

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 542**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2011 PCT/KR2011/009710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12081928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11849157 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2653547**

54 Título: **Procedimiento para la detección de la metilación de un gen marcador de metilación específico del cáncer colorrectal para el diagnóstico del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

**16.12.2010 KR 20100129208**

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

**13.09.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 681 542 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

Procedimiento para la detección de la metilación de un gen marcador de metilación específico del cáncer colorrectal para el diagnóstico del cáncer colorrectal

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de la metilación de genes marcadores específicos del cáncer colorrectal para el diagnóstico del cáncer colorrectal, y más particularmente a un procedimiento de detección de la metilación de un gen marcador específico del cáncer colorrectal, que está metilado específicamente en las células de cáncer colorrectal, para proporcionar la información para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

**Técnica antecedente**

10 en la práctica clínica actual, el diagnóstico del cáncer se confirma llevando a cabo una biopsia tisular después de la adquisición de la historia, el examen físico y la evaluación clínica, seguido por el ensayo radiográfico y la endoscopia si se sospecha de cáncer. Sin embargo, el diagnóstico del cáncer mediante las prácticas clínicas existentes es posible solo cuando el número de células cancerosas es más de mil millones y el diámetro del cáncer es mayor de 1  
15 cm. En este caso, las células cancerosas ya tienen capacidad metastática, y al menos la mitad de las mismas ya han metastatizado. Entre tanto, se utilizan marcadores tumorales para controlar sustancias que se producen directa o indirectamente en los cánceres para la exploración del cáncer, pero estos producen confusión debido a las limitaciones de su precisión, ya que hasta aproximadamente la mitad de los mismos parecen normales incluso en presencia de cáncer, y a menudo parecen positivos incluso en ausencia de cáncer. Además, los agentes anticancerosos que se utilizan principalmente en la terapia del cáncer tienen el problema de que tienen efecto solo cuando el volumen del cáncer es pequeño.

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

30 Además, se ha intentado otro procedimiento, en el cual se detecta por RT-PCR y transferencia la presencia de genes expresados por las células cancerosas, diagnosticando de esta manera las células cancerosas presentes en las células sanguíneas. Sin embargo, este procedimiento tiene el inconveniente de que se puede aplicar solo a algunos cánceres, que incluyen el cáncer de próstata y melanoma, tiene una alta tasa de falsos positivos. Además, es difícil convencionalizar la detección y lectura de este procedimiento, y su utilidad también está limitada (Kopreski, M.S. y col., Clin. Cancer Res., 5:1961, 1999; Miyashiro, I. y col., Clin. Chem., 47:505, 2001).

35 Recientemente, se ha intentado un ensayo genético que utiliza un ADN en el suero o plasma sanguíneo. Este es un procedimiento de detección de 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 ADN libre en el suero. Se ha descubierto que la concentración de ADN en el suero aumenta por un factor de 5-10 veces en los pacientes actuales de cáncer en comparación con el de las personas normales, y dicho aumento de ADN se libera principalmente de las células cancerosas. El análisis de anomalías genéticas específicas del cáncer, tales como la mutación, eliminación y pérdida funcional de  
40 oncogenes y genes supresores tumorales, utilizando dicha ADN aislados de las células cancerosas, permitiendo el diagnóstico del cáncer. En este esfuerzo, se han hecho intentos activos para diagnosticar el cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer colorrectal, y cáncer hepático examinando el promotor de metilación de los oncogenes K-Ras mutados, los genes supresores tumorales p53 y los genes p16 en el suero, y el marcado e inestabilidad de microsatélites (Chen, X.Q. y col., Clin. Cancer Res., 5:2297, 1999; Esteller, M. y col., Cancer Res., 59:67, 1999; Sanchez-Cespedes, M. y col., Cancer Res., 60:892, 2000; Sozzi, G. y col., Clin. Cancer Res., 5:2689, 1999).

45 Entre tanto, en las muestras distintas de sangre, también se puede detectar el ADN de células cancerosas. Se ha intentado un procedimiento en el que la presencia de células cancerosas u oncogenes en el esputo o lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón se detecta mediante un ensayo genético o de anticuerpos (Palmisano, W.A. y col., Cancer Res., 60:5954, 2000; Sueoka, E. y col., Cancer Res., 59:1404, 1999). Adicionalmente, se han intentado otros procedimientos de detección de la presencia de oncogenes en heces de  
50 pacientes con cáncer colorrectal (Ahlquist, D.A. y col., Gastroenterol., 119:1219-27, 2000) y la detección de anomalías de metilación del promotor en fluido prostático y orina (Goessl, C. y col., Cancer Res., 60:5941, 2000). Sin embargo, con el fin de diagnosticar de manera precisa cánceres que causan un gran número de anomalías genéticas y que presentan distintas mutaciones características de cada uno de los cánceres, se necesita un procedimiento en el que se analice simultáneamente un gran número de genes de una manera precisa y  
55 automática. Sin embargo, dicho procedimiento no se ha establecido aún.

En consecuencia, se han propuesto recientemente procedimientos de diagnóstico del cáncer midiendo la metilación de ADN. Cuando la isla CpG de promotor de un cierto gen está hiper-metilada, la expresión de dicho gen está silenciada. Esto se interpreta como un mecanismo principal por el que la función de este gen se pierde incluso cuando no hay mutación en la secuencia codificante de proteínas del gen en un cuerpo vivo. Además, esto se analiza como un factor por el cual la función de varios genes supresores de tumor en cánceres humanos se ha perdido. Por lo tanto, el análisis de la metilación de la isla CpG del promotor de genes supresores es muy útil en la investigación del cáncer. Se ha hecho un intento activo para analizar la metilación de la isla CpG del promotor por procedimientos tales como PCR específica de metilación (a la que se hace referencia de aquí en adelante como "MSP") o secuenciación de base automática y para utilizar los resultados del análisis para el diagnóstico y exploración del cáncer.

Un número significativo de enfermedades están producidas por anomalías genéticas, y la forma más frecuente de anomalía genética es un cambio en la secuencia codificante de un gen. Se hace referencia al cambio genético como mutación. Cuando cualquier gen tiene una mutación, la estructura y función de una proteína codificada por el cambio genético, da como resultado anomalías y eliminaciones, y esta proteína mutante produce la enfermedad. Sin embargo, una anomalía en la expresión de un gen específico puede producir una enfermedad incluso en ausencia de mutación en el gen. Un ejemplo típico de la misma es la metilación en la que se unen un grupo metilo a la región reguladora de la transcripción de un gen, es decir, la base citosina de las islas CpG del promotor, y en este caso, la expresión del gen se silencia. Esto se conoce como un cambio epigenético. Esto se transmite a la descendencia y da como resultado la pérdida de la expresión de la proteína relevante de la misma manera que una mutación. Más normalmente, la expresión de genes supresores tumorales se silencia por la metilación de las islas CpG del promotor en las células cancerosas, dando como resultado la carcinogénesis (Robertson, K.D. y col., *Carcinogenesis*, 21:461, 2000).

Durante el proceso que causa un cáncer, se encuentra metilación en las islas CpG del promotor, y se produce la restricción en la expresión genética correspondiente. Particularmente, si la metilación se produce en las islas CpG del promotor de genes supresores tumorales que regulan el ciclo celular o apoptosis, la restauración del ADN, están implicados en la adhesión de células y la interacción entre las células, y/o suprimen la invasión celular y metástasis, dicha metilación bloquea la expresión y función de dichos genes de la misma manera que las mutaciones de una secuencia codificante, promoviendo de esta manera el desarrollo y progresión del cáncer. Además, también se produce una metilación parcial en las islas CpG según se envejece.

Un hecho interesante es que, en el caso cuyas mutaciones se atribuyen al desarrollo del cáncer en un cáncer congénito, pero no se produce en un cáncer adquirido, la metilación del promotor de las islas CpG se produce en vez de la mutación. Ejemplos típicos incluyen la metilación del promotor de genes, tales como el cáncer renal adquirido VHL (von Hippel Lindau), cáncer de mama BRCA1, cáncer colorrectal MLH1, y cáncer de estómago E-CADA. Además, en aproximadamente la mitad de todos los cánceres, se produce la metilación del promotor de P16 o la mutación de Rb, y los cánceres restantes muestran la mutación de p53 o la metilación del promotor de p73, p14 y similares.

Un hecho importante es que un cambio epigenético producido por la metilación del promotor produce un cambio genético (es decir, la mutación de una secuencia codificante), y el desarrollo de cáncer progresa por la combinación de dichos cambios genéticos y epigenéticos. En un gen MLH1 como ejemplo, existe la circunstancia en la que se pierde la función de un alelo del gen MLH1 en células de cáncer colorrectal debido a su mutación o eliminación, y el alelo restante no funciona debido a la metilación del promotor. Además, si se pierde la función de MLH1, el cual es un gen de restauración de ADN, debido a metilación del promotor, se facilita la existencia de una mutación en otros genes importantes para promover el desarrollo del cáncer.

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

Cuando las islas CpG del promotor están metiladas, la razón de por qué la expresión de los genes correspondientes se bloquea no está establecida claramente, pero se cree que es debido a una proteína de unión a metil CpG (MECP) o un dominio proteico de unión a metil CpG (MBD), y una histona desacetilasa, se une a la citosina metilada, produciendo de esta manera un cambio en la estructura de la cromatina de los cromosomas y un cambio en la histona proteica.

