

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 035**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/KR2013/008623**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14073785**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13852737 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2918679**

54 Título: **Método para detectar pólipos gástricos y cáncer gástrico utilizando un gen marcador de pólipos gástricos y metilación específica del cáncer gástrico**

30 Prioridad:

07.11.2012 KR 20120125539

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

11.09.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AN, SUNG HWAN y
OH, TAE JEONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 681 035 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 detectar pólipos gástricos y cáncer gástrico utilizando un gen marcador de pólipos gástricos y metilación específica del cáncer gástrico

5

Campo técnico

La presente invención se refiere al uso novedoso de un gen de la isla CpG metilada de sindecan-2 (SDC2; NM_002998) como biomarcador de metilación gástrico específico de pólipos y cáncer gástricos, y más particularmente, al uso de un gen de la isla CpG metilada de sindecan-2 como un biomarcador que permite diagnosticar los pólipos gástricos y el cáncer gástrico en una etapa temprana midiendo el nivel de metilación de los mismos.

10

Antecedentes de la tecnica

15

Incluso en la actualidad, cuando la ciencia médica ha avanzado, la tasa de supervivencia a 5 años de pacientes con cáncer, particularmente pacientes con tumores sólidos (que no sean pacientes con cáncer sanguíneo) es inferior al 50% y aproximadamente 2/3 de todos los pacientes con cáncer se diagnostican en una etapa avanzada y casi todos mueren dentro de los 2 años posteriores al diagnóstico de cáncer. Tales resultados pobres en la terapia contra el cáncer no se deben solo al problema de los métodos terapéuticos, sino también porque no es fácil diagnosticar el cáncer en una etapa temprana y diagnosticar con precisión el cáncer avanzado y realizar el seguimiento de los pacientes con cáncer después de terapia contra el cáncer.

20

En la práctica clínica actual, el diagnóstico de cáncer se confirma realizando una biopsia de tejido después de una toma de antecedentes, un examen físico y una evaluación clínica, seguidos de pruebas radiográficas y una endoscopia si se sospecha cáncer. Sin embargo, el diagnóstico de cáncer según las prácticas clínicas existentes solo es posible cuando el número de células cancerosas es más de mil millones y el diámetro del cáncer es más de 1 cm. En este caso, las células cancerosas ya tienen capacidad metastásica, y al menos la mitad de ellas ya han hecho metástasis. Mientras tanto, en el cribado del cáncer se utilizan marcadores tumorales para monitorizar sustancias que se producen directa o indirectamente a partir de cánceres, pero causan confusión debido a limitaciones de precisión, ya que hasta la mitad parecen normales, incluso en presencia de cáncer, y a menudo aparecen positivas incluso en ausencia de cáncer. Además, los agentes anticancerosos que se utilizan principalmente en la terapia contra el cáncer tienen el problema de que muestran un efecto solo cuando el volumen del cáncer es pequeño.

25

30

35

La razón por la que el diagnóstico y el tratamiento del cáncer son difíciles es que las células cancerosas son muy complejas y variables. Las células cancerosas crecen de manera excesiva y continua, invaden el tejido circundante y hacen metástasis en órganos distales, conduciendo a la muerte. A pesar del ataque de un mecanismo inmune o una terapia contra el cáncer, las células cancerosas sobreviven, se desarrollan continuamente, y los grupos celulares que son más adecuados para la supervivencia se propagan selectivamente. Las células cancerosas son cuerpos vivos con un alto grado de viabilidad, que se producen por la mutación de una gran cantidad de genes. Para que una célula se convierta en una célula cancerosa y se desarrolle como una masa cancerosa maligna detectable en clínicas, debe producirse la mutación de una gran cantidad de genes. Por lo tanto, para diagnosticar y tratar el cáncer en la raíz, son necesarios enfoques a nivel genético.

40

45

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

50

Además, se ha intentado otro método, en donde la presencia de genes expresados por células cancerosas se detecta mediante RT-PCR e inmunotransferencia, diagnosticando de este modo las células cancerosas presentes en las células sanguíneas. Sin embargo, este método tiene deficiencias, ya que se puede aplicar solo a algunos cánceres, incluido el cáncer de próstata y el melanoma, y tiene una alta tasa de falsos positivos. Además, es difícil estandarizar la detección y la lectura en este método, y su utilidad también es limitada (Kopreski, M.S. et al., Clin. Cancer Res., 5:1961, 1999; Miyashiro, I. et al., Clin. Chem., 47: 505, 2001).

55

Recientemente, se han intentado activamente pruebas genéticas que usan un ADN en suero o plasma sanguíneo. Este es un método para detectar un gen relacionado con el cáncer que se aísla de las células cancerosas y se libera en la sangre y se presenta en forma de un ADN libre en el suero. Se encuentra que la concentración de ADN en el suero se incrementa en un factor de 5 a 10 veces en pacientes con cáncer real en comparación con la de personas normales, y dicho ADN aumentado se libera principalmente de células cancerosas. El análisis de anomalías genéticas específicas del cáncer, como la mutación, eliminación y pérdida funcional de oncogenes y genes supresores de tumores, usando tales ADN aislados de células cancerosas, permite el diagnóstico de cáncer. En este

60

65

esfuerzo, ha habido un intento activo de diagnosticar cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de hígado mediante el examen de la metilación del promotor de oncogenes K-Ras mutados, genes supresores de tumores p53 y genes p16 en suero, y la marcación e inestabilidad de microsatélites (Chen, X.Q. et al., *Clin. Cancer Res.*, 5: 2297, 1999; Esteller, M. et al., *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sánchez-Céspedes, M. et al., *Cancer Res.*, 60: 892, 2000; Sozzi, G. et al., *Clin. Cancer Res.*, 5: 2689, 1999).

Mientras tanto, en muestras diferentes a la sangre, también se puede detectar el ADN de las células cancerosas. Se ha intentado un método en donde la presencia de células cancerosas u oncogenes en esputo o lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón se detecta mediante una prueba con genes o de anticuerpos (Palmisano, W.A. et al., *Cancer Res.*, 60: 5954, 2000; Sueoka, E. et al., *Cancer Res.*, 59:1404, 1999). Además, se han intentado otros métodos para detectar la presencia de oncogenes en heces de pacientes con cáncer de colon y recto (Ahlquist, D.A. et al., *Gastroenterol.*, 119: 1219-27, 2000) y detectar anomalías de metilación del promotor en orina y fluido de próstata (Goessl, C. et al., *Cancer Res.*, 60: 5941, 2000). Sin embargo, para diagnosticar con precisión los cánceres que causan una gran cantidad de anomalías genéticas y mostrar diversas mutaciones características de cada cáncer, se requiere un método en donde se analice una gran cantidad de genes de forma precisa y automática. Sin embargo, tal método aún no se ha establecido.

Para el diagnóstico preciso de cáncer, es importante detectar no solo un gen mutado sino también un mecanismo por el cual se produce la mutación de este gen. Anteriormente, los estudios se realizaron enfocándose en mutaciones en una secuencia de codificación, es decir, microcambios, tales como mutaciones puntuales, eliminaciones e inserciones, o anomalías cromosómicas macroscópicas. Sin embargo, en los últimos años, se informó que los cambios epigenéticos son tan importantes como estas mutaciones, y un ejemplo típico de los cambios epigenéticos es la metilación de las islas promotoras CpG.

En el ADN genómico de células de mamífero, existe la quinta base además de A, C, G y T, concretamente, 5-metilcitosina, en la que un grupo metilo está unido al quinto carbono del anillo de citosina (5-mC). La 5-mC siempre está unida solo al C de un dinucleótido CG (5'-mCG-3'), que a menudo se marca como CpG. La C de CpG está metilada principalmente por unión con un grupo metilo. La metilación de esta CpG inhibe la expresión de una secuencia repetitiva en genomas, como Alu o transposón. Además, esta CpG es un sitio donde aparece un cambio epigenético en las células de mamíferos con mayor frecuencia. El 5-mC de esta CpG se desamina de forma natural a T, y por lo tanto, la CpG en genomas de mamíferos muestra solo el 1% de frecuencia, que es mucho menor que una frecuencia normal ($1/4 \times 1/4 = 6.25\%$).

Las regiones en las que las CpG están excepcionalmente integradas se conocen como islas CpG. Las islas CpG se refieren a sitios que tienen 0.2-3 kb de longitud, y tienen un contenido de C+G de más del 50% y una proporción de CpG de más de 3.75%. Hay aproximadamente 45.000 islas CpG en el genoma humano, y se encuentran principalmente en regiones promotoras que regulan la expresión de genes. En realidad, las islas CpG se producen en los promotores de los genes constitutivos que representan aproximadamente el 50% de los genes humanos (Cross, S. et al., *Curr. Opin Gene Develop.*, 5:309, 1995). Recientemente, se ha llevado a cabo activamente un intento de examinar la metilación del promotor de genes relacionados con tumores en sangre, esputo, saliva, heces u orina y utilizar los resultados examinados para el diagnóstico y tratamiento de diversos cánceres (Esteller, M. et al., *Cancer Res.*, 59:67, 1999; Sánchez-Céspedes, M. et al., *Cancer Res.*, 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. et al., *Gastroenterol.*, 119:1219, 2000). Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que el gen Sindecin 2 puede usarse específicamente para diagnosticar cáncer de colon con base en estudios relevantes (KR 10-1142131 B). Sin embargo, este documento no sugiere el uso del gen Sindecin 2 para el diagnóstico de otros cánceres, incluido el cáncer gástrico. Mientras tanto, los presentes inventores han descubierto que el gen Sindecin 2 no es apropiado como biomarcador de diversos cánceres sólidos tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama y similares, y por lo tanto actúa como solo un biomarcador específico de cáncer de colon, en lugar de un biomarcador para diagnóstico de cánceres generales.

Jan et al. (Jan, K. M. et al., *Histopathology*, 61:76, 2012) describen diferentes genes que están hipermetilados en muestras de cáncer gástrico. Además, esta publicación describe el uso de un 450 Infinium Beadchip. Este chip comprende sondas, que se extienden como cebadores, lo que conduce a una amplificación lineal de las moléculas diana. El chip también comprende sondas para la isla SDC2 CpG, sin embargo, se usan otros genes del chip como marcadores para el diagnóstico de cánceres gástricos.

Hoehn et al. (Hoehn, B. et al., *Canc. Res.*, Abstract 4517, 2012) y KR 2011 0049430 A relacionan la metilación de SDC2 con cáncer de colon y DE 201 21 960 U1 relaciona la metilación de SDC2 con metástasis de cáncer.

