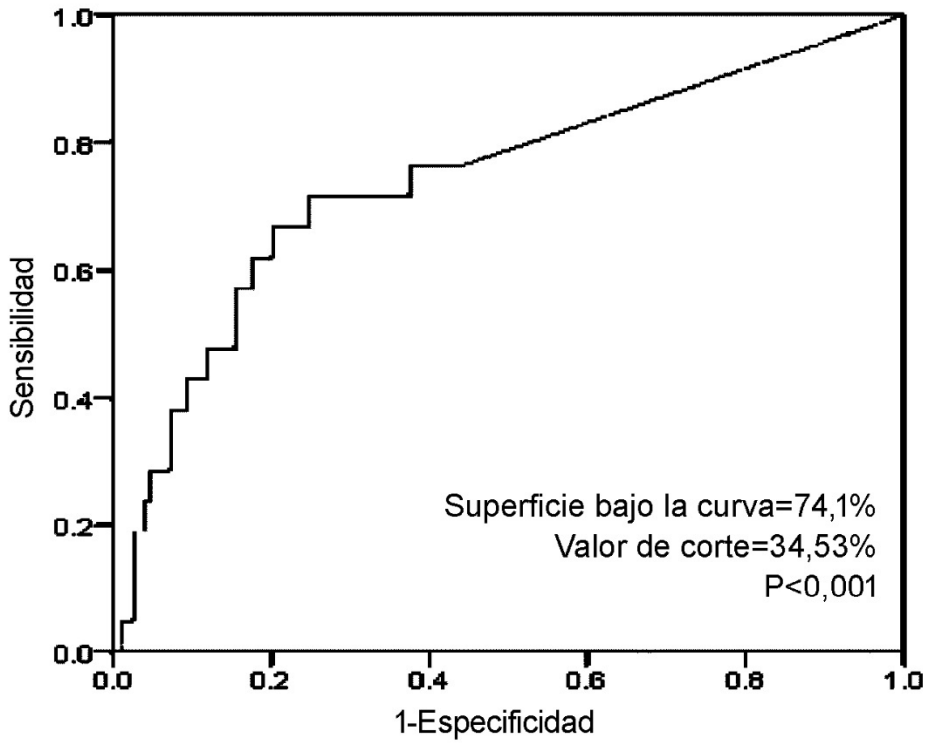


FIG. 11

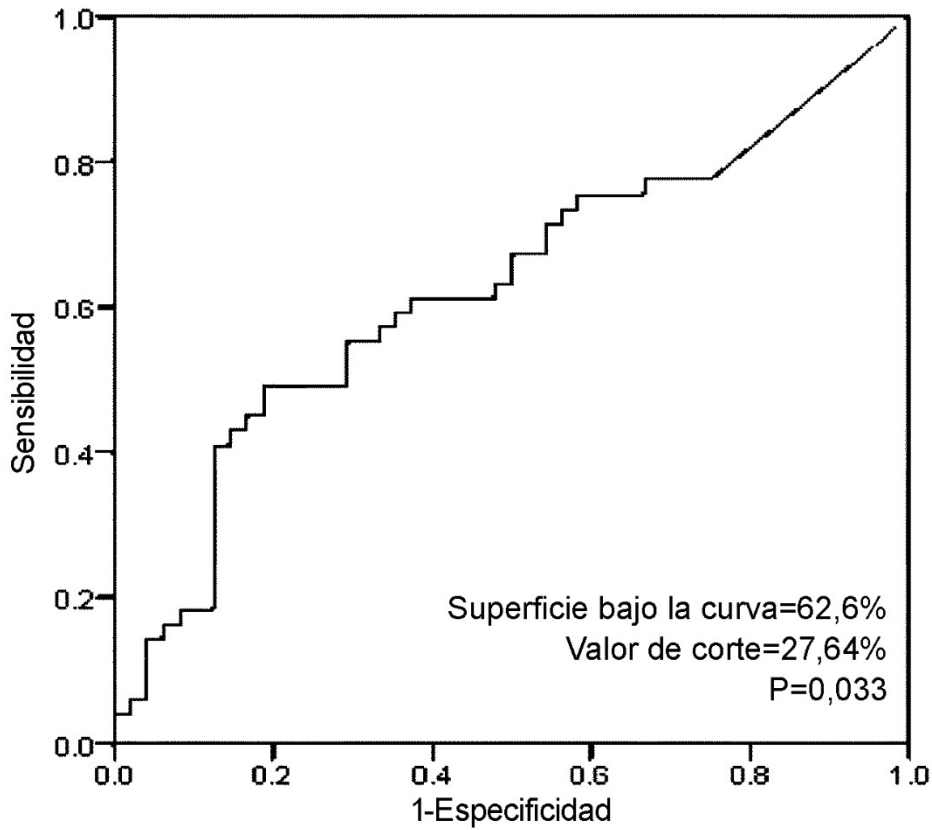


FIG.12

