

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 374**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/CN2015/075882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15149720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15772589 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3126521**

54 Título: **Gen de fusión HNF4G-RSPO2**

30 Prioridad:

04.04.2014 CN 201410135569

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

15.10.2019

73 Titular/es:

**CROWN BIOSCIENCE, INC. (TAICANG) (100.0%)
6 Beijing West Road Science and Technology
Park Taicang Economic Development Area
Jiangsu 215400, CN**

72 Inventor/es:

**CAI, JIE y
LI, HENRY**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 727 374 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).

DESCRIPCION

Gen de fusión HNF4G-RSPO2

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a un nuevo gen de fusión encontrado en células tumorales, y también a un tratamiento dirigido a dicho gen de fusión.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La proteína R-espondina es un agonista de la vía de señalización Wnt/ β -catenina clásica. Se ha descubierto recientemente que los miembros de la familia del gen R-espondina (RSPO) se fusionan con otros socios genéticos en algunos cánceres colorrectales (Seshagiri et al, Nature 2012 488(7413):660-664). Se informa que un gen de fusión EIF3E (exón 1)-RSPO2 (exón 2) formado por la fusión del gen RSPO2 y el gen EIF3E tiene lugar en el 2% de las muestras de cáncer en los pacientes que tienen cáncer de colon, mientras que un gen de fusión PTPRK (exón 1)-RSPO3 (exón 2) formado por la fusión del gen RSPO3 y el gen PTPRK tiene lugar en el 8% de las muestras. Los eventos de fusión de genes generalmente activan la expresión de R-espondinas, que a su vez activa la señalización Wnt. La US2012/0142549 describe fusiones de genes adicionales, por ejemplo, en el cáncer gástrico.

Por lo tanto, la identificación de los socios genéticos para la fusión de RSPO2 en la vía de señalización de las células cancerosas brindará oportunidades potenciales para la intervención terapéutica de los cánceres.

25 BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2 en una muestra que contiene ácido nucleico, que comprende: poner en contacto la muestra con un agente de detección que detecta específicamente un polinucleótido que comprende una fusión de una primera secuencia para HNF4G y una segunda secuencia para RSPO2, y detectar la presencia del polinucleótido.

En algunas realizaciones, la primera secuencia es una secuencia no codificante, y la segunda secuencia es una secuencia codificante.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además detectar el nivel del polinucleótido.

En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G está 5' en sentido ascendente de la segunda secuencia para RSPO2. En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende (a) por lo menos una parte del exón 2 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y (b) por lo menos una parte del exón 3 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318.

En algunas realizaciones, la segunda secuencia para RSPO2 comprende: la segunda secuencia para RSPO2 comprende: (a) por lo menos una parte del exón 2 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000276659, ENST00000517781, ENST00000522333, o ENST00000378439, o (b) por lo menos una parte del exón 1 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000521956.

En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000276659, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000517781, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000522333, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

5 En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000378439, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

10 En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 1 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000521956, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 1 del transcrito del gen RSPO2.

15 En algunas realizaciones, el gen de fusión comprende una unión de fusión de CCACAGCCTT|gttcgtggcg (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, el polinucleótido es ADNc o ARNm.

20 En algunas realizaciones, el agente de detección comprende un primer cebador dirigido a la primera secuencia para HNF4G, y un segundo cebador dirigido a la segunda secuencia para RSPO2. En algunas realizaciones, el agente de detección comprende un cebador de unión dirigido a un fragmento que contiene la unión de fusión, y un cebador no de unión dirigido a la primera o la segunda secuencia.

25 En algunas realizaciones, el agente de detección comprende una primera sonda dirigida a la primera secuencia para HNF4G, y una segunda sonda dirigida a la segunda secuencia para RSPO2. En algunas realizaciones, el agente de detección comprende una sonda de unión dirigida a un fragmento que contiene la unión de fusión.

En algunas realizaciones, el método comprende además detectar el nivel del polinucleótido.

30 En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico se deriva de un sujeto que tiene cáncer gástrico.

35 La presente invención también proporciona un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: un primer cebador dirigido a una primera secuencia para HNF4G, y un segundo cebador dirigido a una segunda secuencia para RSPO2; o un cebador de unión dirigido a un fragmento que contiene la unión de fusión de HNF4G y RSPO2, y un cebador no de unión dirigido a la primera secuencia para HNF4G o la segunda secuencia para RSPO2.

40 En algunas realizaciones, el primer cebador o el segundo cebador está dirigido a una región por lo menos 80 bp en sentido ascendente o en sentido descendente de la unión de fusión del gen de fusión, en donde la unión de fusión comprende CCACAGCCTT|gttcgtggcg (SEQ ID NO: 3).