KR 2012 0055917 A y Sato et al. (Sato, F. et al., *Cancer*, 106:483, 2005) describen diversos marcadores adicionales de metilación del cáncer gástrico.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar un marcador de metilación específico efectivo para el cáncer gástrico, que permita diagnosticar el cáncer y el riesgo de carcinogénesis en una etapa temprana y predecir el pronóstico del cáncer. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que el gen Sindecin 2 (SDC2; NM_002998) está metilado específicamente en pólipos gástricos y

células de cáncer gástrico, pero no en tejido de cáncer de pulmón, tejido de cáncer de mama, tejido de cáncer de hígado, tejido de cáncer de cuello uterino y tejido canceroso de tiroides y que los pólipos gástricos y el cáncer gástrico pueden diagnosticarse en una etapa temprana midiendo el nivel de metilación de los mismos usando el gen SDC2 como biomarcador, completando así la presente invención.

5 La información anterior divulgada en esta sección de Antecedentes es solo para mejorar la comprensión de los antecedentes de la presente invención, y por lo tanto puede contener información que no forma la técnica anterior que ya es conocida por una persona con experiencia ordinaria en el arte.

10 Divulgación de la invención

Problema técnico

15 Es un objeto principal de la presente invención proporcionar un biomarcador de metilación gástrico específico de pólipo o de cáncer gástrico, que se metila específicamente en pólipo gástrico o cáncer gástrico, y por lo tanto puede usarse de manera efectiva para el diagnóstico de pólipo gástrico o cáncer gástrico, y el uso del mismo para proporcionar información para el diagnóstico precoz del cáncer gástrico.

20 Se divulga además un método para detectar la metilación del gen SDC2 que es un gen marcador de metilación gástrico específico de pólipo o de cáncer gástrico, y un kit y un chip de ácidos nucleicos para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico usando el gen SDC2.

Solución técnica

25 Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona el uso de una isla CpG metilada del gen sindecan-2 (SDC2) localizado en una región establecida en la SEQ ID NO: 1 para diagnosticar cáncer gástrico o pólipo gástrico. Se divulga además un kit para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que comprende: un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2); y un cebador de secuenciación para pirosecuenciación de un producto de PCR amplificado por el par de cebadores.

30 Se divulga aún una composición para el diagnóstico de pólipo gástrico o cáncer gástrico, que contiene una sustancia capaz de detectar la metilación de la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2).

35 Se divulga aún un método adicional para detectar pólipos gástricos o cáncer gástrico, que comprende los pasos de:

- (a) aislar ADN de una muestra clínica; y
- (b) medir la metilación de la isla CpG del gen SDC2 (sindecan-2), que es un biomarcador de un pólipo gástrico o del cáncer gástrico, en el ADN aislado para detectar pólipo gástrico o cáncer gástrico.

40 Se divulga aun adicionalmente una composición para el diagnóstico de pólipo gástrico o cáncer gástrico, que contiene una sustancia capaz de detectar la metilación de la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2).

45 Se divulga aún además un chip de ácidos nucleicos para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que tiene inmovilizado sobre el mismo una sonda capaz de hibridar con un fragmento que comprende la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2) bajo una condición estricta.

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

50 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de los niveles de metilación del gen del biomarcador SDC2, que se une específicamente al bisfenol A, en el tejido gástrico normal, a la displasia de grado bajo y a la displasia de grado alto mediante pirosecuenciación.

55 La figura 2A es un gráfico que muestra los resultados de medir el nivel de metilación del gen del biomarcador SDC2 en una línea celular de cáncer gástrico mediante pirosecuenciación; La figura 2B es un gráfico que muestra los resultados de medir los niveles de metilación del gen del biomarcador SDC2 en tejido gástrico normal, tejido de cáncer gástrico y un tejido gástrico normal adyacente al tejido del cáncer gástrico por pirosecuenciación; y la figura 60 2C muestra los resultados de la medición de la sensibilidad y especificidad del gen del biomarcador SDC2 para el diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis de la curva ROC.

La figura 3A muestra los resultados de la medición de los niveles de metilación del gen biomarcador SDC2 en los ADN séricos de personas normales y pacientes con cáncer gástrico por el método qMSP; y la figura 3B muestra los resultados de la medición de la sensibilidad y especificidad del gen del biomarcador SDC2 para el diagnóstico del

cáncer gástrico mediante el análisis de la curva ROC para evaluar la capacidad del gen del biomarcador SDC2 para diagnosticar el cáncer gástrico.

5 La figura 4 muestra los resultados de la medición de los niveles de metilación del gen del biomarcador SDC2 en los tejidos cancerosos y los tejidos normales de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de cuello uterino y pacientes con cáncer de próstata mediante pirosecuenciación.

10 La figura 5 muestra los resultados de la medición de los niveles de metilación del gen del biomarcador SDC2 en los sueros de las personas normales que se determinan como pacientes normales por gastroscopía y pólipo gástrico, y los resultados del análisis de la curva ROC.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura usada en el presente documento es bien conocida y se emplea comúnmente en la técnica.

20 La presente invención se refiere al uso de la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2), que está metilado específicamente en pólipo gástrico o cáncer gástrico, como un biomarcador. De acuerdo con esto, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de una isla CpG metilada del gen sindecan-2 (SDC2) localizada en una región establecida en la SEQ ID NO: 1 para diagnosticar cáncer gástrico o pólipo gástrico.

25 En la presente invención, la isla CpG está situada en la región promotora del gen SDC2, en particular, la isla CpG está situada en una región representada por la SEQ ID NO: 1.

30 Los genes marcadores de metilación específicos de cáncer de pólipo gástrico se pueden usar para el cribado del cáncer gástrico, la evaluación del riesgo, el pronóstico, la identificación de la enfermedad, el diagnóstico de etapas de la enfermedad y la selección de dianas terapéuticas. Particularmente, el gen SDC2 que es un gen biomarcador según la presente invención, mostró un alto nivel y frecuencia de metilación positiva en pólipo gástrico que es una lesión precancerosa de cáncer gástrico, lo que sugiere que el gen SDC2 es útil como biomarcador para el diagnóstico de cáncer pólipo gástrico y diagnóstico precoz de cáncer gástrico.

35 En la presente invención, la isla CpG metilada puede detectarse mediante una sustancia capaz de detectar la metilación de la isla CpG, que puede ser cualquiera seleccionada del grupo que consiste en un par de cebadores capaz de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG metilada, una sonda capaz de hibridarse con la isla CpG metilada, una proteína de unión específica de metilación o un anticuerpo de unión específico de metilación que es capaz de unirse a la isla CpG metilada, un cebador de secuenciación, un cebador de secuenciación por síntesis y una cebador de secuenciación por ligación.

40 La identificación de genes que están metilados en el cáncer gástrico y las anomalías en diversas etapas del cáncer gástrico permiten diagnosticar el cáncer gástrico en una etapa temprana de una manera precisa y efectiva y permite el perfil de metilación de múltiples genes y la identificación de nuevos objetivos para la intervención terapéutica. Además, los datos de metilación pueden combinarse con otros métodos de detección de biomarcadores no relacionados con la metilación para obtener un sistema más preciso para el diagnóstico de cáncer gástrico.

45 De acuerdo con el método divulgado aquí, la progresión del cáncer gástrico en diversas etapas o fases puede diagnosticarse determinando la etapa de metilación de uno o más biomarcadores de ácidos nucleicos obtenidos a partir de una muestra. Al comparar la etapa de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra en cada etapa del cáncer gástrico con la etapa de metilación de uno o más ácidos nucleicos aislados de una muestra en la que no hay un desorden proliferativo celular del tejido gástrico, puede detectarse una etapa específica del estómago cáncer en la muestra. Aquí, la etapa de metilación puede ser hipermetilación.

50 En una realización, el ácido nucleico puede estar metilado en la región reguladora de un gen. En otra realización, un gen que está implicado en la transformación celular puede diagnosticarse detectando la metilación fuera de la región reguladora del gen, porque la metilación procede hacia adentro desde el exterior del gen.

55 Un ejemplo del kit divulgado en este documento incluye: un medio de soporte dividido en compartimentos para recibir una muestra en el mismo; y uno o más recipientes que comprenden un primer recipiente que contiene un reactivo que escinde sensiblemente citosina no metilada, un segundo recipiente que contiene cebadores para la amplificación de un ácido nucleico que contiene CpG, y un tercer recipiente que contiene un medio para detectar la presencia de ácidos nucleicos escindido o no escindido. Los cebadores contemplados para uso de acuerdo con la invención incluyen las secuencias establecidas en las SEQ ID NO: 2, 3, 5 y 6, y cualquier combinación funcional y fragmentos de la misma. La combinación funcional o fragmento se usa como cebador para detectar si se ha producido metilación en la región del genoma que se busca detectar.

65

Además, un trastorno proliferativo celular (displasia) de tejido gástrico en una muestra puede diagnosticarse detectando la metilación del gen SDC2 (sindecan-2) usando un kit o un chip de ácidos nucleicos.

5 Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un ácido nucleico modificado para el diagnóstico de pólipo gástrico o cáncer gástrico, derivado de un fragmento del gen SDC2 (sindecan-2) establecido en la SEQ ID NO: 1, en donde el ácido nucleico modificado se obtiene modificando el fragmento del gen SDC2 de modo que al menos un residuo de citosina en el fragmento del gen SDC2 se modifique a uracilo o a un nucleótido distinto de la citosina en un proceso de hibridación.

10 En la presente invención, el ácido nucleico modificado puede comprender una secuencia establecida en la SEQ ID NO: 23.

15 Se divulga además un kit para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que comprende: un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2); y un cebador de secuenciación para pirosecuenciación de un producto de PCR amplificado por el par de cebadores.

20 Se divulga además un chip de ácidos nucleicos para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que ha inmovilizado sobre el mismo una sonda capaz de hibridarse con un fragmento que comprende el gen de la isla CpG del gen sindecan-2 (SDC2) en una condición estricta.

25 El uso del kit de diagnóstico o del chip de ácidos nucleicos permite la detección de un trastorno proliferativo celular (displasia) de tejido gástrico en una muestra. El método de detección comprende determinar el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de una muestra, y el estado de metilación de al menos un ácido nucleico se puede comparar con el estado de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra en la que no hay trastorno proliferativo celular (displasia) del tejido gástrico.

30 En aún otra realización de la presente invención, las células que pueden formar cáncer gástrico se pueden diagnosticar en una etapa temprana usando los genes marcadores de metilación. Cuando los genes confirmados como metilados en las células cancerosas están metilados en las células que parecen normales desde el punto de vista clínico o morfológico, esto indica que las células que aparecen normales evolucionan hacia el cáncer. Por lo tanto, el cáncer gástrico puede diagnosticarse en una etapa temprana mediante la detección de la metilación de genes específicos del cáncer gástrico en células que parecen normales. Particularmente, en un ejemplo de la presente invención, se encontró que el gen SDC2 (sindecan-2) puede usarse para el diagnóstico de pólipo gástrico que es una lesión precancerosa de cáncer gástrico.