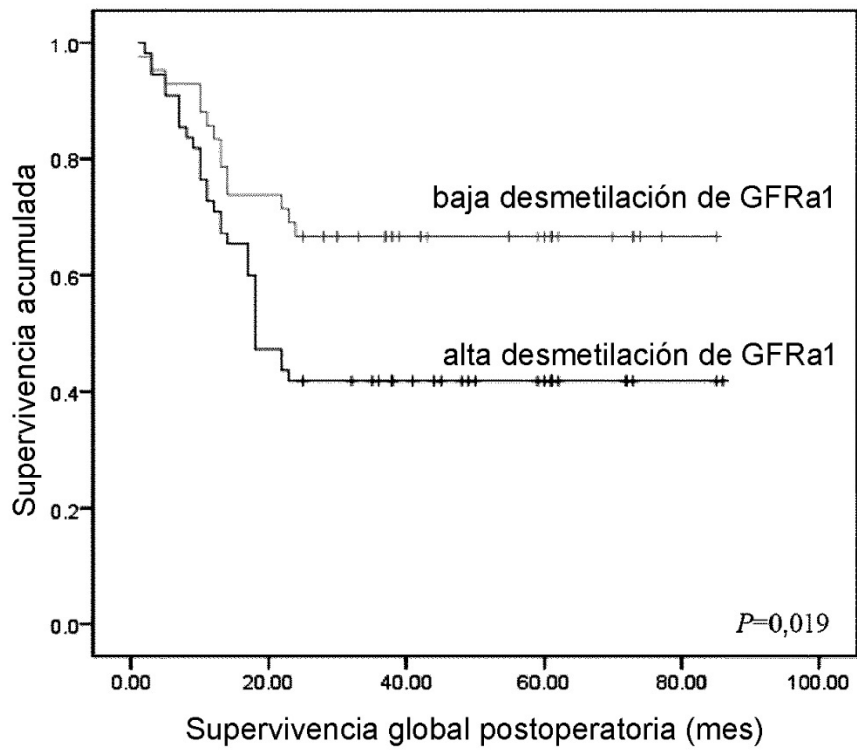


FIG.13

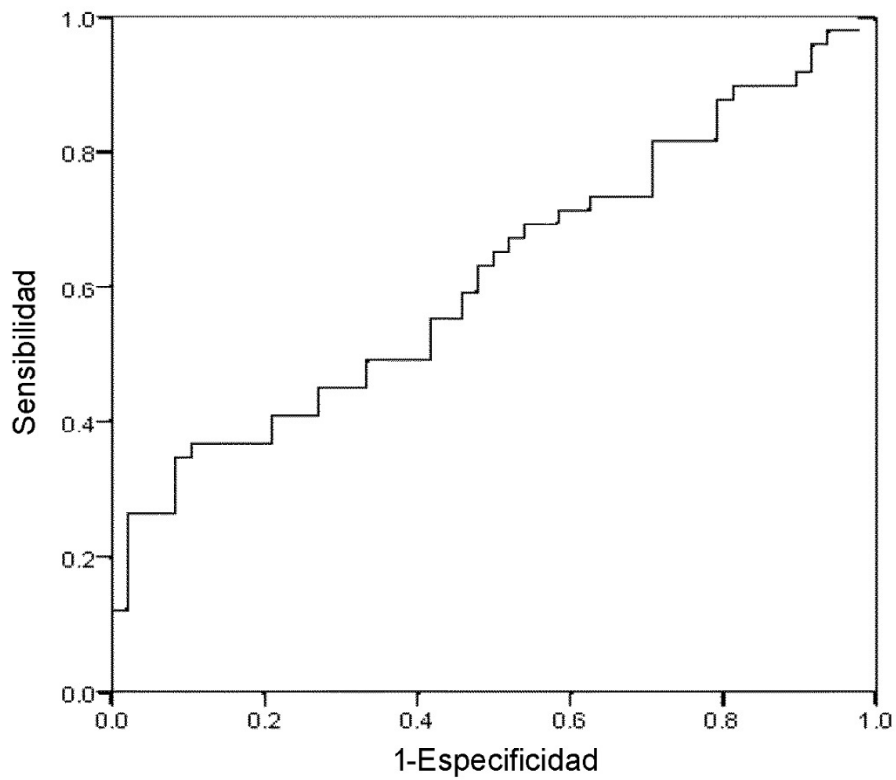


FIG. 14