45 En algunas realizaciones, el primer cebador y el segundo cebador son útiles para amplificar un amplicón que tiene una longitud de aproximadamente 200 bp a 400 bp. En algunas realizaciones, el primer cebador se dirige a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 6; el segundo cebador se dirige a la SEQ ID NO: 2.

50 La presente invención también proporciona un conjunto de sondas para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: una primera sonda dirigida a una primera secuencia para HNF4G, y una segunda sonda dirigida a una segunda secuencia para RSPO2; o una sonda de unión dirigida a un fragmento que contiene la unión de fusión de HNF4G y RSPO2.

55 La presente invención proporciona además un kit para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende el conjunto de cebadores o el conjunto de sondas mencionados anteriormente.

La presente invención proporciona además un modelo animal para una enfermedad humana positiva para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende un xenoinjerto humano que comprende el gen de fusión.

60 La presente divulgación proporciona además un método para evaluar el efecto de un agente de prueba en una enfermedad humana positiva para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: obtener el modelo animal anteriormente mencionado para la enfermedad humana; administrar el agente de prueba al modelo animal; determinar el efecto del agente de prueba en el xenoinjerto humano; y evaluar el efecto del agente de prueba sobre la enfermedad humana. En algunos aspectos, el agente de prueba es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente de prueba se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente terapéutico es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o el gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente de prueba es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a

RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer.

5 La presente divulgación proporciona además un método para evaluar el efecto de un agente de prueba sobre el gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: obtener una célula positiva para el gen de fusión; exponer la célula al agente de prueba; y determinar el efecto del agente de prueba sobre el gen de fusión o en la célula. En algunos aspectos, el agente de prueba es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente de prueba está dirigido a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente de prueba es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o el gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente de prueba es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer.

15 La presente divulgación también proporciona un método para identificar un agente útil para tratar una enfermedad asociada con un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: proporcionar una célula positiva para el gen de fusión, exponer la célula a agentes candidatos, e identificar un agente que modula la actividad biológica del gen de fusión o el producto génico del mismo. En algunos aspectos, el agente es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o el gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer.

25 La presente divulgación también proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico capaz de modular la actividad biológica del gen de fusión o el producto génico del mismo, tratando de este modo la enfermedad. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un antagonista de la vía wnt. En algunas realizaciones, el agente terapéutico se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente terapéutico es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 La Figura 1 es una representación esquemática de la fusión del gen HNF4G -RSPO2 en GA3055. El exón 2 del gen HNF4G se fusionó con el exón 2 (o el exón 1 en el caso del transcrito RSPO2-005) del gen RSPO2. La Figura 2 es la secuencia de unión (SEQ ID NO: 4) de la fusión del gen HNF4G-RSPO2 en GA3055. La secuencia en letras mayúsculas es de HNF4G, la secuencia en letras minúsculas es de RSPO2. El sitio de unión de fusión se indica con "|".

40 La Figura 3 muestra la activación de la expresión del gen RSPO2 por la fusión del gen HNF4G-RSPO2 en GA3055.

45 La Figura 4 muestra la secuencia de unión de la fusión del gen HNF4G-RSPO2 y la localización de los cebadores usados para validar la fusión por PCR. Las letras mayúsculas representan la secuencia de HNF4G; las letras minúsculas representan la secuencia de RSPO2; las secuencias en cajas representan secuencias de cebadores de PCR.

La Figura 5 indica la amplificación por PCR de la región de unión de la fusión del gen HNF4G-RSPO2. La flecha apunta al producto de PCR específico del tamaño esperado.

50 La Figura 6 muestra la secuenciación directa del producto de RT-PCR de la región de unión de la fusión del gen HNF4G-RSPO2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 La presente divulgación se basa por lo menos en parte en el descubrimiento del gen HNF4G como un nuevo compañero de fusión del gen RSPO2. En particular, el nuevo gen de fusión de HNF4G y RSPO2 se encuentra en el tumor gástrico.

60 La presente divulgación proporciona métodos para detectar el gen de fusión de HNF4G y RSPO2, conjuntos de cebadores y conjuntos de sondas útiles para detectar dicho gen de fusión o su producto génico. También se proporcionan métodos de prueba in vitro e in vivo para evaluar o identificar agentes activos para inhibir o reducir el gen de fusión o su producto génico.