35 La presente invención permite que las células que pueden formar cáncer gástrico se diagnostiquen en una etapa temprana usando los genes marcadores de metilación. Cuando los genes confirmados como metilados en las células cancerosas están metilados en las células que parecen normales desde el punto de vista clínico o morfológico, esto indica que las células que normalmente aparecen evolucionan hacia el cáncer. Por lo tanto, el cáncer gástrico puede diagnosticarse en una etapa temprana mediante la detección de la metilación de genes específicos del cáncer gástrico en células que parecen normales.

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

45 La probabilidad de progresión del tejido al cáncer gástrico puede evaluarse examinando la frecuencia de metilación de un gen que está específicamente metilado en el cáncer gástrico, y determinando la frecuencia de metilación del tejido que es probable que progrese a cáncer gástrico.

50 Por lo tanto, en otro aspecto más, la presente especificación divulga un método para detectar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que comprende las etapas de:

- 55 (a) aislar ADN de una muestra clínica; y
 60 (b) medir la metilación de la isla CpG del gen SDC2 (sindecan-2), que es un pólipo gástrico o un biomarcador del cáncer gástrico, en el ADN aislado para detectar pólipo gástrico o cáncer gástrico.

En este método, la etapa (b) puede realizarse midiendo la metilación de cualquiera de las regiones del promotor, región 5 no traducida (UTR), intrón y exón del gen. Preferiblemente, se mide la metilación de la isla CpG en una región del gen SDC2, que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

65

5 En el método, la etapa (b) puede realizarse mediante un método seleccionado del grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR específica de metilación en tiempo real, ensayo de PCR usando una proteína de unión específica de ADN de metilación, PCR cuantitativa, ensayo basado en chips de ADN, pirosecuenciación y secuenciación de bisulfato. Además, la muestra clínica puede seleccionarse del grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma sanguíneo, heces y orina de un paciente sospechoso de cáncer o un sujeto por diagnosticar, pero no se limita a estas.

10 El método descrito aquí para detectar la metilación de un gen puede comprender: (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; (b) aislar ADN de la muestra clínica; (c) amplificar el ADN aislado usando cebadores capaces de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del promotor o intrón de un gen SDC2; y (d) determinar si el intrón se metiló basándose en si el ADN se amplificó en la etapa (c).

15 Se puede diagnosticar un trastorno proliferativo celular (displasia) de tejido gástrico en una muestra detectando el estado de metilación del gen SDC2 (NM_002998, Sindecán 2) usando un kit.

Se describe un kit para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que contiene: un par de cebadores de PCR para amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del gen SDC2 (NM_002998, Sindecán 2); y un cebador de secuenciación para pirosecuenciación de un producto de PCR amplificado por el par de cebadores:

20 En la presente invención, el par de cebadores de PCR puede ser un par de cebadores establecido en SEQ ID NO: 2 y 3, o un par de cebadores establecido en SEQ ID NOS: 5 y 6.

En la presente invención, el cebador de secuenciación puede ser un cebador establecido en SEQ ID NO: 4 o 7.

25 Se puede diagnosticar un trastorno proliferativo celular (displasia) de células de tejido gástrico en una muestra detectando el estado de metilación del gen SDC2 (NM_002998, Sindecán 2) usando un chip de ácidos nucleicos.

30 Se describe, por lo tanto, un chip de ácidos nucleicos para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que tiene inmovilizado sobre el mismo una sonda capaz de hibridar con un fragmento que comprende el gen de la isla CpG de sindecán-2 (SDC2) en una condición estricta.

35 En la presente invención, la isla CpG metilada puede detectarse mediante una sonda capaz de hibridarse con un fragmento que comprende la isla CpG. La sonda se puede seleccionar del grupo que consiste en las secuencias de bases indicadas en las SEQ ID NO: 8 a 19, y ejemplos específicos de las mismas son las siguientes:

SDC2

- 1) 5'-cggagctgcc aatcggcgtg taatcctgta-3' (SEQ ID NO: 8)
- 2) 5'-ctgccgtagc tcccttcaa gccagcgaat ttattccta aaaccagaaa-3' (SEQ ID NO: 9)
- 3) 5'-gcacgggaaa ggagtcgcg gaggagcaaa accacagcag agcaagaaga-3' (SEQ ID NO: 10)
- 4) 5'-gcagcctcc cggagcacca actccgtgc gggagtcag aaaccaaca gtgagagggc-3' (SEQ ID NO: 11)
- 5) 5'-cccagccc agtccccgag cctgagccgc aatcgtcgc gtactctgct-3' (SEQ ID NO: 12)
- 6) 5'-ctgtgtgcc tgcgtgctcg cggagtcggt gaggggcca-3' (SEQ ID NO: 13)

45 Sonda de secuencia de ácidos nucleicos modificada

- 1') 5'-cggagtgtt aatcggcgtg taatttga-3' (SEQ ID NO: 14)
- 2') 5'-ttgtcgtagt ttttttaa gtagcgaat ttatttta aaattagaaa-3' (SEQ ID NO: 15)
- 3') 5'-gtacgggaaa ggagtcgcg gaggagtaaa attatagtag agtaagaaga-3' (SEQ ID NO: 16)
- 4') 5'-gtagttttt cggagtatta attcgtgc gggagtcag aaattaataa gtgagaggg-3' (SEQ ID NO: 17)
- 5') 5'-ttcgagttcg agtttcgag tttagtcgt aatcgtgcg gtatttgtt-3' (SEQ ID NO: 18)
- 6') 5'-ttgtgtgtt tgcgtgctcg cggagtcggt gaggggta-3' (SEQ ID NO: 19)

55 El uso del kit de diagnóstico o del chip de ácidos nucleicos descrito permite determinar el crecimiento anormal (progresión displásica) de células de tejido gástrico en una muestra. El método comprende determinar el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de una muestra, en donde el estado de metilación de al menos un ácido nucleico se compara con la etapa de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra en la que no hay crecimiento anormal (progresión displásica) de las células gástricas.

60 Las células de cáncer gástrico transformadas pueden detectarse examinando la metilación del gen marcador usando el kit o el chip de ácidos nucleicos descrito.

65 El cáncer gástrico puede diagnosticarse examinando la metilación del gen marcador usando el kit o el chip de ácidos nucleicos descrito.

La probabilidad de progresión al cáncer gástrico puede diagnosticarse examinando la metilación del gen marcador en una muestra que muestra un fenotipo normal usando el kit descrito o el chip de ácidos nucleicos. La muestra que se usa puede ser tejido sólido o líquido, células, heces, orina, suero o plasma sanguíneo.

5 Los términos principales que se usan en este documento se definen a continuación.

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

Como se usa en el presente documento, el término "detección temprana" de cáncer se refiere al descubrimiento de la probabilidad de cáncer antes de la metástasis, y preferiblemente antes de la observación de un cambio morfológico en un tejido o célula. Además, el término "detección temprana" de transformación celular se refiere a la alta probabilidad de que una célula experimente una transformación en sus primeras etapas antes de que la célula sea designada morfológicamente como transformada.

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

20 Como se usa en este documento, el término "muestra" o "muestra clínica" se denomina en su sentido más amplio, e incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, una línea celular, un cultivo de tejido, dependiendo del tipo del ensayo que se va a realizar. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos son bien conocidos en la técnica. Una biopsia de tejido gástrico es una fuente preferida.

25 Uso de células cancerosas para la comparación entre el biomarcador del cáncer gástrico y las células normales

En la presente invención, las células "normales" se refieren a aquellas que no muestran ningún cambio morfológico o citológico anormal. Las células "tumoraes" son células cancerosas. Las células "no tumorales" son aquellas que forman parte del tejido enfermo pero que no se consideran como parte del tumor.

30 La presente invención se basa en el descubrimiento de la relación entre el cáncer gástrico y la hipermetilación del gen SDC2 (NM_002998, Sindecin 2).

35 Se puede diagnosticar un trastorno proliferativo celular de células de tejido gástrico en una etapa temprana mediante la determinación de la etapa de metilación de al menos un ácido nucleico de un sujeto usando el kit descrito o el chip de ácidos nucleicos. Aquí, la etapa de metilación de al menos un ácido nucleico se puede comparar con el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto que no tiene un trastorno proliferativo celular del tejido gástrico. El ácido nucleico es preferiblemente un ácido nucleico que contiene CpG tal como una isla CpG.

40 Se puede diagnosticar un trastorno proliferativo celular del tejido gástrico determinando la metilación de al menos un ácido nucleico de un sujeto usando el kit o el chip de ácidos nucleicos. Aquí, el ácido nucleico puede ser SDC2 (NM_002998, Sindecin 2). La metilación de al menos un ácido nucleico se puede comparar con el estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto que no tiene predisposición a un trastorno proliferativo celular del tejido gástrico.

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

50 En otro aspecto, la presente especificación divulga un método para diagnosticar un trastorno proliferativo celular de tejido gástrico, comprendiendo el método poner en contacto una muestra que comprende un ácido nucleico con un agente capaz de determinar el estado de metilación de la muestra, y determinar la metilación de al menos una región del al menos un ácido nucleico. Aquí, la metilación de al menos una región en al menos un ácido nucleico difiere de la etapa de metilación de la misma región en un ácido nucleico presente en un sujeto en donde no hay crecimiento anormal de células.

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

60 El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, o fragmentos del mismo, o ADN o ARN de cadena sencilla o doble cadena de origen genómico o sintético, ADN o ARN en sentido o de cadena antisentido de origen genómico o sintético, ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material de tipo ADN o similar a ARN de origen natural o sintético. Será evidente para los expertos en la técnica que, cuando el ácido nucleico es ARN, los desoxinucleótidos A, G, C y T son reemplazados por los ribonucleótidos A, G, C y U, respectivamente.

Se puede usar cualquier ácido nucleico en la presente invención, dado que se puede detectar la presencia de islas CpG metiladas de forma diferente. La isla CpG es una región rica en CpG en una secuencia de ácidos nucleicos.

Metilación

5 En la presente invención, se puede usar cualquier muestra de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, siempre que contenga o se sospeche que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un locus diana (por ejemplo, ácido nucleico que contiene CpG). Una región de ácidos nucleicos capaz de metilarse diferencialmente es una isla CpG, una secuencia de ácidos nucleicos con una densidad incrementada con relación a otras regiones de ácidos nucleicos del dinucleótido CpG. El doblete CpG se produce en el ADN de los vertebrados a solo aproximadamente el 20% de la frecuencia que se esperaría de la proporción de pares de bases G^{*}C. En ciertas regiones, la densidad de los dobletes CpG alcanza el valor predicho; se incrementa en diez veces en relación con el resto del genoma. Las islas CpG tienen un contenido medio de G^{*}C de aproximadamente el 60%, en comparación con el promedio del 40% en el ADN a granel. Las islas toman la forma de tramos de ADN típicamente de aproximadamente una a dos kilobases de longitud. Hay aproximadamente 45000 islas en el genoma humano.