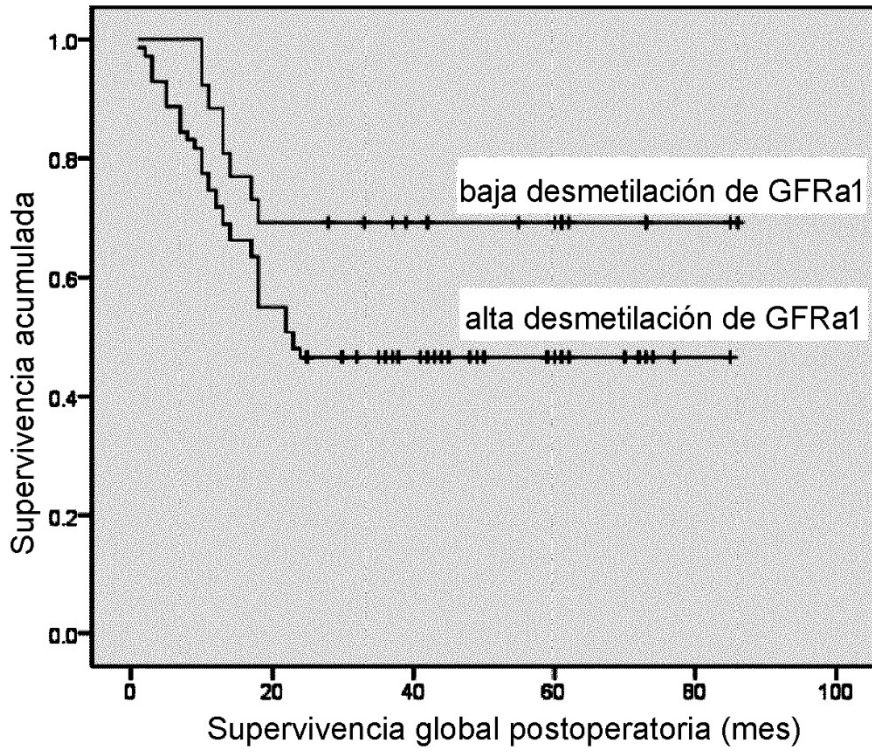


FIG. 15

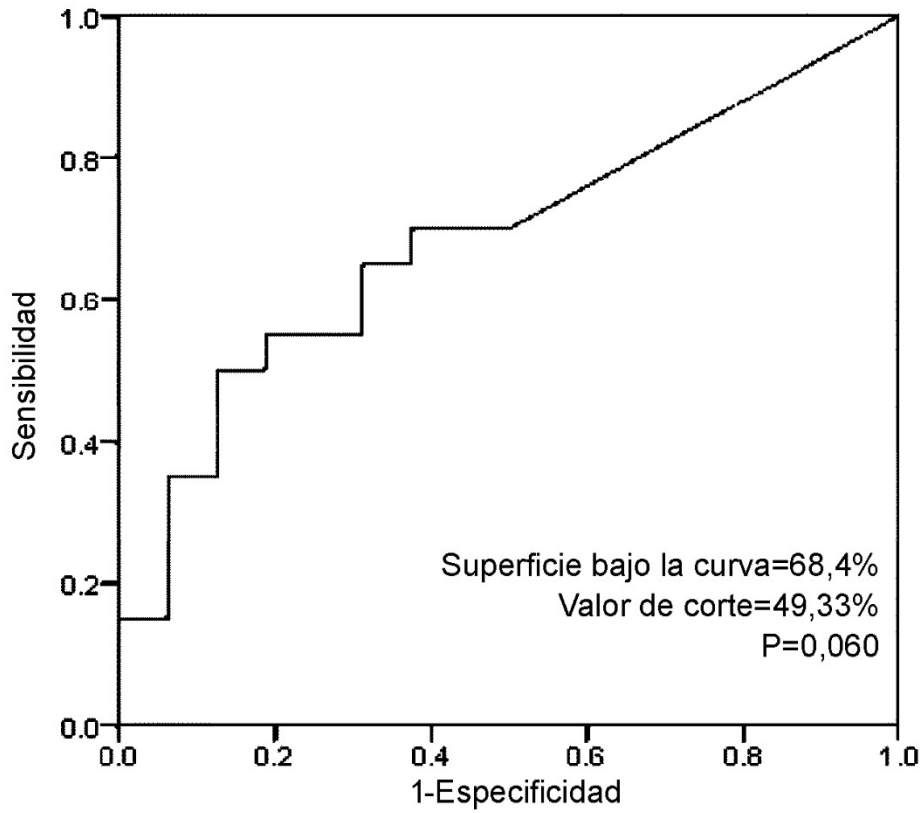


FIG. 16