No está establecido si la metilación de las islas CpG del promotor causa directamente el desarrollo de cáncer o es un cambio secundario después del desarrollo del cáncer. Sin embargo, está claro que la metilación del promotor de genes relacionados con el tumor es un índice importante de cáncer, y por lo tanto se puede utilizar en muchas aplicaciones, incluyendo el diagnóstico y la detección precoz del cáncer, la predicción del riesgo de desarrollar un cáncer, el pronóstico del cáncer, el examen de seguimiento después del tratamiento, y la predicción de una respuesta a la terapia anticáncer. Recientemente, se ha llevado a cabo activamente un intento para examinar la metilación del promotor de genes relacionados con el tumor en sangre, esputo, saliva, heces u orina y para utilizar

los resultados examinados para el diagnóstico y tratamiento de distintos cánceres (Esteller, M. y col., Cancer Res., 59:67, 1999; Sanchez-Cespedez, M. y col., Cancer Res., 60:892, 2000; Ahlquist, D.A. y col., Gastroenterol., 119:1219, 2000).

5 Con el fin de maximizar la precisión en el diagnóstico del cáncer utilizando la metilación del promotor, se necesita analizar el desarrollo del cáncer de acuerdo con cada estadio y discriminar un cambio según sea cáncer o envejecimiento, un examen que pueda analizar con precisión la metilación de todas las bases de citosina de las islas CpG del promotor. Actualmente, un procedimiento convencional para este examen es un procedimiento de secuenciación del genoma con bisulfito, en el que se trata una muestra de ADN con bisulfito sódico, y todas las regiones de las islas CpG de un gen diana que se va a examinar se amplifica por PCR, y entonces, se analiza la  
10 secuencia de bases de las regiones amplificadas. Sin embargo, este examen tiene el problema de que hay imitaciones respecto al número de genes o muestras que se pueden examinar en un momento dado. Otros problemas son que es difícil la automatización, y se necesita mucho tiempo y es caro.

Se han llevado a cabo activamente estudios sobre la metilación del promotor de genes relacionados con el cáncer en la Johns Hopkins School of Medicine, the MD Anderson Cancer Center, Charité-Universitätsmedizin Berlin, etc.  
15 Los datos fundamentales obtenidos de esta manera se intercambiaron mediante la Sociedad de Metilación de ADN (DMS) y se almacenaron en MethDB (<http://www.methdb.de>). Entre tanto, EpiGenX Pharmaceuticals, Inc. está desarrollando actualmente agentes terapéuticos asociados con la metilación de las islas CpG, y Epigenomics, Inc. está llevando a cabo actualmente estudios para aplicar la metilación del promotor al diagnóstico del cáncer examinando la metilación del promotor utilizando distintas técnicas, tales como chips de ADN y MALDI-TOF.

20 ANH TRAN: "In silico enhanced restriction enzyme based methylation analysis of the human glioblastoma genome using Agilent 244K CpG Island microarrays", FRONTIERS IN NEUROSCIENCE, 1 de enero de 2009 (2009-01-01), XP055109710 desvela un perfil mejorado de metilación amplio del genoma en el ADN genómico aislado de un cerebro normal, células U87MG, y una muestra tumoral de un paciente con glioblastoma y confirma las islas de CpG metiladas seleccionadas diferencialmente utilizando secuenciación de bisulfito.

25 MOON YOUNG HO Y COL: "Methylated DNA Isolation Assay-Mediated DNA Methylation Detection and Whole-Genome Methylation Profiling", AMERICAN BIOTECHNOLOGY LABORATORY, SHELTON, CT, EE. UU., vol. 27, no. 10, 1 de octubre de 2009 (2009-10-01), Páginas 23-25, XP009148079 describe un análisis de micromatriz CpG mediada por MeDIA que utiliza un dominio de unión a metilADN minimizado marcado con la histidina del MBD2b humano que proporciona una alta sensibilidad de unión al ADN metilado.

30 El documento WO 2010/123354 describe un procedimiento de diagnóstico del cáncer en un sujeto que comprende la detección en el ADN en dicho sujeto de al menos una isla CpG hipermetilada asociada con dicho cáncer, en el que se utiliza *GPM6A* como biomarcador.

El documento WO 2007/149269 describe un procedimiento para identificar el cáncer colorrectal o la predisposición a un cáncer colorrectal que comprende la detección en una muestra de ensayo que contenga células colorrectales o ácidos nucleicos de células colorrectales el silenciamiento epigenético de al menos un gen específico y la identificación de la muestra de ensayo como neoplásica o predispuesta a neoplasia o de células que son neoplásicas o predispuestas a la neoplasia.  
35

En consecuencia, los presentes inventores han hecho esfuerzos extensos para desarrollar un marcador específico de cáncer de colon que haga posible diagnosticar el cáncer y el riesgo de carcinogénesis en un estadio precoz y predecir el pronóstico del cáncer. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que el gen *GPM6A* (NM 201591, Glucoproteína M6A) está específicamente metilado en células de cáncer colorrectal y que se puede diagnosticar el cáncer colorrectal midiendo el grado de metilación utilizando este gen como biomarcador, completando de esta manera la presente invención.  
40

### **Divulgación de la invención**

45 Es un objetivo principal de la presente invención proporcionar un biomarcador de metilación específico del cáncer colorrectal, que está específicamente metilado en células de cáncer colorrectal y puede utilizarse eficazmente para el diagnóstico de cáncer colorrectal.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para detectar el cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento la identificación del grado de metilación del biomarcador.

50 Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un chip de ácido nucleico para el diagnóstico del cáncer colorrectal, que comprende una sonda capaz de hibridarse con un fragmento que comprende la isla CpG del biomarcador específico del cáncer colorrectal.

Para alcanzar los objetivos anteriores, la presente invención describe un biomarcador para diagnosticar cáncer colorrectal, que comprende la isla CpG metilada del promotor del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A) o la isla CpG metilada de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A).  
55

La presente invención proporciona un procedimiento de detección de un cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) aislar un ADN genómico a partir de una muestra clínica de un paciente; (b) aislar un ADN genómico a partir de una muestra clínica de una persona normal ; (c) detectar el nivel de metilación en la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del ADN genómico de la muestra del paciente; (d) detectar el nivel de metilación en la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del ADN genómico de la muestra de la persona normal; (e) determinar un alto grado de metilación en la muestra del paciente en comparación con la muestra de la persona normal; y (f) identificar la metilación del paciente en el promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) con un alto grado de probabilidad de tener un cáncer colorrectal.

La presente invención describe también un chip de ácido nucleico para diagnosticar el cáncer colorrectal, que comprende una sonda capaz de hibridarse con un fragmento que comprende una isla CpG del promotor del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A) o la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A)

La presente invención también describe un kit para diagnosticar el cáncer colorrectal, que contiene: un par de cebadores de PCR para la amplificación de un fragmento que comprende la isla CpG metilada de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A); y un cebador de secuenciación para la pirosecuenciación de un producto de PCR amplificado por el par de cebadores.

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

#### **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento de descubrimiento de un biomarcador de metilación para el diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de células tisulares de una persona normal y un paciente de cáncer colorrectal mediante un microensayo de CpG.

La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra un procedimiento de exploración de genes hipermetilados específicos de cáncer colorrectal a partir de los datos de la micromatriz CpG de cáncer colorrectal.

La FIG. 3 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición del grado de metilación de 3 genes candidatos a biomarcador en una línea celular de cáncer colorrectal y los tejidos de colon de personas normales por pirosecuenciación.

La FIG. 4 es un diagrama gráfico que muestra los resultados de la medición de los grados de metilación del biomarcador de metilación de *GPM6A* en tejido de cáncer colorrectal y tejido normal adyacente por pirosecuenciación, y los resultados de la medición de la sensibilidad y especificidad del biomarcador de metilación de *GPM6A* por el cáncer colorrectal mediante análisis de curva ROC.

La FIG. 5 muestra los resultados de la verificación de la metilación de un gen *GPM6A* biomarcador en los tejidos fecales de personas normales y pacientes de cáncer colorrectal mediante PCR específica de metilación.

#### **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura que se utiliza en el presente documento se conoce bien y se emplean comúnmente en la técnica.

La presente invención describe un biomarcador para el diagnóstico del cáncer colorrectal, que comprende la isla CpG metilada del promotor del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A) o la isla CpG metilada de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A).

En la presente invención, la isla CpG se puede localizar en la región del intrón del gen. En el presente documento, la región del intrón del gen *GPM6A* se puede localizar entre los nucleótidos +501 y +1200 (nt) desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección del cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) aislar un ADN genómico de una muestra clínica de un paciente; (b) aislar el ADN genómico de una muestra clínica de una persona normal; (c) detectar el nivel de metilación de la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) de un ADN genómico de la muestra del paciente; (d) detectar el nivel de metilación de la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del ADN genómico de la persona normal; (e) determinar un alto grado de metilación en la muestra del paciente en comparación con la muestra de la persona normal; (f) identificar la metilación en el promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del paciente con un alto grado como que tiene una probabilidad de cáncer colorrectal.

En la presente invención, la etapa de detección de la metilación de la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A) puede llevarse a cabo detectando la metilación de la región que se muestra mediante la SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, la etapa anterior se puede llevar a cabo detectando la metilación basada en la presencia/ausencia o un cambio en la secuencia de bases del producto amplificado utilizando cebadores capaces de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG del primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A).

5 En la presente invención, la etapa anterior se puede llevar a cabo mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR ent tiempo real específica de metilación, ensayo de PCR utilizando la proteína de unión específica de ADN, PCR cuantitativa, ensayo basado en un chip de ADN, pirosecuenciación, y secuenciación de bisulfito.

10 En la presente invención, la muestra clínica se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma sanguíneo, heces, y orina de un paciente sospechoso de tener cáncer o un sujeto que se va a diagnosticar.

15 En la presente invención, se exploraron 4 genes biomarcadores candidatos que presentaban la diferencia más grande en el grado de metilación entre personas normales y pacientes de cáncer colorrectal, y entre estos genes, los genes *SDC2*, *SIM1* y *SORCS3* se confirmaron para el diagnóstico de cáncer colorrectal. Un procedimiento para la exploración de los genes marcadores de metilación de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de: (a) aislar los ADN genómicos de las células transformadas y no transformadas; (b) hacer reaccionar los ADN genómicos aislados con una proteína de unión al ADN metilado, aislado de esta manera los ADN metilados; y (c) amplificar los ADN metilados, hibridando los ADN amplificados con una micromatriz de CpG, y entonces seleccionar genes que presentan la mayor diferencia del grado de metilación entre las células normales y las células cancerosas, asegurando de esta manera los genes marcadores de metilación.