20 En muchos genes, las islas CpG comienzan justo corriente arriba de un promotor y se extienden corriente abajo en la región transcrita. La metilación de una isla CpG en un promotor normalmente suprime la expresión del gen. Las islas también pueden rodear la región 5' de la región de codificación del gen así como la región 3' de la región de codificación. Por lo tanto, las islas CpG pueden encontrarse en múltiples regiones de una secuencia de ácidos nucleicos que incluye corriente arriba de secuencias codificantes en una región reguladora que incluye una región promotora, en las regiones codificantes (por ejemplo, exones), corriente abajo de regiones codificantes en, por ejemplo, regiones potenciadoras y en intrones.

25 Típicamente, el ácido nucleico que contiene CpG es ADN. Sin embargo, el método descrito anteriormente puede emplear, por ejemplo, muestras que contienen ADN, o ADN y ARN que contienen ARNm, en donde el ADN o ARN puede ser de cadena sencilla o doble cadena, o se puede incluir un híbrido ADN-ARN en la muestra.

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

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

45 En un aspecto de la invención, el estado de metilación en ácidos nucleicos de la muestra obtenida de un sujeto es la hipermetilación en comparación con las mismas regiones del ácido nucleico en un sujeto que no tiene cáncer gástrico o pólipo gástrico. La hipermetilación como se usa en el presente documento se refiere a la presencia de alelos metilados en uno o más ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de un sujeto que no tiene cáncer gástrico o pólipo gástrico no contienen alelos metilados detectables cuando se examinan los mismos ácidos nucleicos.

Genes y panel individuales

50 Se entiende que la presente invención se puede practicar usando el gen SDC2 por separado como un marcador de diagnóstico o pronóstico o SDC2 y algunos genes marcadores adicionales combinados en un formato de visualización de panel para que se puedan detectar varios genes marcadores para el patrón general o listado de genes que están metilados para aumentar la fiabilidad y la eficiencia. Además, el gen SDC2 identificado en la presente invención se puede usar individualmente o como un conjunto de genes en cualquier combinación con cualquiera de los otros genes que se enumeran aquí. Alternativamente, los genes se pueden clasificar según su importancia y ser ponderados y, junto con la cantidad de genes que están metilados, se puede asignar un nivel de probabilidad de desarrollar cáncer.

Método para la detección de la metilación

60 Aquí se divulga un método para diagnosticar pólipo gástrico o cáncer gástrico, que comprende tratar ADN genómico, aislado de una muestra clínica, con bisulfito para convertir el sitio SDC2 CpG y detectar la metilación del sitio CpG SDC2 convertido usando al menos un oligonucleótido sintético que es complementario a la misma o es capaz de hibridarse con ella.

65

PCR específica de metilación

5 Cuando el ADN genómico se trata con bisulfito, la citosina en la región 5'-CpG-3' permanece intacta, si se metiló, pero la citosina cambia a uracilo, si no se metiló. Por consiguiente, basándose en la secuencia de bases convertida después del tratamiento con bisulfito, se construyen conjuntos de cebadores de PCR correspondientes a una región que tiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. Aquí, los conjuntos de cebadores construidos son dos tipos de conjuntos de cebadores: un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia de bases metiladas, y un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia de bases no metilada. Cuando el ADN genómico se convierte con bisulfito y luego se amplifica mediante PCR usando los dos tipos anteriores de conjuntos de cebadores, el producto de PCR se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia de bases metiladas, si el ADN genómico se metila, pero el ADN genómico se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a los no metilados, si el ADN genómico no se metiló. Esta metilación puede analizarse cuantitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa.

15 PCR específica de metilación en tiempo real

La PCR específica de metilación en tiempo real es un método de medición en tiempo real modificado del método de PCR específico de metilación y comprende tratar el ADN genómico con bisulfito, diseñar cebadores de PCR correspondientes a la secuencia de bases metiladas y realizar PCR en tiempo real usando los cebadores. Los métodos para detectar la metilación del ADN genómico incluyen dos métodos: un método de detección que usa una sonda TanMan complementaria a la secuencia de la base amplificada; y un método de detección usando Sybergreen. Por lo tanto, la PCR específica de metilación en tiempo real permite el análisis cuantitativo selectivo de ADN metilado. Aquí, se traza una curva estándar usando una muestra de ADN metilado in vitro, y un gen que no contiene secuencia 5'-CpG-3' en la secuencia base también se amplifica como un grupo de control negativo para la estandarización para analizar cuantitativamente el grado de metilación.

Pirosecuenciación

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

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

40 Cuando una proteína que se une específicamente solo al ADN metilado se mezcla con ADN, la proteína se une específicamente solo al ADN metilado. Por lo tanto, cualquiera de las dos PCR que utiliza una proteína de unión específica por metilación o un ensayo de chip de ADN permite el aislamiento selectivo solo de ADN metilado. El ADN genómico se mezcla con una proteína de unión específica de metilación, y luego solo se aísla selectivamente el ADN metilado. El ADN aislado se amplifica utilizando cebadores de PCR correspondientes a la región promotora, y luego se mide la metilación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

45 Además, la metilación de ADN también se puede medir mediante un método de PCR cuantitativa, y el ADN metilado aislado con una proteína de unión específica de ADN metilada se puede marcar con una sonda fluorescente e hibridar con un chip de ADN que contiene sondas complementarias, midiendo de ese modo la metilación del ADN. En este documento, la proteína de unión específica de ADN metilada puede ser, pero no se limita a, MBD2bt (proteína 2 de dominio de unión a CpG de metilo truncada).

Detección de endonucleasa de restricción sensible a metilación diferencial-metilación

55 La detección de la metilación diferencial se puede llevar a cabo poniendo en contacto una muestra de ácidos nucleicos con una endonucleasa de restricción sensible a la metilación que escinde solamente sitios CpG no metilados.

60 En una reacción separada, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a la metilación que escinde los sitios CpG metiladas y no metilados, escindiendo así el ácido nucleico metilado.

65 Se añaden cebadores específicos a la muestra de ácido nucleico, y el ácido nucleico se amplifica mediante cualquier método convencional. La presencia de un producto amplificado en la muestra tratada con la enzima de restricción sensible a la metilación pero con la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a la metilación, indica que ha tenido lugar la metilación en la región de ácidos nucleicos ensayada. Sin embargo, la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada

con la enzima de restricción sensible a la metilación junto con la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquímico de la enzima de restricción sensible a la metilación indica que no ha ocurrido metilación en la región analizada del ácido nucleico.

5 Como se usa en este documento, el término "enzima de restricción sensible a la metilación" se refiere a una enzima de restricción (por ejemplo, SmaI) que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento y tiene actividad cuando C está metilada en comparación con lo que sucede cuando el C es no metilado. Ejemplos no limitantes de enzimas de restricción sensibles a la metilación incluyen MspI, HpaII, BssHII, BstUI y NotI. Tales enzimas se pueden usar solas o en combinación. Ejemplos de otras enzimas de restricción sensibles a la metilación incluyen, pero sin limitación, SacII y EagI.

10 El isoesquímico de la enzima de restricción sensible a la metilación es una enzima de restricción que reconoce el mismo sitio de reconocimiento que la enzima de restricción sensible a la metilación, pero escinde tanto los CG metilados como los no metilados. Un ejemplo de estos incluye MspI.

15 Los cebadores para uso en la presente invención están diseñados para ser "sustancialmente" complementarios para cada cadena del locus por amplificar e incluyen los nucleótidos G o C apropiados como se discutió anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus cadenas respectivas en condiciones de reacción de polimerización. Los cebadores para usar en la presente invención se usan en el proceso de amplificación, que es una reacción en cadena enzimática (por ejemplo, PCR) en la que un locus diana aumenta exponencialmente a través de una serie de etapas de reacción. Típicamente, un cebador es homólogo con la cadena negativa (-) del locus (cebador antisentido), y el otro cebador es homólogo con la cadena positiva (+) (cebador en sentido). Después de que los cebadores se reasocian al ácido nucleico desnaturalizado, la cadena de ácidos nucleicos se extiende mediante una enzima tal como ADN polimerasa I (Klenow) y reactivos tales como nucleótidos y, como resultado, se sintetizan en ese momento cadenas + y - que contienen la secuencia de locus diana. Cuando el locus objetivo recién sintetizado se utiliza como plantilla y se somete a ciclos repetidos de desnaturalización, apareamiento de cebadores y extensión, se produce la síntesis exponencial de la secuencia del locus diana. El producto de reacción resultante es un dúplex discreto de ácidos nucleicos con extremos correspondientes a los extremos de los cebadores específicos empleados.

20 La reacción de amplificación es PCR, la cual se usa comúnmente en la técnica. Sin embargo, también se pueden usar métodos alternativos tales como PCR en tiempo real o amplificación lineal usando enzima isotérmica. Además, también se pueden usar reacciones de amplificación multiplex.

35 Método de secuenciación con bisulfito

Otro método para detectar un ácido nucleico que contiene CpG metilada comprende poner en contacto una muestra que contiene ácidos nucleicos con un reactivo que modifica la citosina no metilada y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra usando cebadores de oligonucleótidos independientes de la metilación. En este documento, los cebadores oligonucleotídicos amplifican el ácido nucleico sin distinguir entre ácido nucleico metilado modificado y ácido nucleico no metilado. El producto amplificado se secuencia por el método de Sanger usando un cebador de secuenciación o se secuencia por un método de secuenciación de próxima generación descrito en relación con la secuenciación con bisulfito para la detección de ácidos nucleicos metilados. Aquí, el método de secuenciación de próxima generación puede realizarse mediante una técnica de secuenciación por síntesis o secuenciación por ligación. Este método se caracteriza porque, en lugar de preparar clones bacterianos, se aísla un único fragmento de ADN espacialmente, se amplifica in situ (amplificación clonal) y se secuencia. Aquí, se leen cientos de miles de fragmentos al mismo tiempo, y por esta razón, el método también se llama "método de secuenciación paralelo masivo".

50 Típicamente, se usa el método de secuenciación por síntesis en donde se obtienen señales mientras se añaden mono- o di-nucleótidos secuencialmente. Los ejemplos de este método incluyen métodos de pirosecuenciación, torrente de iones y Solexa.