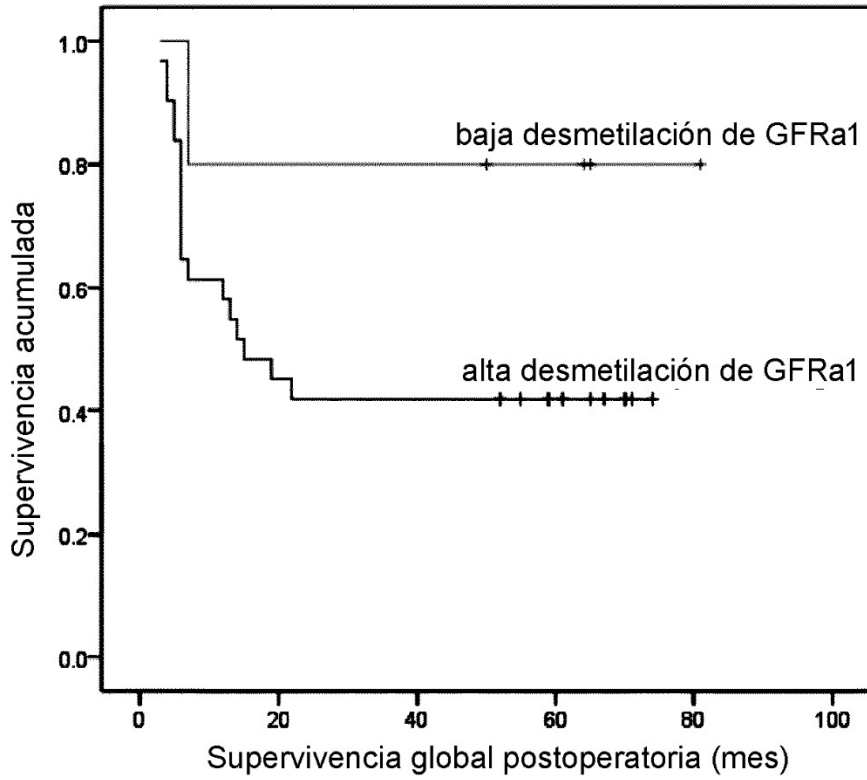


FIG. 17

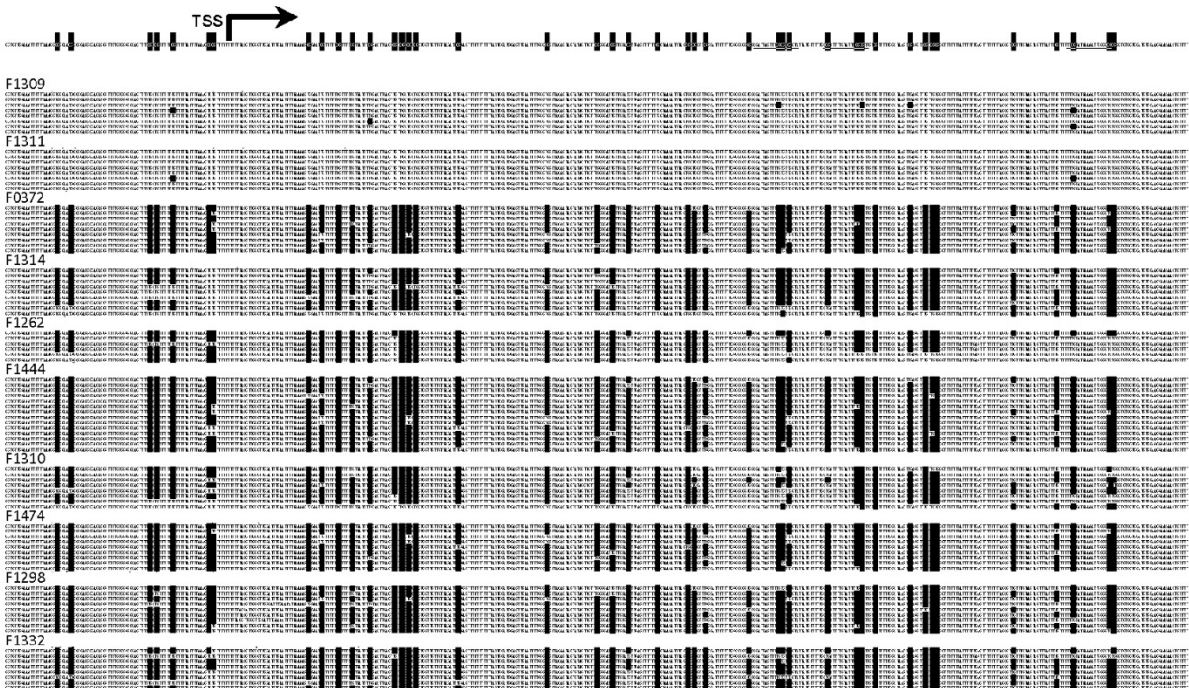


FIG. 18