20

El procedimiento anterior para la exploración de los genes biomarcadores puede encontrar genes que están metilados diferencialmente en el cáncer colorrectal, así como en distintos estadios displásicos del tejido que progresan a cáncer colorrectal. Los genes explorados se pueden utilizar para la exploración del cáncer colorrectal, evaluación del riesgo, pronóstico, identificación de la enfermedad, el diagnóstico de los estadios de enfermedad, y la selección de dianas terapéuticas.

25

La identificación de genes que están metilados en el cáncer colorrectal y las anomalías en distintos estadios de cáncer colorrectal hace posible diagnosticar el cáncer colorrectal en un estadio temprano de una manera precisa y eficaz y permite el perfil de metilación de múltiples genes y la identificación de nuevas dianas para la intervención terapéutica. Además, los datos de metilación de acuerdo con la presente invención se pueden combinar con otros procedimientos de detección de biomarcadores relacionados con la no metilación para obtener un sistema más preciso para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

30

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la progresión del cáncer colorrectal en varios estadios o fases se puede diagnosticar determinando el estado de metilación de uno o más ácidos nucleicos biomarcadores obtenidos de una muestra. Comparando el estadio de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra de cada uno de los estadios de cáncer colorrectal con el estadio de metilación de uno o más ácidos nucleicos aislados de una muestra en la cual no hay un trastorno proliferativo del tejido del colon, se puede detectar un estadio específico del cáncer colorrectal en la muestra. En el presente documento, el estadio de metilación puede ser una hipermetilación.

35

En una realización de la presente invención, el ácido nucleico puede estar metilado en la región reguladora de un gen. En otras realizaciones, se puede diagnosticar un gen que está implicado en la transformación celular detectando la metilación fuera de la región reguladora del gen, debido a que la metilación se produce hacia dentro desde la parte exterior del gen.

40

En otra realización más de la presente invención, las células que probablemente forman parte del cáncer colorrectal pueden diagnosticarse en un estadio temprano utilizando los genes marcadores de metilación. Cuando se confirma que los genes están metilados en las células cancerosas están metilados en células que parecen normales clínicamente o morfológicamente, esto indica que la normalidad aparece en células que progresan a cancerosas. Por lo tanto, el cáncer colorrectal se puede diagnosticar en un estadio temprano detectando la metilación de genes específicos de cáncer colorrectal en células que parecen normales. El uso del gen marcador de metilación de la presente invención permite la detección de un trastorno proliferativo celular (displasia) del tejido del colon en una muestra. El procedimiento 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 procedimiento comprende la detección de la metilación de al menos una región en al menos un ácido nucleico, en el que la metilación del ácido nucleico se diferencia del estado de metilación de la misma región de un ácido nucleico presente en una muestra en la que no hay un crecimiento anormal (progresión displásica) de las células del colon.

45

50

55

En otras realizaciones más de la presente invención, la probabilidad de progresión del tejido a cáncer colorrectal se puede evaluar examinando la frecuencia de la metilación de un gen que está específicamente metilado en el cáncer colorrectal, y determinando la frecuencia de metilación de tejido del tejido que probablemente va a progresar a

cáncer colorrectal.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección del cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) aislar un ADN genómico de una muestra clínica de un paciente; (b) aislar un ADN genómico de una muestra clínica de una persona normal; (c) detectar el nivel de metilación en la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del ADN genómico de la muestra del paciente; (d) detectar el nivel de metilación de la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) del ADN genómico de la muestra de la persona normal; (e) determinar un grado de metilación mayor en la muestra del paciente en comparación con la muestra de la persona normal; y (f) identificar la metilación del paciente en el promotor o el primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) con un grado mayor como que tiene una probabilidad de cáncer colorrectal.

En la presente invención, la etapa de detección del nivel de metilación se puede llevar a cabo detectando la metilación de la isla CpG en la región del intrón del gen. En el presente documento, la región del intrón del gen *GPM6A* puede localizarse entre los nucleótidos (nt) +501 y +1200 desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, dicha etapa se puede llevar a cabo por un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR en tiempo real específica de metilación, ensayo de PCR utilizando proteína de unión específica de metilación de ADN, PCR cuantitativa, ensayo de chip basado en ADN, pirosecuenciación, y secuenciación de bisulfito. Además, la muestra clínica se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en un tejido, una célula, sangre, plasma sanguíneo, heces, y orina de un paciente sospechoso de tener un cáncer o un sujeto que se va a diagnosticar, pero no se limita a estos.

En una realización de la presente invención, el procedimiento para la detección de la metilación de un gen puede comprender: (a) preparar una muestra clínica que contiene ADN; (b) aislar el ADN de la muestra clínica; (c) amplificar el ADN aislado utilizando cebadores capaces de amplificar un fragmento que comprende la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A); y (d) determinar si el intrón estaba metilado basándose en si se amplificó el ADN en la etapa (c).

Se describe adicionalmente un chip de ácido nucleico para diagnosticar el cáncer colorrectal, que comprende una sonda capaz de hibridarse con un fragmento que comprende la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A).

En la presente invención, la isla CpG se puede localizar en la región del intrón del gen. En el presente documento, la región del intrón del gen *GPM6A* se puede localizar entre los nucleótidos (nt) +501 y +1200 desde el sitio de inicio de la transcripción y puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

Se describe adicionalmente un kit para el diagnóstico del cáncer colorrectal, que contiene, un par de cebadores de PCR para la amplificación de un fragmento que comprende la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A); y un cebador de secuenciación para la pirosecuenciación de un producto de PCR amplificado por el par de cebadores.

En la presente invención, el par de cebadores de la PCR puede ser un par de cebadores que comprende secuencias de bases que se muestran en las SEQ ID NO: 16 y 17 o las SEQ ID NO: 18 y 19, y el cebador de secuenciación puede comprender una secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 15.

En otra realización más de la presente invención, el crecimiento anormal (displasia) de las células del tejido colorrectal en una muestra se puede diagnosticar detectando el estado de metilación de la isla CpG de un primer intrón del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A) utilizando un kit.

En la presente invención la sonda se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en las secuencias de bases que se muestran por las SEQ ID NO: 2 a 6, y los ejemplos específicos de las mismas son las siguientes.

La sonda capaz de hibridarse con la isla CpG de un primer intrón de *GPM6A*:

- 1) gtatttggga aataaagaaa (SEQ ID NO: 2)
- 2) gactaagaga cccaggatcc gaatagcgag (SEQ ID NO: 3)
- 3) gttcccacgt tttcatgttc tctttgggga gcaagttgaa (SEQ ID NO: 4)
- 4) ggcgtccaca ctggctcggg tcaactggaag gtggagtctg gcgcagtcca (SEQ ID NO: 5)
- 5) agttccagg cagggtccgc ttattcgtg cttagcggag gcagcttga atagctccag (SEQ ID NO: 6)

El uso del kit de diagnóstico o el chip de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente hace posible determinar el crecimiento anormal (progresión displásica) de las células del tejido del colon en una muestra. El procedimiento comprende la determinación del estado de metilación de al menos un ácido nucleico aislado de una muestra, en el que el estado de metilación de al menos un ácido nucleico se compara con el estado de metilación de un ácido nucleico aislado de una muestra en la que no hay crecimiento anormal (progresión displásica) de las células colorrectales.

En otra realización de la presente invención, se pueden detectar las células colorrectales cancerosas examinando la metilación del gen marcador utilizando dicho chip de ácido nucleico.

En otra realización más de la presente invención, el cáncer colorrectal se puede diagnosticar examinando la metilación del gen marcador utilizando dicho chip de ácido nucleico.

- 5 En otra realización más de la presente invención, la probabilidad de progresión a cáncer colorrectal se puede diagnosticar examinando la metilación del gen marcador en la muestra que muestra un fenotipo normal utilizando dicho kit o chip de ácido nucleico. La muestra que se utiliza en la presente invención puede ser tejido sólido o líquido, células, heces, orina, suero o plasma sanguíneo.

Los términos principales que se utilizan en el presente documento se definen de la siguiente manera.

- 10 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “transformación celular” se refiere al cambio de características de una célula de una forma a otra forma tal como de normal a anormal, no tumoral a tumoral, indiferenciada a diferenciada, célula madre a no célula madre la transformación se puede reconocer por la morfología, fenotipo, las características bioquímicas y similares de una célula.

- 15 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “detección precoz” del cáncer se refiere a descubrir la probabilidad de cáncer antes de la metástasis, y preferentemente antes de la observación de un cambio morfológico en un tejido o célula. Además, la expresión “detección precoz” de la transformación celular se refiere a la alta probabilidad de una célula para sufrir una transformación en sus estadios tempranos antes de que la célula se designe morfológicamente como que se he transformado.

Como se utiliza en el presente documento, el término “hipermetilación” se refiere a la metilación de la isla CpG.

- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término “muestra” o “muestra clínica” se refiere a su sentido más amplio, e incluye cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo tisular, dependiendo del tipo de ensayo que se va a llevar a cabo. Los procedimientos para obtener las biopsias tisulares y fluidos corporales de los mamíferos se conocen bien en la técnica. Una biopsia de tejido del colon es una fuente preferida.

- 25 Biomarcador para el cáncer colorrectal – Uso de células cancerosas para su comparación con células normales.

En la presente invención, células “normales” se refiere a las que no presentan ningún cambio morfológico ni citológico anormal. Células “tumorales” son células cancerosas. Células “no tumorales” son las células que son parte del tejido enfermo, pero no se consideran parte del tumor.