55 Los sistemas NGS basados en la secuencia por síntesis incluyen la plataforma 454 (Roche), la plataforma HiSeq (Illumina), la plataforma Ion PGM (Life Technology) y la plataforma PacBio (Pacific BioSciences). Las plataformas 454 e Ion PGM utilizan PCR de emersión para la amplificación clonal, y la plataforma HiSeq usa la amplificación Bridge. En el método de secuenciación por síntesis, la secuenciación se lleva a cabo mediante la detección de fosfato, ion hidrógeno o fluorescencia, que se genera cuando el ADN se sintetiza mediante la adición secuencial de nucleótidos únicos. En el proceso de detección de secuencias, la plataforma 454 se basa en la pirosecuenciación y la plataforma Ion PGM se basa en la detección de iones de hidrógeno. Las plataformas HiSeq y PacBio realizan la secuencia detectando fluorescencia.

60 El método de secuenciación por ligación es una técnica de secuenciación que usa ADN ligasa, y se realiza para identificar un nucleótido presente en una posición específica de una secuencia de nucleótidos de ADN. A diferencia de la mayoría de las técnicas de secuenciación que usan la polimerasa, el método de secuenciación por ligación se caracteriza porque la polimerasa no se usa y la ADN ligasa no liga las secuencias desajustadas. El sistema SOLiD

65

corresponde a este método. En esta técnica, se leen dos nucleótidos en cada paso del proceso de secuenciación. La lectura se repite individualmente cinco veces mediante el reinicio del cebador y, por lo tanto, cada nucleótido se lee dos veces, lo que hace que los datos sean muy precisos.

5 En el método de secuenciación por ligación, entre conjuntos de cebadores de dinucleótidos compuestos de 16 combinaciones, los cebadores de dinucleótidos correspondientes a la secuencia de nucleótidos de interés se unen secuencialmente, y finalmente se analiza una combinación de las ligaciones para determinar la secuencia de nucleótidos del ADN de interés.

10 Secuenciación, secuenciación por síntesis o secuenciación por ligación que utiliza proteína de unión o anticuerpo específico de ADN metilado

15 En un método de secuenciación o secuenciación de próxima generación que usa una proteína o anticuerpo de unión específico de ADN metilado, una proteína o anticuerpo que se une específicamente al ADN metilado se mezcla con ADN, y luego se une específicamente al ADN metilado. Por lo tanto, solo el ADN metilado puede aislarse selectivamente. En la presente invención, se mezcló ADN genómico con una proteína de unión específica de ADN metilada, y luego solo se aisló selectivamente el ADN metilado. El ADN aislado se amplificó usando cebadores de PCR, y luego se midió si el ADN estaba metilado, mediante el método de Sanger o el método de secuenciación por síntesis o secuenciación por ligación.

20 Aquí, el método de secuenciación de próxima generación se puede realizar por el método de secuenciación por síntesis o secuenciación por ligación. Además, la proteína de unión específica de ADN metilada puede ser MBD2bt, pero no está limitada a la misma, y el anticuerpo puede ser 5'-metil-citosina, pero no se limita al mismo.

25 Kit

30 Se divulga un kit útil para la detección de un trastorno proliferativo celular en un sujeto. El kit comprende un medio portador compartimentado para recibir una muestra en el mismo, uno o más contenedores que comprenden un segundo contenedor que contiene cebadores de PCR para la amplificación de una secuencia de bases 5'-CpG-3' y un tercer contenedor que contiene un iniciador de secuenciación para pirosecuenciación de un producto amplificado de PCR

35 Los medios de soporte son adecuados para contener uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados que se usarán en el método. En vista de la descripción proporcionada en este documento del uso de la invención, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la distribución de los reactivos necesarios entre los contenedores.

Sustratos

40 Después de amplificar la región de ácidos nucleicos diana, el producto de amplificación de ácidos nucleicos puede hibridarse con una sonda de gen conocida unida a un soporte sólido (sustrato) para detectar la presencia de la secuencia de ácido nucleico.

45 Como se usa en el presente documento, el término "sustrato", cuando se usa en referencia a una sustancia, estructura, superficie o material, significa una composición que comprende una superficie no biológica, sintética, no viva, plana o redonda de la que hasta el momento no se sabe que comprenda un sitio de unión, hibridación o reconocimiento catalítico específico o una pluralidad de sitios de reconocimiento diferentes o un número de sitios de reconocimiento diferentes que excede el número de diferentes especies moleculares que comprenden la superficie, estructura o material. Ejemplos del sustrato incluyen, pero no se limitan a, semiconductores, metales sintéticos (orgánicos), semiconductores sintéticos, aislantes y dopantes; metales, aleaciones, elementos, compuestos y minerales; portaobjetos, dispositivos, estructuras y superficies sintéticas, escindidos, grabados, litografiados, impresos, mecanizados y microfabricados; polímeros industriales, plásticos, membranas de silicio, silicatos, vidrio, metales y cerámica; y fibras, materiales y tejidos de madera, papel, cartón, algodón, lana, tela, fibras, materiales y textiles tejidos y no tejidos; y superficies anfíbias.

55 Se sabe en la técnica que varios tipos de membranas tienen adhesión a secuencias de ácidos nucleicos. Ejemplos específicos no limitantes de estas membranas incluyen nitrocelulosa u otras membranas usadas para la detección de la expresión génica tales como cloruro de polivinilo, papel diazotado y otras membranas comercialmente disponibles tales como GENESCREEN™, ZETAPROBE™ (Biorad) y NYTRAN™. También se incluyen perlas, vidrio, obleas y sustratos metálicos. Los métodos para unir ácidos nucleicos a estos objetos son bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el cribado puede realizarse en una fase líquida.

60 Condiciones de hibridación

65 En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones usadas para alcanzar un nivel particular de restricción variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibridan. Por ejemplo, la longitud, el

grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC/AT) y el tipo de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN/ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos se pueden considerar en la selección de condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

Un ejemplo de condiciones de restricción progresivamente mayores es el siguiente: 2X SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0.2X SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente (condiciones de baja restricción); 0.2X SSC/0.1% SDS a 42°C (condiciones de restricción moderada); y 0.1X SSC a aproximadamente 68°C (condiciones de alta restricción). El lavado se puede llevar a cabo usando solo una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta restricción, o se puede usar cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden indicado anteriormente, repitiendo cualquiera o todos los pasos enumerados. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las condiciones óptimas variarán dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y pueden determinarse empíricamente. En general, las condiciones de alta restricción se usan para la hibridación de la sonda de interés.

Etiqueta

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

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Será obvio para una persona con experiencia ordinaria en la técnica que estos ejemplos son solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse para limitar el alcance de la presente invención.

Medición de la metilación del gen del biomarcador SDC2 en tejidos de pacientes con pólipos gástricos

Para evaluar la utilidad del gen del biomarcador SDC2 para el diagnóstico precoz del pólipo gástrico que es una lesión precancerosa, se aisló ADN genómico de tejidos gástricos normales (Biochain, 5 muestras) y los tejidos de parafina de pacientes con pólipos gástricos (proporcionados por el Biobank of the Chungnam National University Hospital, 10 muestras de displasia de grado bajo y 10 muestras de displasia de grado alto). El aislamiento del ADN genómico de los tejidos de parafina se realizó usando un QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La medición de la metilación se realizó mediante un método de pirosecuenciación cuantitativa. Se trataron 200 ng del ADN genómico aislado con bisulfito usando un kit de metilación EZ DNA-Gold (Zymo Research, Estados Unidos). Cuando el ADN se trató con bisulfito, la citosina no metilada se modificó a uracilo y la citosina metilada permaneció sin cambios. El ADN tratado con bisulfito se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación. Los cebadores de PCR y de secuenciación para realizar pirosecuenciación para el gen SDC2 se diseñaron usando el programa de diseño de ensayo PSQ (Qiagen, Alemania). Los cebadores de PCR y secuenciación para medir la metilación de cada gen se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Cebadores para PCR-bisulfito y pirosecuenciación

Genes	Cebadores	Secuencias (5'→3') ^a	SEQ ID NO:	Ubicación CpG	Tamaño del amplicón (bp)
SDC2	Avance	GGGAGTGTYGAAATTAATAAGTG	2	+460, +466, +473, +479	149
	Retroceso	Biotin-ACCAAACAAAACRAAACCTCCTACCCA	3		
	Secuenciación	AGGAGGAGGAAGYGAG	4		

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

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

Se amplificaron 20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito mediante PCR. En la amplificación por PCR, una solución de reacción de PCR (20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de regulador de PCR 10x (Enzymomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzymomics, Corea), 4 µl de dNTP 2.5 mM (Solgente, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95° durante 5 minutos y luego 45 ciclos de desnaturalización a 95° durante 40 segundos,

fusionamiento a 60° durante 45 segundos y extensión a 72° por 40 segundos, seguido de una extensión final a 72° por 5 minutos. La amplificación del producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.

5 El producto de PCR amplificado se trató con reactivos PyroGold (Biotage, Estados Unidos) y luego se sometió a pirosecuenciación usando el sistema PSQ96MA (Biotage, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la pirosecuenciación, se midió el nivel de metilación del ADN calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa promedio de unión de citosina a cada isla CpG.

10 Como resultado, como se puede ver en la figura 1, los tejidos gástricos normales no mostraron metilación, y la displasia de bajo grado mostró una frecuencia de metilación del 90.0% (9/10), y la displasia de alto grado mostró una frecuencia de metilación del 100% (10/10).

15 Dichos resultados indican que el gen biomarcador SDC2 mostró un alto nivel y frecuencia de metilación incluso en pólipo gástrico que es una lesión precancerosa de cáncer gástrico, lo que sugiere que el gen biomarcador SDC2 es útil como biomarcador para el diagnóstico de pólipo gástrico y diagnóstico de cáncer gástrico.

Ejemplo 2: Medición de la metilación del gen biomarcador en la línea celular de cáncer gástrico y tejido de cáncer gástrico

20 Para examinar si el gen del biomarcador SDC2 confirmado que está metilado en pólipo gástrico también es útil como biomarcador para el diagnóstico de cáncer gástrico, la pirosecuenciación se realizó de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 1.

25 Se aisló ADN genómico de la línea celular de cáncer gástrico AGS (Korean Cell Line Bank (KCLB No. 21739)), y los tejidos cancerosos de 41 pacientes con cáncer gástrico y tejidos normales adyacentes a los tejidos cancerosos (proporcionados por el Biobank of the Chungnam National University Hospital) utilizando un mini kit QIAamp DNA (Qiagen, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Se trataron 200 ng del ADN genómico aislado con bisulfito usando un kit de metilación EZ DNA-Gold (Zymo Research, Estados Unidos). Cuando el ADN genómico se trató con bisulfito, la citosina no metilada se modificó a uracilo y la citosina metilada permaneció sin cambios. El ADN tratado con bisulfito se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación.