- 30 En un aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento de la relación entre el cáncer colorrectal y la hipermetilación del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A).

- En otra realización de la presente invención, se puede diagnosticar un trastorno proliferativo celular de células de tejido colorrectal en un estadio temprano determinado el estadio de metilación de al menos un ácido nucleico en un sujeto utilizando el kit o chip de ácido nucleico que se ha descrito anteriormente. En el presente documento, el estadio 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 de tejido del colon. El ácido nucleico es preferentemente un ácido nucleico que contiene CpG tal como una isla CpG.
- 35

- En otra realización de la presente invención, se puede diagnosticar un trastorno celular proliferativo de tejido del colon determinando la metilación de al menos un ácido nucleico utilizando el kit o el chip de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. En el presente documento, el ácido nucleico puede ser una isla CpG del gen *GPM6A* (NM 201591, glicoproteína M6A). En esta realización, la metilación de el 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 de tejido del colon.
- 40

- Como se utiliza 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 un aumento de probabilidad de tener un trastorno proliferativo celular.
- 45

- Se describe adicionalmente un procedimiento para del diagnóstico de un trastorno proliferativo celular de tejido de colon, comprendiendo el procedimiento 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 la al menos una región en al menos un ácido nucleico. En el presente documento, la metilación de la al menos una región en al menos un ácido nucleico se diferencia del estadio de metilación de la misma región en un ácido nucleico presente en un sujeto en el que no hay crecimiento normal de las células.
- 50

El procedimiento anterior comprende una etapa de determinación de la metilación de al menos una región de al menos un ácido nucleico aislado de un sujeto.

La expresión “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” como se utiliza en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, o fragmentos de los mismos, o un ADN o ARN de cadena sencilla o doble de origen genómico o sintético, un ADN o ARN de cadena antisentido de origen genómico o sintético, un ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material tipo ADN o tipo 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 se sustituyen por los ribonucleótidos A, G, C y U, respectivamente.

Se puede utilizar cualquier ácido nucleico en la presente invención, a condición de que se pueda detectar la presencia de islas CpG metiladas diferencialmente en este. La isla CpG es una región rica en CpG en una secuencia de ácido nucleico.

## **Metilación**

En la presente invención, cualquier muestra de ácido nucleico, en forma purificada o no purificada, se puede utilizar, a condición de que contenga o se sospeche que contenga una secuencia de ácido nucleico que contenga un locus diana (por ejemplo, un ácido nucleico que contiene CpG). Una región de ácido nucleico capaz de metilarse diferencialmente es una isla CpG, una secuencia de ácido nucleico con un aumento de densidad con respecto a otras regiones de ácido nucleico del dinucleótido CpG. El doblete CpG se produce en el ADN de vertebrados solo aproximadamente en el 20 % de la frecuencia que se esperaría para la proporción de pares de bases G\*C. En ciertas regiones, la densidad de dobletes CpG alcanza el valor previsto; está aumentado diez veces con respecto al resto del genoma. Las islas CpG tienen un contenido medio de G\*C de aproximadamente un 60 %, en comparación con la media del 40 % de más de ADN. Las islas tienen forma de tramos de ADN normalmente aproximadamente de una a dos kilobases de largo. Hay aproximadamente 45.000 islas en el genoma humano.

En muchos genes, las islas CpG comienzan justo corriente abajo de un promotor y se extiende corriente abajo en la región transcrita. La metilación de una isla CpG en un promotor normalmente suprime la expresión del gen. Las islas también rodean la región 5' de la región codificante del gen, así como la región 3' de la región codificante. Por lo tanto, se pueden encontrar islas CpG en múltiples regiones de una secuencia de ácido nucleico incluyendo corriente arriba de las regiones codificantes en una región reguladora incluyendo una región promotora, en las regiones codificantes (por ejemplo, exones), corriente abajo de las regiones codificantes, por ejemplo, en regiones amplificadoras, y en intrones.

Normalmente, el ácido nucleico que contiene CpG es un ADN. Sin embargo, el procedimiento inventivo puede emplear, por ejemplo, las muestras que contienen ADN, o ADN y ARN que contienen ARNm, en el que el ADN o ARN puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, o se puede incluir un híbrido de ADN-ARN en la muestra.

También se puede utilizar una mezcla de ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico específica que se va a detectar puede ser una fracción de una molécula mayor o puede estar presente inicialmente como una molécula separada, de manera que la secuencia específica constituye el ácido nucleico completo. No es necesario que la secuencia a estudiar esté presente inicialmente en forma pura; el ácido nucleico puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como la contenida en un ADN humano completo. Los ácidos nucleicos contenidos en una muestra que se utiliza para la detección de islas CpG metiladas se pueden extraer por una variedad de técnicas tales como las que se describen en Sambrook, y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

Los ácidos nucleicos aislados de un sujeto se obtienen en una muestra biológica del sujeto. Si se desea detectar un cáncer colorrectal o estadios de la progresión de cáncer colorrectal, el ácido nucleico se puede aislar de tejido de colon por legrado o biopsia. Dichas muestras se pueden obtener por distintos procedimientos médicos conocidos por los expertos en la técnica.

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 un trastorno celular proliferativo del tejido del colon. La hipermetilación como se utiliza en el presente documento se refiere a la presencia de alelos metilados en uno o más ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de un sujeto no tienen un trastorno proliferativo de tejido del colon no contienen alelos metilados detectables cuando se examinan los mismos ácidos nucleicos.

## **Procedimiento para la detección de la metilación**

### **PCR específica de metilación**

Cuando el ADN genómico se trata con bisulfito, la citosina de la región 5'-CpG-3' se mantiene intacta, si estaba metilada, pero la citosina cambia a uracilo si no estaba metilada. En consecuencia, basándose en la secuencia de bases convertida después del tratamiento con bisulfito, se construyen los conjuntos de cebadores de PCR correspondientes a la región que tiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. En el presente documentos, los conjuntos de cebadores construidos tienen dos tipos de conjuntos de cebadores: un conjunto de cebadores que se corresponde con la secuencia de bases metiladas, y un conjunto de cebadores que se corresponde con la secuencia de bases no metiladas. Cuando el ADN genómico se convierte con bisulfito y luego se amplifica por PCR utilizando

los dos tipos de conjuntos de cebadores anteriores, el producto de la PCR se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia de bases metiladas, si el ADN genómico está metilado, pero el ADN genómico se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes al no metilado, si el ADN genómico no estaba metilado. La metilación se puede analizar cuantitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **PCR específica de metilación en tiempo real**

La PCR específica de metilación en tiempo real es un procedimiento de medición en tiempo real modificado del procedimiento de PCR específica de metilación y comprende el tratamiento de ADN genómico con bisulfito, diseñar los cebadores de PCR correspondientes a la secuencia de bases metilada, y llevando a cabo la PCR en tiempo real utilizando los cebadores. Los procedimientos de detección de la metilación de ADN genómico incluyen dos procedimientos: un procedimiento de detección utilizando una sonda TanMan complementaria de la secuencia de bases amplificada; y un procedimiento de detección utilizando Sybergreen. Por lo tanto, la PCR específica de metilación en tiempo real permite el análisis cuantitativo selectivo del ADN metilado. En el presente documento, se traza una curva de referencia utilizando una muestra de ADN metilado *in vitro*, y también se amplifica un gen que no contiene la secuencia 5'-CpG-3' en la secuencia de bases como un grupo de control negativo para la convencionalización para analizar cuantitativa el grado de metilación.

### **Pirosecuenciación**

El procedimiento de pirosecuenciación es un procedimiento de secuenciación cuantitativo en tiempo real modificado del procedimiento de secuenciación con bisulfito. De manera similar a la secuenciación con bisulfito, el ADN se convierte por tratamiento con bisulfito, y entonces, se preparan los cebadores de PCR correspondientes con una región que no contiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. Específicamente, se trata el ADN con bisulfito, se amplifica utilizando los cebadores de PCR, y entonces se someten a un análisis de secuencia de bases en tiempo real utilizando un cebador de secuenciación. El grado de metilación se expresa como índice de metilación analizando 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 chip de ADN**

Cuando una proteína que se une específicamente solo a un ADN metilado se mezcla con ADN, la proteína se une específicamente solo al ADN metilado. Por lo tanto, cada PCR que utiliza una proteína de unión específica de metilación o ensayo de chip de ADN permite el aislamiento selectivo de únicamente el ADN metilado. El ADN aislado se amplifica utilizando los cebadores de PCR correspondientes a la región promotora, y entonces se mide la metilación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

Además, la metilación del ADN también se puede medir por el procedimiento de PCR cuantitativa, y el ADN metilado aislado con una proteína de unión específica a ADN metilado con una sonda fluorescente y que se hibrida con un chip de ADN que contiene las sondas complementarias, midiendo de esta manera la metilación del ADN. En el presente documento la proteína de unión específica al ADN metilado puede ser, pero no se limita a, McrBt.

### **Detección de metilación diferencial-Endonucleasa de restricción sensible a la metilación**

La detección de la metilación diferencial se puede conseguir poniendo en contacto una muestra de ácido nucleico con una endonucleasa de restricción a la metilación que escinde solo los sitios CpG no metilados.

En una reacción por separado, la muestra se pone en contacto adicionalmente con un isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a la metilación que escinde los sitios de CpG tanto metilados como no metilados, escindiendo de esta manera el ácido nucleico metilado.

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

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enzima de restricción sensible a la metilación" se refiere a una restricción (por ejemplo, *SmaI*) que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento y tiene actividad cuando la C está metilada en comparación con cuando la C no está metilada. Ejemplos no limitantes de las enzimas de restricción sensibles a la metilación incluyen *MspI*, *HpaII*, *BssHII*, *BstUI* y *NotI*. Dichas enzimas se pueden utilizar solas o en combinación. Ejemplos de otras enzimas de restricción sensibles a la metilación incluyen, pero no se limitan a *SacII* y *EagI*.

El isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a la metilación es una enzima de restricción que reconoce el

mismo sitio de restricción que la enzima de restricción sensible a la metilación, pero escinde las CG tanto metiladas como no metiladas. Un ejemplo de la misma incluye MspI.

Los cebadores de la presente invención se diseñan para ser “sustancialmente” complementarios de cada cadena del locus que se va a amplificar e incluyen los nucleótidos G o C apropiados como se ha expuesto anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus cadenas respectivas en condiciones de reacción de polimerización. Los cebadores de la presente invención se utilizan en el procedimiento de amplificación, es que una reacción enzimática de cadena (por ejemplo, PCR) en el que aumenta exponencialmente un locus diana mediante varias etapas de reacción. Normalmente, un cebador es homólogo de la cadena negativa (-) de locus (cebador antisentido), y el otro cebador es homólogo de la cadena positiva (+) (cebador en sentido). Después de que se han hibridado los cebadores al ácido nucleico desnaturalizado, la cadena del ácido nucleico se extiende mediante una enzima tal como la ADN polimerasa I (Klenow), y reactivos tales como nucleótidos, y, un locus diana se utiliza como matriz y se somete a ciclos de desnaturalización repetidos, hibridación con el cebador, y extensión, se produce la síntesis exponencial de la secuencia del locus diana. El producto de reacción resultante es un dúplex de ácido nucleico distinto con los extremos correspondientes a los extremos de los cebadores específicos empleados.

La reacción de amplificación es un PCR que se utiliza normalmente en la técnica. Sin embargo, también se pueden utilizar procedimientos alternativos tales como PCR en tiempo real o amplificación lineal utilizando una enzima isotérmica. Además, también se pueden utilizar reacciones de amplificación múltiples.

#### **Detección de procedimiento de secuenciación con bisulfato diferencial de metilación**

Otro procedimiento para la detección de un ácido nucleico que contienen CpG metilado comprende las etapas de: poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico con un agente que modifica la citosina no metilada; y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en una muestra utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos para CpG, en el que los oligonucleótidos cebadores distinguen entre ácido nucleico metilado y ácido nucleico no metilado y detectan el ácido nucleico metilado. La etapa de amplificación es opcional y deseable, pero no esencial. El procedimiento se basa en la reacción PCR para distinguir entre ADN metilado modificado (por ejemplo, modificado químicamente) y ADN no metilado. Dichos procedimientos se describen en la Patente de EE. UU. N.º 5.786.146 relativa a la secuenciación con bisulfito para la detección de ácido nucleico metilado.

#### **Kit**

Se describe un kit útil para la detección de un trastorno celular proliferativo en un sujeto. El kit comprende un medio portador compartimentado para la recepción de la muestra en él, uno o más recipientes que comprenden un segundo recipiente que contiene los cebadores de la PCR para la amplificación de una secuencia de bases 5'-CpG-3', y un tercer recipiente que contiene un cebador de secuenciación para pirosecuenciar un producto PCR amplificado.

Los medios portadores son adecuados para que contengan uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, cada uno de los recipientes comprenden uno de los elementos distintos que se van a utilizar en el procedimiento. En vista de la descripción proporcionada en el presente documento del procedimiento inventivo, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente el aporte de los reactivos necesarios en los recipientes.

#### **Sustratos**

Después de amplificar la región diana de ácido nucleico, el producto de amplificación de ácido nucleico se puede hibridar con una sonda genética conocida unida a un soporte sólido (sustrato) para detectar la presencia de la secuencia de ácido nucleico.

Como se utiliza en el presente documento, el término “sustrato”, cuando se utiliza 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 ahora no se conoce que comprenda una unión específica, hibridación o sitio de reconocimiento catalítico o un pluralidad de sitios de reconocimiento diferentes o varios sitios de reconocimiento diferentes que excedan el número de las 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 escindidos, grabados, litografiados, impresos, mecánicos y microtejidos; polímeros industriales, plásticos, membranas de silicio, silicatos, metales y cerámicos; y madera, papel, cartón, algodón, lana, tela, fibras tejidas y no tejidas y tejidos; y superficies anfíbias.

Se conoce en la técnica que hay varios tipos de membranas que tienen adhesión a las secuencias de ácido nucleico. Ejemplos específicos no limitantes de estas membranas incluyen la nitrocelulosa u otras membranas utilizadas para la detección de expresión genética tal como el cloruro de polivinilo, papel diazotizado y otras membranas disponibles en el mercado tales como GENESCREEN™, ZETAPROBE™ (Biorad) y NYTRAN™. También se incluyen perlas, obleas, sustratos de cristal y metálicos. Los procedimientos para unir los ácidos nucleicos a estos objetos se conocen bien en la técnica. De manera alternativa, se puede hacer una exploración en

una fase líquida.

### **Condiciones de hibridación**

5 En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones que se utilizan para conseguir un nivel particular de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se van a hibridar. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido en GC/AT), y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN/ADN) de las regiones que se hibridan de los ácidos nucleicos se pueden considerar a la hora de seleccionar las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

10 Un ejemplo de condiciones de rigurosidad progresivamente mayores es el siguiente: 2x SSC/0,1 % de SDS a temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2x SSC/0,1 % de SDS a temperatura ambiente a temperatura ambiente (condiciones de baja rigurosidad); 0,2x SSC/0,1 % de SDS a 42 °C (condiciones de rigurosidad moderada); y 0,1x SSC a aproximadamente 68 °C (condiciones de alta rigurosidad). El lavado se puede llevar a cabo utilizando solo una de estas condiciones, por ejemplo, se pueden utilizar condiciones de alta rigurosidad, o cada una de las condiciones, por ejemplo, durante 10-15 minutos cada una, en el orden enumerado anteriormente, repitiendo cualquiera o todas las etapas enumeradas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones óptimas variarán dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y se pueden determinar empíricamente. En general, se utilizan condiciones de alta rigurosidad para la hibridación de la sonda de interés.

### **Marcador**

20 La sonda de interés se puede marcar detectablemente, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico, o una enzima. El marcado apropiado con dichas sondas se conoce ampliamente en la técnica y se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento convencional.

### **Ejemplos**

25 De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a ejemplos. Será obvio para el experto habituado en la técnica que estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Descubrimiento de los genes metilados específicos del cáncer colorrectal**

30 Con el fin de explorar biomarcadores que estén metilados específicamente en el cáncer colorrectal, se sonicaron (Vibra Cell, SONICS) 500 ng de cada uno de los ADN genómicos de 2 personas normales y los ADN genómicos de tejido canceroso y tejido normal adyacente de 12 pacientes de cáncer colorrectal, construyendo de esta manera aproximadamente fragmentos de ADN genómico de aproximadamente 200-300 pb

35 Para obtener solo el ADN metilado de un ADN genómico, se utilizó un dominio de unión al metilo (dominio de unión a metilo; MBD) (Fraga y col., *Nucleic Acid Res.*, 31: 1765, 2003) conocido por unirse al ADN metilado. Específicamente, se preincubaron 2 µg de MBD2bt marcado con 6xHis con 500 ng del ADN genómico de *E. coli* JM110 (N.º 2638, Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology), y luego se unieron a perlas magnéticas Ni-NTA (Qiagen, EE. UU.). Se dejó reaccionar los 500 ng de cada uno de los ADN genómicos sonicados aislados de personas normales y de pacientes con cáncer colorrectal con las perlas en presencias de la solución de tampón de unión (10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, un 0,1 % de Triton-X100, un 5 % de glicerol, 25 mg/ml de BSA) a 4 °C durante 20 minutos.

40 Después, se lavaron las perlas tres veces con 500 µl de una solución de tampón de unión que contenía 700 mM de NaCl, y después se aisló el ADN metilado unido a MBD2BT utilizando el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen, EE. UU.).

45 Después, los ADN metilados unidos a MBD2bt se amplificaron utilizando un kit de amplificación de ADN genómico (Sigma, EE. UU., N.º de Cat. WGA2), y se marcaron 4 µg de los ADN amplificados con Cy5, utilizando un sistema I de marcado genómico total BioPrime (Invitrogen Corp., EE.UU.). Para comparar indirectamente el grado de metilación entre la persona normal y el paciente de cáncer colorrectal, se construyó un ADN de referencia. En el presente documento, el ADN de referencia se construyó mezclando los ADN genómicos de los 12 pacientes de cáncer colorrectal entre ellos en la misma cantidad, amplificando la mezcla de ADN genómicos utilizando un kit de amplificación de ADN genómico (Sigma, EE. UU., N.º de Cat. WGA2), y marcando 4 µg del ADN genómico amplificado con Cy3 utilizando un sistema O de marcado genómico total BioPrime (Invitrogen Corp., EE. UU.). El ADN de referencia se mezcló con cada uno de los ADN de las personas normales y pacientes de cáncer colorrectal, y luego se hibridaron a micromatrices CpG humanas 244K (Agilent, EE. UU.) (véase la FIG. 1). Después de la hibridación, se sometió la mezcla de ADN a una serie de procedimientos de lavados, y después de exploraron utilizando un escáner Agilent. El cálculo de los valores de señal de las imágenes de micromatriz se llevaron a cabo calculando la diferencia relativa de la fuerza de señal entre la muestra de la persona normal y la muestra del paciente de cáncer colorrectal utilizando el programa v.9.5.3.1 de extracción de imágenes (Agilent).

55

5 Con el fin de explorar las sondas que tienen señales de hibridación fiables, se exploraron 64.325 sondas que tenían un valor de señal Cy3 de más de 112,8 en al menos 21 matrices entre un total de 26 matrices mediante el modelo de error de cruce genético utilizando el programa GeneSpring 7.3 (Agilent, EE. UU.). Con el fin de explorar sondas hipermetiladas específicamente en cáncer colorrectal de las sondas anteriores, se comparaban la apariencia normal del tejido adyacente al tejido de cáncer colorrectal y la del tejido de cáncer colorrectal, y con el fin de explorar las sondas que presentan metilación diferencial, se llevó a cabo el ensayo ANOVA explorando de esta manera 3.242 sondas ( $p < 0,01$ ). De entre estas sondas, 705 sondas hipermetiladas del tejido de cáncer colorrectal se exploraron adicionalmente, y de entre estas sondas, se seleccionaron 3 candidatos a biomarcadores genéticos (*SLITRK5*, *ZNF312*, *GPM6A*) que presentaban hipermetilación en dos o más sondas adyacentes presentes con una distancia de aproximadamente 400 pb (véase la FIG. 2).

10 Los 4 candidatos a biomarcadores genéticos analizados utilizando el procedimiento del análisis anterior se enumeran en la Tabla 1 posterior. Además, la secuencia de nucleótidos correspondiente a la sonda de cada uno de los 4 genes que presentan hipermetilación en la micromatriz de CpG se analizaron utilizando MethPrimer (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html>), confirmando de esta manera las islas CpG en las sondas.

15 [Tabla 1] Lista de candidatos a biomarcadores genéticos de metilación para el diagnóstico del cáncer colorrectal

| Genes Candidatos   | Localizaciones de sondas <sup>a</sup> | N.º de GenBank | Descripción                                      |
|--|---------------------------------------|----------------|--|
| <i>SLITRK5</i>   | +1.811, +2.046                        | NM_01556 7     | Miembro 5 de la familia SLIT y familia tipo NTRK |
| <i>ZNF312</i>  | +2.558, +2.646                        | NM_01800       | Proteína en dedos de zinc                        |
|  |                                       | 8              | 312  |
| <i>GPM6A</i>   | +554, +786                            | NM_20159 1     | Glicoproteína M6A                                |
| <sup>a</sup> . pares de bases (pb) desde el sitio de inicio de la transcripción (+1) |                                       |                |  |

**Ejemplo 2: Medición de los genes biomarcadores de metilación en líneas celulares cancerosas**

Con el fin de confirmar el estado de metilación de los genes candidatos a biomarcador seleccionados en el Ejemplo 1, se llevó a cabo la pirosecuenciación para el promotor y la región de intrón de cada gen.

20 Con el fin de modificar la citosina modificada a uracilo utilizando bisulfito, se aisló el ADN genómico total de cada una de las líneas celulares de cáncer colorrectal Caco-2 (KCLB N.º 30037.1) y HCT116 (KCLB N.º 10247), y 200 ng del ADN genómico se trataron con bisulfito utilizando un kit oro de metilación EZ DNA (Zymo Research, EE. UU). Cuando el ADN se trató con bisulfito, la citosina no metilada se modificó a uracilo, y la citosina metilada se mantenía sin cambios. El ADN tratado con bisulfito se eluyó en 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a pirosecuenciación.

25 La PCR y los cebadores de secuenciación para llevar a cabo la pirosecuenciación de los 3 genes se diseñaron utilizando el programa de diseño de ensayo PSQ (Biotage, EE. UU.). La PCR y los cebadores para medir la metilación de cada gen se muestran en las tablas 2 y 3 a continuación.

[Tabla 2] Cebadores de PCR

| Genes          | Cebadores | Secuencias (5'3') <sup>a</sup> | SEQ ID NO | Localización de CpG <sup>b</sup> | Tamaño del amplicón (pb) |
|----------------|-----------|--------------------------------|-----------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>SLITRK5</i> | directo   | TGTTGATTTTTGGTGTA<br>TTGA      | 7         | +1949, +1960, +1963,<br>+1989    | 253                      |
|                | inverso   | AACACATCAACRTCCTA<br>ATTACATA  | 8         |                                  |                          |
| <i>ZNF312</i>  | directo   | TGTTTGGTGTAGGGGGA<br>AGT       | 9         | +2521,+2527,<br>+2535,+2546      | 224                      |
|                | inverso   | CCCRAAAAAATTATTTT<br>ACCTCCA   | 10        |                                  |                          |

30

(continuación)

| Genes        | Cebadores | Secuencias (5'3') <sup>a</sup> | SEQ ID NO | Localización de CpG <sup>b</sup> | Tamaño del amplicón (pb) |
|--------------|-----------|--------------------------------|-----------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>GPM6A</i> | directo   | GGGAAATAAAGAAAGAT<br>TAAGAGA   | 11        | +560, +567, +572, +598           | 121                      |
|              | inverso   | ACCCCRTTTCAACTTAC TC           | 12        |                                  |                          |

<sup>a</sup> Y = C o T; R = A o G  
<sup>b</sup> distancia (en nucleótidos) desde el sitio de inicio de la transcripción (+1): las posiciones de las regiones CpG en el ADN genómico utilizadas en la medición de la metilación

[Tabla 3]

| Secuencias de cebadores de secuenciación para genes marcadores de metilación |                                   |           |
|--|-----------------------------------|-----------|
| Genes  | Secuencias (5' → 3') <sup>a</sup> | SEQ ID NO |
| <i>SLITRK5</i>   | ATTTTAGTGGTTTAAAGATG              | 13        |
| <i>ZNF312</i>  | TGGGTGTATTGAGAGATTT               | 14        |
| <i>GPM6A</i>   | AAGATTAAGAGATTTAGGAT              | 15        |

<sup>a</sup> Y = C o T; R = A o G

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

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

15 Como se ha descrito anteriormente, los grados de metilación de los genes candidatos a biomarcadores en las líneas celulares de cáncer colorrectal se midieron utilizando el procedimiento de pirosecuenciación. Como resultado, como se puede ver en la FIG. 3A, los tres genes marcadores estaban metilados a altos niveles del 40 % en al menos una de las líneas celulares. Los 3 genes presentaban altos niveles de metilación en las líneas celulares de cáncer colorrectal, sugiriendo que estos genes son útiles como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Con el fin de verificar si estos genes se utilizan como biomarcadores, se llevó a cabo adicionalmente el siguiente ensayo utilizando una muestra de tejido.

### Ejemplo 3: Medición de la metilación de los genes candidatos a biomarcadores en el tejido del colon de personas normales

- 25 Con el fin de que los genes candidatos a biomarcadores sean útiles como biomarcadores para el diagnóstico de cáncer colorrectal, estos genes deberían presentar bajos niveles de metilación en el tejido del colon de personas normales distintas de los pacientes, pero deberían presentar altos niveles de metilación en el tejido de cáncer colorrectal.

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

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

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

Como resultado, como se puede ver en la FIG. 3B, entre los 3 genes el gen *GPM6A* presentaba la metilación más baja en el tejido normal. Por lo tanto, con el fin de verificar si el gen *GPM6A* es útil como biomarcador se llevó a cabo el siguiente ensayo utilizando el tejido de pacientes con cáncer colorrectal.

#### 15 **Ejemplo 4: Medición de metilación de los genes biomarcadores en tejido de pacientes con cáncer colorrectal**

Con el fin de verificar si el gen *GPM6A* que presentaba un bajo nivel de metilación en el tejido de colon de personas normales es útil como biomarcador para el diagnóstico de cáncer colorrectal, se aislaron ADN genómicos de tejidos de cáncer colorrectal de 96 pacientes de cáncer colorrectal (el Biochip Research Center en Yonsei University, designado por el Ministerio Coreano de Salud y Bienestar) y los tejidos de apariencia normal adyacente a los mismos.

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

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

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

Se midió el grado de metilación del gen *GPM6A*. Como resultado, como se puede ver en la FIG. 4A, el gen *GPM6A* presentaba niveles de metilación más altos en los tejidos de cáncer colorrectal de 72 pacientes (un 80,2 %) de los 96 pacientes en comparación con los tejidos de apariencia normal. La Tabla 4 posterior muestra los valores medios de los niveles de metilación del gen biomarcador *GPM6A* en los tejidos de cáncer colorrectal y los tejidos de apariencia normal adyacente a estos. Con el fin de confirmar si el nivel de metilación de los genes se diferencia significativamente estadísticamente entre el tejido de cáncer colorrectal y el tejido de apariencia normal, se llevó a cabo el ensayo de Chi cuadrado. Como resultado se puede ver que los tres genes que mostraban niveles estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ) (véase la Tabla 4).

[Tabla 4] Resultados del análisis cuantitativo de metilación del biomarcador *GPM6A*

| Nivel medio de metilación ( % medio ± desviación típica)          |                               | Valores de P <sup>a</sup> |
|---|-------------------------------|---------------------------|
| Tejidos de apariencia normal                                      | Tejidos de cáncer colorrectal |                           |
| 6,8 ± 5,7   | 30,3 ± 19,6                   | < 0,0001                  |
| <sup>a</sup> valores de p obtenidos por el ensayo de Chi-cuadrado |                               |                           |

#### 45 **Ejemplo 5: Evaluación de la capacidad del biomarcador *GPM6A* para diagnosticar el cáncer colorrectal**

Para confirmar que el gen *GPM6A* era útil como marcador de cáncer colorrectal del Ejemplo 4, se llevó a cabo un análisis de características de operativa receptora (ROC) utilizando el programa MedCalc (MEDCALC, Bélgica) con el fin de evaluar la capacidad de los genes para diagnosticar el cáncer colorrectal.