35 La figura 2A muestra los resultados de la medición cuantitativa de los niveles de metilación del gen del biomarcador SDC2 en la línea celular de cáncer gástrico mediante el método de pirosecuenciación. Como puede verse en el mismo, el gen del biomarcador SDC2 se expresó a un alto nivel en la línea celular de cáncer gástrico AGS. Esto sugiere que el gen SDC2 muestra un alto nivel de metilación en la línea celular de cáncer gástrico, lo que indica que el gen SDC2 es útil como biomarcador para el diagnóstico del cáncer gástrico.

40 Para verificar esta sugerencia, se realizó un experimento sobre la verificación de la metilación del gen SDC2 en una muestra de tejido de cáncer gástrico.

45 Para verificar la metilación del gen SDC2 en tejido de cáncer gástrico, los niveles de metilación del gen SDC2 en tejidos de cáncer gástrico en diversas etapas de la enfermedad (estadio de la enfermedad 1:13 personas, estadio de la enfermedad 2:9 personas, estadio de la enfermedad 3:11 personas, y estadio de enfermedad 4:8 personas) se midieron de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1.

50 Como resultado, como se muestra en la figura 2B, el nivel de metilación del gen SDC2 en el tejido del cáncer gástrico fue significativamente mayor que en el tejido gástrico de las personas normales y el tejido gástrico normal adyacente al tejido del cáncer gástrico.

55 Además, para evaluar la sensibilidad y especificidad del gen SDC2 para el diagnóstico de cáncer gástrico, se realizó el análisis de la curva ROC. Como resultado, el gen mostró una alta sensibilidad del 90.2% y una especificidad muy alta del 100% (Figura 2C). Dichos resultados indican que el gen biomarcador de metilación SDC2 es útil para el diagnóstico de cáncer gástrico.

Ejemplo 3: Medición de la metilación del gen biomarcador SDC2 en sueros de pacientes con cáncer gástrico

60 Para examinar la utilidad del gen del biomarcador SDC2 como un biomarcador para el diagnóstico de cáncer gástrico usando suero, la metilación del gen del biomarcador SDC2 en el suero de pacientes con cáncer gástrico se midió con el método de PCR cuantitativa en tiempo real específica de metilación (qMSP).

65 Para este propósito, se diseñaron dos cebadores de PCR (IDT, Estados Unidos) capaces de amplificar específicamente el gen SDC2 metilado tratado con bisulfito y una sonda fluorescente (IDT, Estados Unidos). Para determinar la cantidad y calidad del ADN sérico tratado con bisulfito, se usó el gen ACTB como control interno. Las

secuencias de los cebadores de PCR y la sonda fluorescente utilizadas en qMSP se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Secuencias de cebadores y sonda fluorescente para qMSP

Gen	Secuencias (5'→ 3')	SEQ ID NO:	Tamaño del producto amplificado (bp)
SDC2	Avance: TAGAAATTAATAAGTGAGAGGGCGT	5	121
	Retroceso: GACTCAAACCTCGAAAACCTCGAA	6	
	Sonda fluorescente: FAM-AGTAGGCGTAGGAGGAGGAAGCGA - Iowa Black	7	
ACTB	Avance: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	20	136
	Retroceso: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA	21	
	Sonda fluorescente: TET- ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA - Iowa Black	22	

5

El ADN genómico se aisló a partir de 800 µl de suero usando un kit DynalBeads SILANE viral NA (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico aislado se trató con bisulfito usando un kit de metilación EZ DNA-Gold (Zymo Research, Estados Unidos), y luego se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se usó en qMSP. Se usó 1/3 del volumen del ADN genómico tratado con bisulfito en qMSP. La PCR en tiempo real se realizó usando un sistema Rotor Gene-Q Real Time PCR (Qiagen, Alemania) con un kit de sonda Rotor Gene (Qiagen, Alemania). Un volumen final de 20 µl se sometió a PCR en tiempo real en las siguientes condiciones: para SDC2, 10 min a 95°, y 50 ciclos, cada uno de los cuales consiste en 10 segundos a 95°, 1 segundo a 62° y 20 segundos a 72°C.; para ACTB, 10 min a 95°, y 50 ciclos, cada uno de los cuales consiste en 10 segundos a 95°, 60 segundos a 58°. El nivel de metilación se midió como el porcentaje de referencia metilado (PMR) mediante un método de umbral de ciclo comparativo (Ct), y el ADN genómico metilado artificialmente de la línea celular de cáncer gástrico AGS (Korean Cell Line Bank (KCLB No. 21739)) fue usado como referencia. El PMR se calculó usando la siguiente ecuación: $PMR = 2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100$; $\Delta\Delta Ct = [(C_{tSDC2} - C_{tACTB})_{muestra}] - [(C_{tSDC2} - C_{tACTB})_{AGS}]$.

Para evaluar la capacidad del gen del biomarcador SDC2 para diagnosticar el cáncer gástrico en suero, el ADN en los sueros de 130 personas normales y 40 pacientes con cáncer gástrico se sometió a qMSP.

Como resultado, como se puede ver en la figura 3A, los sueros de las personas normales mostraron poca o ninguna metilación del gen del biomarcador SDC2, y los sueros de los pacientes con cáncer gástrico mostraron metilación del gen del biomarcador SDC2 a un alto nivel y frecuencia. Particularmente, los sueros en las etapas 1 y 2 de la enfermedad del cáncer gástrico mostraron un alto nivel y frecuencia de metilación del gen del biomarcador SDC2.

Para medir la sensibilidad y la especificidad del gen del biomarcador SDC2 para el diagnóstico del cáncer gástrico, se realizó el análisis de la curva ROC (característica de funcionamiento del receptor) usando el programa MedCalc (MEDCALC, Bélgica).

Como resultado, como se muestra en la figura 3B, el gen SDC2 mostró una sensibilidad y especificidad de 80.0% y 96.9%, respectivamente, lo que sugiere que tiene una capacidad muy alta para diagnosticar el cáncer gástrico. En particular, el gen SDC2 mostró una sensibilidad del 80.0% para el cáncer gástrico avanzado o el cáncer gástrico avanzado, lo que sugiere que es útil para el diagnóstico precoz del cáncer gástrico.

Ejemplo 4: Medición de la metilación de los genes del biomarcador SDC2 en otros tejidos sólidos del cáncer

Para examinar si el gen del biomarcador SDC2 se puede usar específicamente como un marcador de diagnóstico específico del pólipo gástrico y cáncer gástrico, se realizaron experimentos con otros tipos de cáncer. Para que el gen del biomarcador SDC2 se use como un marcador para el diagnóstico de pólipo gástrico o cáncer gástrico, no debe metilarse en varios tejidos orgánicos de personas normales distintas de los pacientes y en otros tejidos cancerosos sólidos.

Para verificar si el gen biomarcador SDC2 satisface este requisito, el ADN genómico se separó de diversos tejidos orgánicos (Biochain) de personas normales distintas de pacientes, diversos tejidos sólidos de cáncer y tejidos normales adyacentes a los tejidos cancerosos (proporcionados por el Biobank of the Chungnam National University Hospital) utilizando un kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Estados Unidos). Se trataron 200 ng del ADN genómico aislado con bisulfito usando un kit de metilación EZ DNA-Gold (Zymo Research, Estados Unidos), y luego se eluyeron con 20 µl de agua destilada estéril y se usaron en pirosecuenciación.

20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito se amplificaron por PCR. En la amplificación por PCR, una solución de reacción de PCR (20 ng del ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de regulador de PCR 10× (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de dNTP 2.5 mM (Solgente, Corea), y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores de PCR), y la reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones: predesnaturalización a 95° durante 5 minutos y luego 45 ciclos de desnaturalización a 95° durante 40 segundos, fusión a 60D durante 45 segundos y extensión a 72° durante 40 segundos, seguido de una extensión final a 72° durante 5 minutos. La amplificación del producto de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.

El producto de PCR amplificado se trató con reactivos PyroGold (Biotage, Estados Unidos), y luego se sometió a pirosecuenciación usando el sistema PSQ96MA (Biotage, Estados Unidos). Después de la pirosecuenciación, el nivel de metilación del gen del biomarcador SDC2 se midió calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa promedio de unión de citosina a cada isla CpG.

Como resultado, como se puede ver en la figura 4, el nivel de metilación del gen del biomarcador SDC2 fue 10% o inferior en todos los tejidos de cáncer de pulmón, tejido de cáncer de mama, tejido de cáncer de hígado, tejido de cáncer de cuello uterino y tejido de cáncer de próstata. Esto sugiere que el gen del biomarcador SDC2 está metilado específicamente en el tejido del cáncer gástrico. Dichos resultados indican que el gen del biomarcador SDC2 puede usarse como un biomarcador no solo para el diagnóstico específico del cáncer gástrico, sino también para el diagnóstico del cáncer de intestino.

Ejemplo 5: Medición de la metilación del gen del biomarcador SDC2 en sueros de pacientes con pólipos gástricos

Para confirmar la utilidad del gen biomarcador SDC2 para el diagnóstico de pólipo gástrico en suero, la metilación del gen del biomarcador SDC2 en el suero de pacientes con pólipos gástricos se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real específica de metilación (qMSP) método. Se realizó qMSP de la misma manera que se describe en el Ejemplo 3.

Para evaluar la capacidad del gen biomarcador SDC2 para diagnosticar pólipo gástrico en suero, se realizó qMSP en ADN en los sueros de 12 personas normales de quienes se determinó que eran normales por gastroscopía, 5 pacientes con pólipos hiperplásicos y 16 pacientes con pólipos adenomatosos. El nivel de metilación se expresó como el umbral del ciclo (Ct) del gen SDC2, y cuando el valor de Ct no se formó porque la metilación no estaba metilada, el valor de Ct se expresó como 40.

Como resultado, como se puede ver en la figura 5A, los sueros de las 12 personas normales no mostraron metilación del gen SDC2, y los sueros de los pacientes con pólipos gástricos mostraron metilación del gen SDC2 a un alto nivel y frecuencia.

Para medir la sensibilidad y la especificidad del gen del biomarcador SDC2 para el diagnóstico de pólipos gástricos, se realizó el análisis de la curva ROC (característica de funcionamiento del receptor) usando el programa MedCalc (MEDCALC, Bélgica).