Como resultado, como se muestra en la FIG. 4B, la sensibilidad y especificidad del gen *GPM6A* para el cáncer colorrectal era, respectivamente, del 80,2 % y el 94,8 %. Esto sugiere que el gen *GPM6A* tiene una capacidad muy excelente para diagnosticar el cáncer colorrectal. La Tabla 5 muestra los resultados del análisis de la curva ROC del gen *GPM6A* para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

5

[Tabla 5]

| Resultados del análisis de la curva ROC para el diagnóstico del cáncer colorrectal del gen <i>GPM6A</i> biomarcador de metilación |                     |
|---|---------------------|
| AUC (95 % C.I.)   | 0,884 (0,830-0,926) |
| Corte <sup>a</sup>  | > 10,31             |
| Valor de p  | 0,0001              |
| Sensibilidad ( %) (95 % C.I.)   | 80,2 (70,8 - 87,6)  |
| Especificidad ( %) (95 % C.I.)  | 94,8 (88,3 - 98,3)  |
| <sup>a</sup> criterios del índice de metilación para la distinción entre muestras normales y cancerosas                           |                     |

10

Adicionalmente, se evaluó el gen *GPM6A* en cuanto a su capacidad para diagnosticar el cáncer colorrectal en una muestra fecal. Específicamente, se llevó a cabo la medición de la metilación en dos tipos de líneas celulares de cáncer colorrectal utilizando una técnica de PCR específica de metilación anidada (MSP), y se confirmó que los dos tipos de líneas celulares de cáncer colorrectal estaban metiladas como se muestra en la FIG. 5A. Este resultado es idéntico al resultado de la pirosecuenciación que se lleva a cabo en el Ejemplo 2 anterior. Los ADN genómicos se aislaron de muestras fecales de 4 personas normales y 8 pacientes de cáncer colorrectal (el Biochip Research Center en Yonsei University, designado por el Ministerio Coreano de Salud y Bienestar). Se trataron 4 µg de cada uno de los ADN genómicos aislados con bisulfito utilizando el kit gold de metilación EZ DNA (Zymo Research, EE. UU.). Cada uno de los ADN tratados se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se sometió a un ensayo MSP anidado. Las secuencias de cebador que se utilizaron en el ensayo MSP anidado se muestran en la Tabla 6 a continuación.

15

[Tabla 6] Secuencias de cebador utilizado en el ensayo MSP del gen *GPM6A*

| Metilación    | Cebadores                     | Secuencias de cebador (5' → 3')   | Tamaño del producto amplificado (pb) | SEQ ID NO |
|---------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| Metilación    | F externo                     | TTAAAAGGGCGTTTATATTGGTTC<br>G     | 233                                  | 16        |
|               | R externo                     | CCTCGCTCTTCGAAATAACTCGTA          |                                      | 17        |
|               | F interno                     | TAGGGTTCGTTTATTCGGTGTTTA<br>GC    | 156                                  | 18        |
| R interno     | CCTCGCTCTTCGAAATAACTCGTA      | 19                                |                                      |           |
| No metilación | F externo                     | TAAAAGGGTGTTTATATTGGTTTG<br>G     | 233                                  | 20        |
|               | R externo                     | CCCTCACTCTTCAAATAACTCAT           |                                      | 21        |
|               | F interno                     | GGTAGGGTTTGTTTATTTGGTGTT<br>TAGTG | 160                                  | 22        |
| R interno     | TCCCTCACTCTTCAAATAACTCA<br>TA | 23                                |                                      |           |

20

Se amplificó 1 µg de ADN genómico tratado con bisulfito por PCR. En la amplificación de PCR, se utilizó una solución de reacción PCR (20 ng de ADN genómico tratado con bisulfito, 5 µl de 10x tampón PCR (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea) y 2 µl (10 pmol/µl) de cebadores PCR), y se llevó a cabo la reacción PCR en las siguientes condiciones: pre-

desnaturalización a 95 °C durante 5 min, y después 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 s, hibridación a 60 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 40 s, seguido por una extensión final a 72 °C durante 5 min. La amplificación del producto de la PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2,0 %.

5 Como resultado, como se muestra en la FIG. 5B, se observó que el gen *GPM6A* no estaba metilado en los tejidos de las 4 personas normales, pero estaba metilado en 5 (un 62,5 %) de los 8 pacientes de cáncer colorrectal. Esto sugiere que el gen *GPM6A* es útil para el diagnóstico de cáncer colorrectal en heces.

**Aplicabilidad industrial**

10 Como se ha descrito anteriormente, la presente invención hace posible la metilación de la isla CpG de un gen marcador específico de cáncer colorrectal para detectarse proporcionando de esta manera la información para diagnosticar el cáncer colorrectal. El uso del procedimiento inventivo para detectar la metilación y la composición inventiva, el kit y el ácido nucleico para el diagnóstico del cáncer colorrectal hace posible diagnosticar el cáncer colorrectal en un estadio de transformación temprano, haciendo posible de esta manera el diagnóstico precoz de cáncer colorrectal. Además, el procedimiento inventivo hace posible que se diagnostique eficazmente el cáncer colorrectal de una manera precisa y rápida en comparación con los procedimientos convencionales.

15 <110> GenomicTree, Inc.

<120> Procedimiento para la detección de la metilación de un gen marcador de metilación específico del cáncer colorrectal para el diagnóstico del cáncer colorrectal

20 <130> PP-B1050

<150> KR10-2010-129208

<151 > 16-12-2010

25 <160> 23

<170> KopatentIn 1.71

30 <210> 1

<211> 700

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

```

ggctctaccgt gctggggcg gtatttggga aataaagaaa gactaagaga cccaggatcc      60
gaatagcgag gcgattacag ggagatctct gtcctccoga gttcccacgt tttcatgttc      120
tctttgggga gcaagttgaa acggggcacg agaaatggaa acttcctaaa acttccactt      180
tgtacagggt tgagcagagg aaggtgctgg tgcagggcca gactggggac aatttctagt      240
ccctttccaa acgaagtgcc catttgaca aaaggttga ggttgaggct gaaggctgat      300
tcttcctaaa ttccacctgg gtaaacagcg tgattaaaag ggcgtccaca ctggctcggg      360
tcaactggacg gtggagttcg gcgcagtca gcttcgctca agtttccagg cagggtccgc      420
ttattcgggtg cttagcggag gcagcttggg atagctccag gaatgtgact gcgtgtggcg      480
gaggggagga agaactgggt gtgaaatagc cgattcacac ccagcactag gacgcagggt      540
cccacgagtc acctcgaaga gcgagggaga agctggggag gagaaagcac tcgccatccc      600
tggaactggcg tatccacagg cgcaggggag atgctgctct tccgcggttg ccgactgcgt      660
tcagccccga gcccgagtta ctcttccaac cccagccccg      700
    
```

40 <210> 2

<211> 20

<212> ADN

ES 2 681 542 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda  
 5 <400> 2  
 gtatttggga aataaagaaa 20  
 <210> 3  
 <211> 30  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda  
 15 <400> 3  
 gactaagaga cccaggatcc gaatagcgag 30  
 <210> 4  
 <211> 40  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda  
 25 <400> 4  
 gttcccacgt ttcatgttc tcttgggga gcaagtgaa 40  
 <210> 5  
 <211> 50  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> sonda  
 35 <400> 5  
 ggggtccaca ctggctcggg tcactggacg gtggagttcg ggcagttca 50  
 40 <210> 6  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> sonda  
 <400> 6  
 50 agtttccagg cagggtccgc ttattcgggtg cttagcggag gcagcttgga atagctccag 60  
 60  
 <210> 7  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 7  
 tgttgattt tgggtattg a 21

5  
 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador

<400> 8  
 aacacatcaa crtcctaatt acata 25

10  
 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> cebador

20  
 <400> 9  
 tgtttggtgt agggggaagt 20

25  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> cebador

<400> 10  
 cccraaaaaa ttattttacc tcca 24

35  
 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> cebador

<400> 11  
 gggaaataaa gaaagattaa gaga 24

45  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> cebador

<400> 12  
 accccrtrttc aacttactc 19

55  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 13

attttagtgg tttaaagatg      20  
  
 <210> 14  
 <211> 19  
 5      <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 10  
  
 <400> 14  
 tgggtgtatt gagagattt      19  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 15      <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 20  
  
 <400> 15  
 aagattaaga gatttaggat      20  
  
 25      <210> 16  
       <211> 25  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
  
 30      <220>  
       <223> cebador  
  
 <400> 16  
 ttaaaggggc gtttatattg gttcg      25  
 35  
  
 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 17  
 cctcgctctt cgaaataact cgta      24  
 45  
  
 <210> 18  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 50      <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 18  
 tagggttcgt ttattcggtg tttagc      26  
 55  
  
 <210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60      <220>  
       <223> cebador

ES 2 681 542 T3

<400> 19  
cctcgctctt cgaaataact cgta 24

5 <210> 20  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador

<400> 20  
taaaagggtg ttatattgg ttgg 25

15 <210> 21  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> cebador

<400> 21  
ccctcactct tcaaaataac tcata 25

25 <210> 22  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> cebador

<400> 22  
ggtaggggtt gttatttgg tgttagtg 29

35 <210> 23  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> cebador

45 <400> 23  
tcctcactc tcaaaataa tcata 26

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de detección del cáncer colorrectal, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
  - (a) el aislamiento de un ADN genómico a partir de una muestra clínica de un paciente;
  - (b) el aislamiento de un ADN genómico a partir de una muestra clínica de una persona normal;
  - 5 (c) la detección del nivel de metilación de la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) a partir del ADN genómico de la muestra del paciente;
  - (d) la detección del nivel de metilación en la isla CpG de un promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) a partir del ADN genómico de la muestra de la persona normal;
  - 10 (e) la determinación de un grado mayor de metilación en la muestra del paciente en comparación con la muestra de la persona normal; y
  - (f) la identificación de la metilación en el promotor o un primer intrón del gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) d con un grado mayor en el paciente, como que tiene una probabilidad de cáncer colorrectal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (c) o (d) se lleva a cabo por un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en PCR, PCR específica de metilación, PCR específica de metilación en tiempo real, PCR utilizando proteínas de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa, un chip de ADN, pirosecuenciación y secuenciación de bisulfito.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección de la isla CpG metilada en el gen *GPM6A* (glicoproteína M6A) se lleva a cabo detectando la metilación de la región representada por la SEQ ID NO: 1.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra clínica se selecciona de entre el grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma sanguíneo, suero, heces, y orina de un paciente sospechoso de cáncer o de un sujeto a diagnosticar.