Como resultado, como se puede ver en la figura 5B, el gen SDC2 mostró una sensibilidad y especificidad del 61.9% (13/21) y del 100%, respectivamente, para los pacientes con pólipos gástricos totales, lo que sugiere que tiene una capacidad excelente para diagnosticar pólipos gástricos. Además, el gen SDC2 mostró una sensibilidad del 40% (2/5) para el pólipo hiperplásico y una sensibilidad del 68.8% (11/16) para el pólipo adenomatoso. Por lo tanto, se encontró que el gen SDC2 es muy útil para el diagnóstico en sangre de pólipos gástricos.

Aplicabilidad industrial

Como se describió anteriormente, la presente invención tiene un efecto en cuanto que la metilación de la isla CpG del gen marcador gástrico específico de cáncer de pólipo gástrico puede detectarse para proporcionar de este modo información para diagnosticar cáncer gástrico.

El uso de la isla CpG metilada del gen sindecan-2 (SDC2), localizado en una región establecida en SEQ ID NO: 1, de acuerdo con la presente invención o el método de detección de metilación o la composición de diagnóstico, el kit o chip de ácidos nucleicos revelado, hace posible diagnosticar el cáncer gástrico en una etapa de transformación temprana, lo que permite el diagnóstico precoz del cáncer gástrico. Además, el método divulgado permite diagnosticar eficazmente el cáncer gástrico de una manera precisa y rápida en comparación con los métodos convencionales.

<110> GENOMICTREE, INC.

<120> Método para detectar pólipos gástricos y cáncer gástrico utilizando un gen marcador de pólipos gástricos y metilación específica del cáncer gástrico

65

ES 2 681 035 T3

<130> PP-B1257

<150> KR10-2012-0125539

<151> 2012-11-07

5

<160> 23

<170> KopatentIn 2.0

10

<210> 1

<211> 2000

<212> ADN

<213> Promotor, región 5' no traducida y primer intrón del gen SDC2

15

<400> 1

ttgggggtgc ggaaggattt gggagaatgg gaaacactct cactatatat ttattacatt	60
aattatcttc tcttttaaaa tgcaattttc atgaactggc gatttatgaa cacttcacat	120
tgcttgaaag catcttacac tttttttttc cctcaactca caaagcagtt tctttctact	180
ggtcgaattc tcaaggcaga aaagctacat acgtctctcg tttcttcact aattgttctc	240
tagaaaaggg aaagtgaaga agggaaagag aaaagacaac ggggaagaaa agagcataga	300
ggagagagga aaagtgggga gagaaaggaa gaaaaggact gagaaaacgc aggagccctg	360
gcttgccggg gagcagagcc ggcgcagcca cagcgcggag ccgcgggcgc cactggctct	420
cggagctgcc aatcggcgtg taatcctgta ggaatttctc ccgggtttat ctgggagtca	480
cactgccgcc tcctctcccc agtcgcccag gggagcccgg agaagcaggc tcaggagggg	540
gggagccaga ggaaaagaag aggaggagaa ggaggaggac ccggggaggg aggcgcggcg	600
cgggaggagg aggggcgcag ccgcggagcc agtggccccg cttggacgcg ctgctctcca	660
gatacccccg gagctccagc cgcgcggatc gcgcgctccc gccgctctgc ccctaaactt	720
ctgccgtagc tccctttcaa gccagcgaat ttattcctta aaaccagaaa ctgaacctcg	780
gcacgggaaa ggagtccgcg gaggagcaaa accacagcag agcaagaaga gcttcagaga	840
gcagccttcc cggagcacca actccgtgtc gggagtgcag aaaccaaaa gtgagagggc	900
gccgcgttcc cggggcgcag ctgcgggcgg cgggagcagg cgcaggagga ggaagcgagc	960
gcccccgagc cccgagcccg agtccccgag cctgagccgc aatcgctgcg gtactctgct	1020
ccggattcgt gtgcgcgggc tgcgccgagc gctgggcagg aggcttcggt ttgccctggt	1080
tgcaagcagc ggctgggagc agccggtccc tggggaatat gcggcgcgcg tggatcctgc	1140
tcaccttggg cttggtggcc tgcgtgtcgg cggagtcggt gagtgggcca ggcggaggat	1200
gcgcgcgccg tttaggggtg ttgaagctac gagaggagcc cgcagggaat aggggagcgc	1260
cacctgggga acccccagtc cccaagtata caccggagat ccgctgggac aaatgcgctc	1320

ES 2 681 035 T3

	gtccgggtcac cctttccccc tcttcccttc ctcagaaaag cgctgctcgc tggcgttacc	1380
	ccgcgggtccg cgggaatggg ggcaccgaga attgcggttt ggtctagccg cagaggcccc	1440
	tgaagtcact cccaacttct tcgccctcgg cgggtcttgc tgcgtggtct gggaaggacg	1500
	gaggggaaag ggtggcagga gggggagacc tgggtcgggc ccgcgaggga acggctccac	1560
	tccgcgcgct cctcgagacc agggatgacc tggaaacttc ggggtccctt cctccgcaca	1620
	ccatcccccc cgcgccagct ttcctgtttg actgcatgca agttctgggg agatgggggc	1680
	cagatttaag agaccgcga gtgtccagag agaaaagttt gcaaaagttc ttttgttga	1740
	tgctccctgc ggctagggcg aggtaaccga cactacgtgg aatcgagta ggcgatccct	1800
	caaggggata ctgggggagg cacggaacgc gtccgaaaat gctgggacgc cggccactgg	1860
	attcccagtc ctgcccgcac cccctcctcg ttgaggggtg gaggttgac cgcggggcgt	1920
	cagggacggg aggacathtt catagagtt acacgggagt gccgcaagca gggcgaggcg	1980
	gggtacgtgt gacacggcgc	2000
	<210> 2	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador de avance del gen SDC2	
	<400> 2	
	gggagtgyg aaattaataa gtg 23	
	<210> 3	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de retroceso del gen SDC2	
	<400> 3	
	accaaaacaa aacraacct cctaccca 28	
25	<210> 4	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador de secuenciación del gen SDC2	
	<400> 4	
35	aggaggagga agygag 16	
	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador de avance del gen SDC2	

ES 2 681 035 T3

<400> 5
tagaaattaa taagtgagag ggcgt 25

5 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Cebador de retroceso del gen SDC2

<400> 6
gactcaaact cgaaaactcg aa 22

15 <210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Sonda de fluorescencia del gen SDC2

<400> 7
agtaggcgta ggaggaggaa gcga 24

25 <210> 8
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Sonda para el gen SDC2

<400> 8
35 cggagctgcc aatcgcgctg taatcctgta 30

<210> 9
<211> 50
<212> ADN
40 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> > Sonda para el gen SDC2

45 <400> 9
ctgccgtagc tcccttcaa gccagcgaat ttattccta aaaccagaaa 50

<210> 10
<211> 50
50 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> > Sonda para el gen SDC2

55 <400> 10
gcacgggaaa ggagtccgcy gaggagcaaa accacagcag agcaagaaga 50

<210> 11
60 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <223> > Sonda para el gen SDC2

ES 2 681 035 T3

<400> 11
gcagccttcc cggagcacca actccgtgtc gggagtgcag aaaccaacaa gtgagagggc 60 60

5 <210> 12
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> > Sonda para el gen SDC2

<400> 12
cccagagccc agtccccgag cctgagccgc aatcgctgcg gtactctgct 50

15 <210> 13
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> > Sonda para el gen SDC2

<400> 13
cttggtggcc tgcgtgtcgg cggagtgcgt gagtgggcca 40

25 <210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> sonda

<400> 14
cggagtgtt aatcggcgtg taatttgta 30

35 <210> 15
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> sonda

45 <400> 15
ttgtcgtagt ttttttaa gtagcgaat ttatttta aaattagaaa 50

<210> 16
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> sonda

55 <400> 16
gtacgggaaa ggagtgcgc gaggagtaaa attatagtag agtaagaaga 50

60 <210> 17
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> sonda

ES 2 681 035 T3

<400> 17
gtagttttt cggagtatta atttcgtgtc gggagtgtag aaattaataa gtgagagggt 60 60

5 <210> 18
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> sonda

<400> 18
ttcgagttcg agttttcgag tttgagtcgt aatcgttgcg gtattttgtt 50

15 <210> 19
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> sonda

<400> 19
tttggtggtt tgcgtgctcg cggagtcggt gagtgggta 40

25 <210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador de avance del gen ACTB

<400> 20
tggatgatga ggaggttag taagt 25

35 <210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Cebador de retroceso del gen ACTB

45 <400> 21
aaccaataaa acctactcct ccctaa 27

<210> 22
<211> 30
50 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda de fluorescencia del gen ACTB

55 <400> 22
accaccacc aacacacaat aacaacaca 30

<210> 23
60 <211> 2000
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
65 <223> Promotor tratado con bisulfito, región 5' no traducida y 1^{er} intrón del gen SDC2

ES 2 681 035 T3

<400> 23

ttgggggtgc ggaaggattt gggagaatgg gaaatatttt tattatata ttattatatt	60
aattattttt ttttttaaaa tgtaattttt atgaattggc gatttatgaa tattttatat	120
tgtttgaaag tattttatat tttttttttt ttttaattta taaagtagtt tttttttatt	180
ggtcgaattt ttaaggtaga aaagttatat acgtttttcg tttttttatt aattgttttt	240
tagaaaaggg aaagtgaaga agggaaagag aaaagataac ggggaagaaa agagtataga	300
ggagagagga aaagtgggga gagaaaggaa gaaaaggatt gagaaaacgt aggagttttg	360
gtttgtcggg gagtagagtc ggcgtagtta tagcgcggag tcgcggcggt tattggtttt	420
cggagtgttt aatcggcgtg taattttgta ggaatttttt tcgggtttat ttgggagtta	480
tattgtcgtt tttttttttt agtcgttttag gggagtccgg agaagtaggt ttaggagggg	540
gggagttaga ggaaaagaag aggaggagaa ggaggaggat tcggggaggg aggcgcggcg	600
cgggagggagg aggggcgtag tcgcggagtt agtggtttcg tttggacgcg ttgtttttta	660
gatattttcg gagttttagt cgcgcggatc gcgcgttttc gtcgttttgt ttttaaattt	720
ttgtcgtagt ttttttttaa gttagcgaat ttatttttta aaattagaaa ttgaatttcg	780
gtacgggaaa ggagtccgag gaggagtaaa attatagtag agtaagaaga gttttagaga	840
gtagtttttt cggagtatta atttcgtgtc gggagtgtag aaattaataa gtgagagggc	900
gtcgcgtttt cggggcgtag ttgcgggcgg cgggagttag cgtaggagga ggaagcgagc	960
gttttcgagt ttcgagttcg agttttcgag tttgagtcgt aatcgttcggt gtattttggt	1020
tcggattcgt gtgcgcgggt tgcgtcgagc gttgggtagg aggtttcgtt ttgttttggt	1080
tgtaagtagc ggttgggagt agtcggtttt tggggaatat gcggcgcgcg tggattttgt	1140
ttattttggg tttggtgggt tgcgtgtcgg cggagtcggt gagtgggtta gccggaggat	1200
gcgcgcgctc tttagggtgt ttgaagttac gagaggagt ctaggggaat aggggagcgt	1260
tatttgggga atttttagtt ttttaagtata tatcggagat tcgttgggat aaatgcgttc	1320
gttcggttat tttttttttt tttttttttt tttagaaaag cgttggtcgt tggcgttatt	1380
tcgcggttcg cgggaatggg ggtatcgaga attgcggttt ggtttagtcg tagaggtttt	1440
tgaagttatt ttttaattttt tcgttttcgg cgggttttgt tgcgtggttt ggggaaggacg	1500
gaggggaaaag ggtggttaga ggggggagtt tgggtcgggt tcgcgagggg acggttttat	1560
ttcgcgcggt tttcgagatt agggatgatt tggaaatttc ggggtttttt ttttcgtata	1620
ttattttttt cgcgttagtt tttttgtttg attgtatgta agttttgggg agatgggggt	1680
tagatttaag agattcgcga gtgttttagag agaaaagttt gtaaaaagttt ttttgtttga	1740
tgttttttgc ggttagggcg aggtaacga tattacgtgg aatcgtagta gccgattttt	1800
taaggggata ttgggggagg tacggaacgc gttcgaaaat gttgggacgt cggttattgg	1860
attttagtt ttgcggcgat ttttttttcg ttgaggggtg gaggttgat cgcggggcgt	1920