FIG. 1

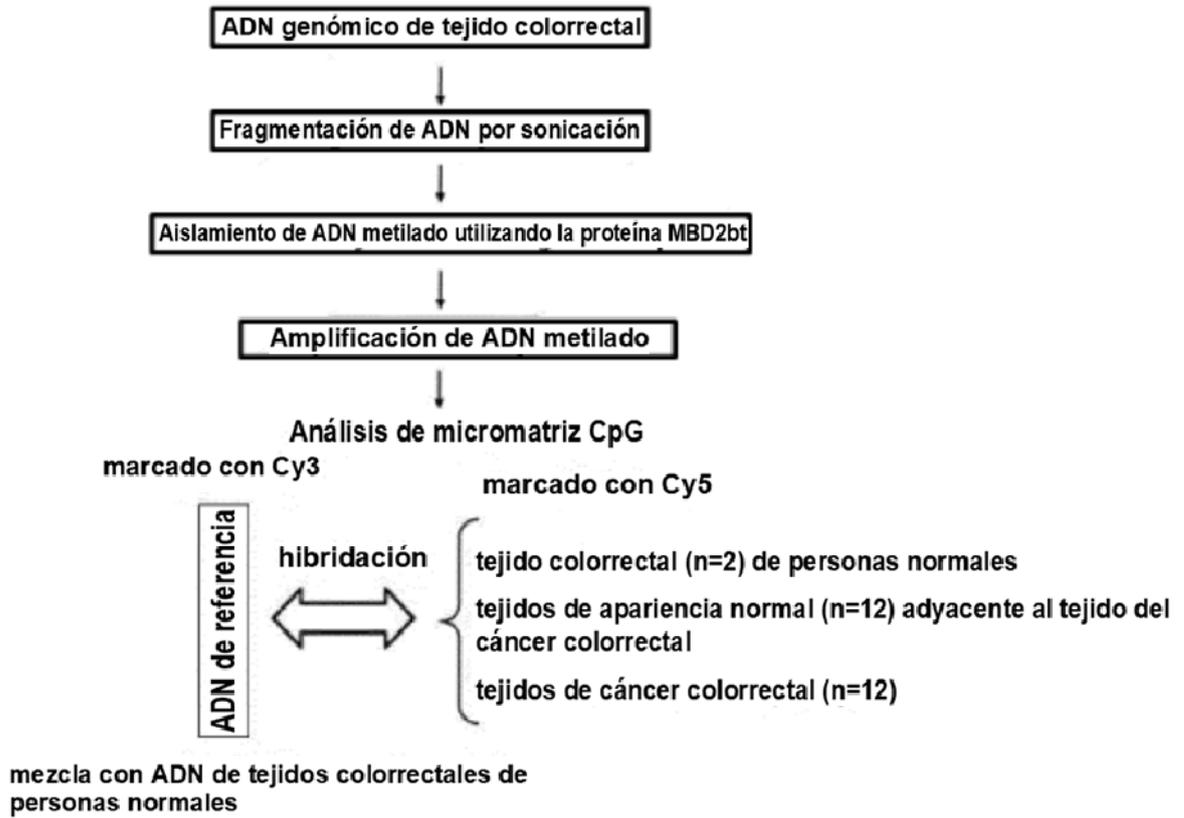


FIG. 2

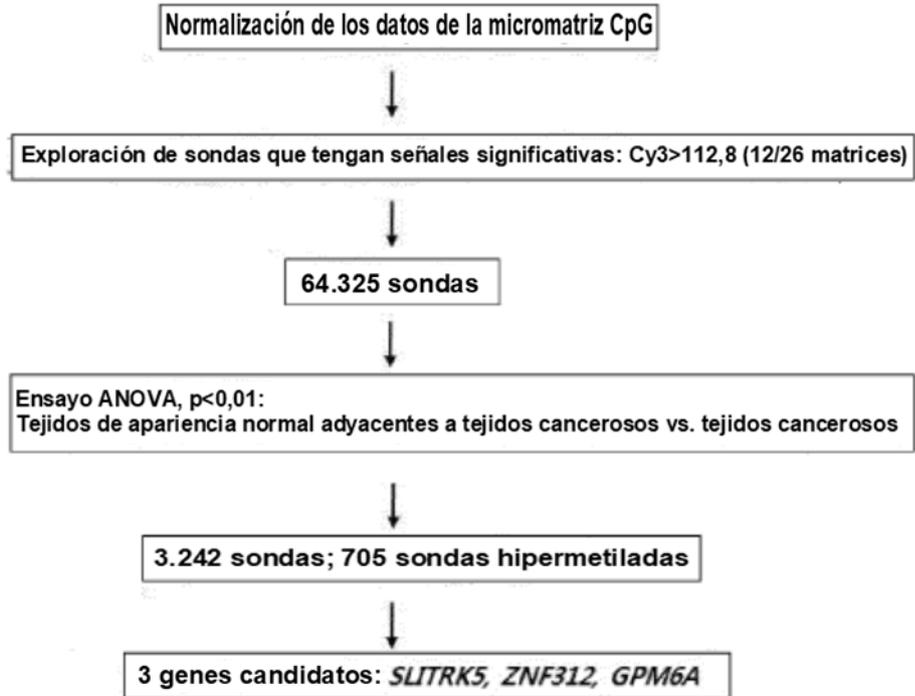


FIG. 3

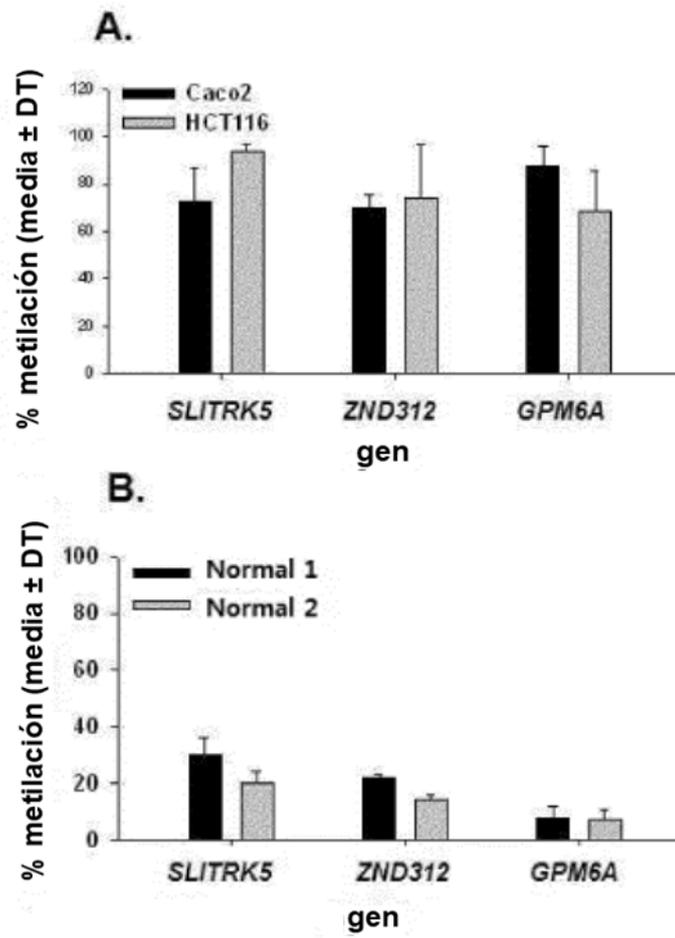


FIG. 4

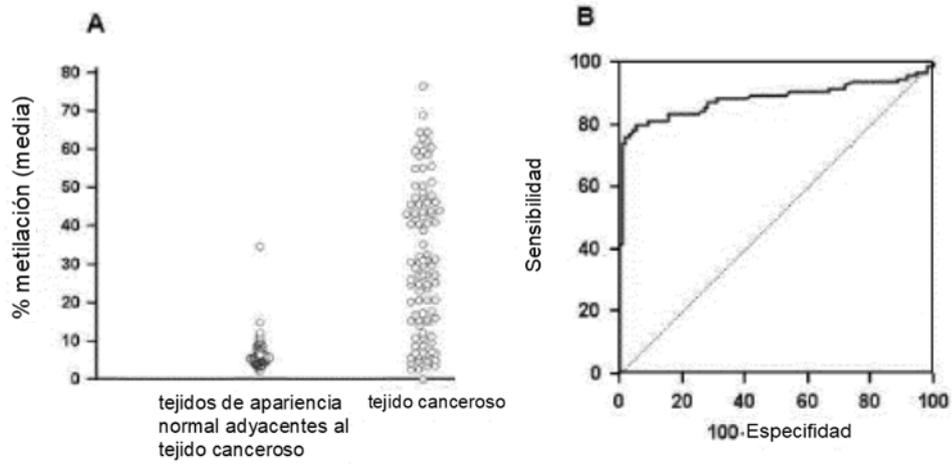


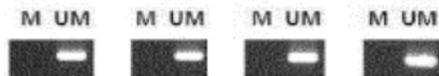
FIG. 5

**A. Línea celular de cáncer colorrectal**

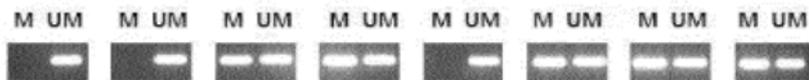


**B. ADN aislado de las heces**

Persona normal (n=4)



Pacientes con cáncer colorrectal (n=8)



M: metilado, UM: no metilado