ES 2 681 035 T3

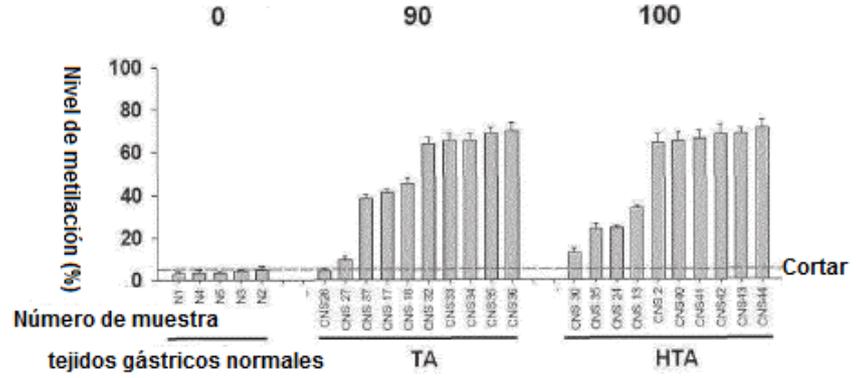
tagggacggg aggatatttt tataggagtt atacgggagt gtcgtaagta gggcgaggcg	1980
gggtacgtgt gatacggcgt	2000

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una isla CpG metilada del gen sindecan-2 (SDC2) localizada en una región establecida en la SEQ ID NO: 1 para diagnosticar cáncer gástrico o pólipo gástrico.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde la isla CpG está situada en una cualquiera de las regiones promotoras, regiones 5' no traducidas, el exón y el intrón del gen SDC2.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1, en donde la isla CpG metilada se detecta por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un par de cebadores capaces de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG metilada, una sonda capaz de hibridarse con la isla CpG metilada, un cebador de secuenciación, un cebador de secuenciación por síntesis y un cebador de secuenciación por ligación.
- 15 4. El uso de la reivindicación 3, en donde la isla CpG metilada se detecta mediante un par de cebadores capaz de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG metilada.
- 20 5. El uso de la reivindicación 4, en donde la isla CpG metilada se detecta después de modificar el fragmento que comprende la isla CpG con el tratamiento mediante un reactivo que modifica de forma diferente un ADN metilado y un ADN no metilado.
- 25 6. El uso de la reivindicación 4, en donde el par de cebadores se establece en SEQ ID NO: 2 y 3 o se establece en SEQ ID NO: 5 y 6.
7. El uso de la reivindicación 4, que comprende además un iniciador de secuenciación que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 4.
8. El uso de la reivindicación 3, en donde la isla CpG metilada se detecta mediante una sonda capaz de hibridarse con la isla CpG metilada.
- 30 9. El uso de la reivindicación 8, en donde la sonda se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de bases establecidas en las SEQ ID NO: 8 a 19.

FIG. 1

Frecuencia de metilación positiva (%)



- TALGD (Adenoma tubular con displasia de bajo grado)
- TAHGD (Adenoma tubular con displasia de alto grado)

FIG. 2

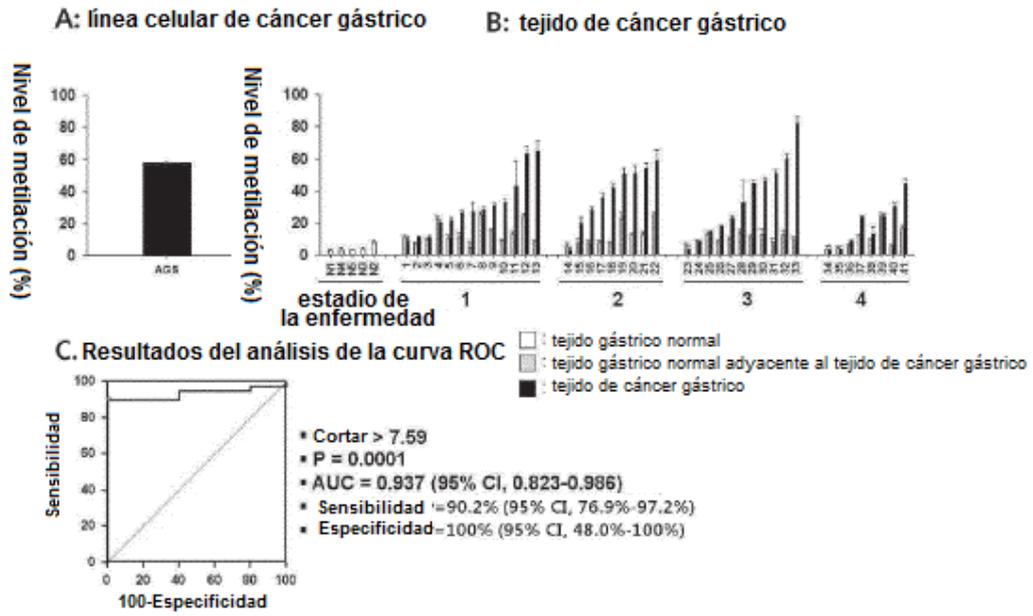
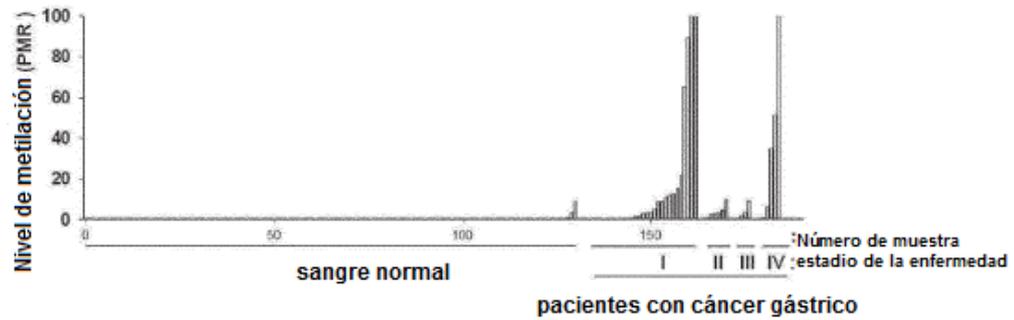


FIG. 3

A. resultados de la medición de los niveles de metilación en el ADN sérico



B. Resultados del análisis de la curva ROC

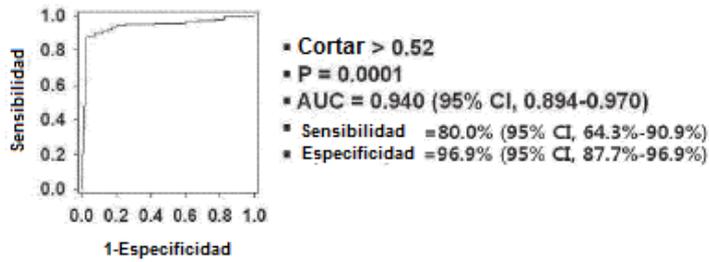


FIG. 4

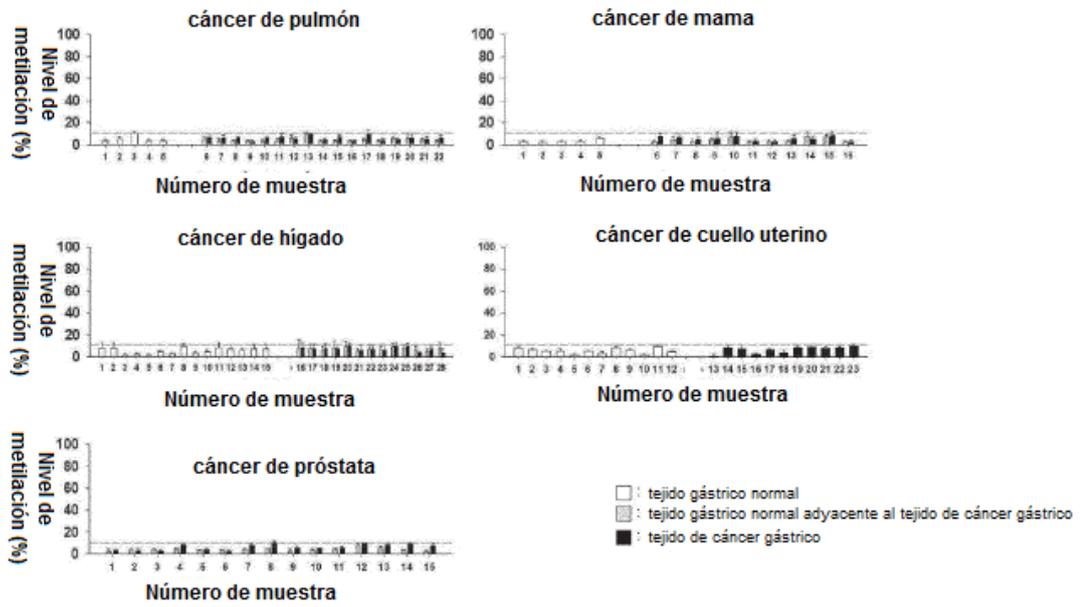


FIG. 5