Gen de fusión

65 La presente divulgación proporciona nuevos genes de fusión de HNF4G y RSPO2. "Gen de fusión" y "fusión de genes" se usan de manera intercambiable en la presente y se pretende que abarquen tanto el ADN como

el ARN, incluyendo pero no limitado a, la fusión de dos o más genes separados a nivel de ADN (como el ADN genómico o ADNc), nivel de ARN (como el ARNm). En ciertas realizaciones, los dos genes se fusionan a nivel de ADN genómico debido a la reorganización cromosómica, como una translocación, deleción intersticial, o inversión cromosómica. El gen de fusión se puede transcribir y/o traducir a su producto genético, que puede ser ARN o proteína.

Los genes de fusión proporcionados en la presente comprenden una primera secuencia para HNF4G enlazada covalentemente a una segunda secuencia para RSPO2. "HNF4G", como se usa en la presente, puede referirse al gen (por ejemplo, secuencia de ADN) o al transcrito del gen (por ejemplo, ARNm). "RSPO2" como se usa en la presente puede referirse al gen (por ejemplo, secuencia de ADN), al transcrito del gen (por ejemplo, ARNm), o al producto proteico (es decir, la secuencia de aminoácidos), y los expertos en la técnica pueden entender el significado de el contexto. "Secuencia codificante" como se usa en la presente se refiere a la secuencia de polinucleótidos que codifica por lo menos un fragmento de un producto proteico. "Secuencia no codificante", como se usa en la presente, se refiere a la secuencia de polinucleótidos que no codifica la proteína, o la secuencia de polinucleótidos que se transcribe en ARN funcional no codificante. La secuencia puede ser una secuencia de ADN tal como ADN genómico o ADNc, y también puede ser una secuencia de ARN como ARNm. La fusión de las dos secuencias codificantes puede estar en el marco, de tal manera que después de traducirse a su producto proteico, un fragmento de proteína de HNF4G se fusiona con un fragmento de proteína de RSPO2. En el gen de fusión, la secuencia para HNF4G puede ser 5' en sentido ascendente o 3' en sentido descendente de la secuencia codificante para RSPO2. En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G está 5' en sentido ascendente de la segunda secuencia para RSPO2. En ciertas realizaciones, la primera secuencia es una secuencia no codificante, y la segunda secuencia es una secuencia codificante.

La secuencia comprende uno o más exones. Las secuencias de los exones de HNF4G y RSPO2 pueden obtenerse de bases de datos disponibles públicamente, como Ensembl. Brevemente, la base de datos Ensembl proporciona transcritos para un gen dado, como HNF4G o RSPO2, y para cada transcrito, cada una de las secuencias de exones se numera secuencialmente desde la dirección 5' a 3', y se proporciona la secuencia de exones en la que también se identifican su inicio y final en la localización del cromosoma. En algunos casos, una secuencia de exones puede tener una numeración de exones diferente en un transcrito diferente. Por ejemplo, una secuencia de exones puede estar numerada como exón 1 en el transcrito 1, pero numerada como exón 2 en el transcrito 2, aunque la secuencia de exones aún puede ser sustancialmente la misma.

En algunas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende (a) por lo menos una parte del exón 2 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, o (b) por lo menos una parte del exón 3 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318. Como se usa en la presente, un transcrito de gen se identifica por su número de Ensembl, y la secuencia correspondiente está disponible la red mundial en la página web de la organización de Ensembl (<http://asia.ensembl.org/>). Para obtener más detalles sobre la base de datos de Ensembl, ver Flicek et al, Nucleic Acids Research 2014, 42 Número de la base de datos: D749-D755, que se incorpora en la presente como referencia a su totalidad.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia que comprende por lo menos una parte del exón 2 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y la secuencia comprende la SEQ ID NO: 1 (5'-3'):

```
AGCTCCGGGAGCGGCCCGCGCAGGAGCACCAGCGAAAGCAGCCAGTCTGAGATA
TTGACACTACAGAAAAAACTGACAGCTTACTCCTTGTATTGATTCTACTCTTCTCT
ACAAATATAGACTCCGTTCCCTACCACAGCCTT.
```

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia que comprende por lo menos una parte del exón 3 de un transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la secuencia comprende la SEQ ID NO: 6 (5'-3'):

```
GCGGCCCGCGCAGTGATTGCTGCCTTGACCGTCCCTGCTCTTGAAGAGCACCAGC
GAAAGCAGCCAGTCTGAGATATTGACACTACAGAAAAAACTGACAGCTTACTCC
TTGTATTGATTCTACTCTTCTCTACAAATATAGACTCCGTTCCCTACCACAGCCTT.
```

En algunas realizaciones, la segunda secuencia para RSPO2 comprende: (a) por lo menos una parte del exón 2 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000276659, ENST00000517781, ENST00000522333, o ENST00000378439, o (b) por lo menos una parte del exón 1 de un transcrito del gen RSPO2

como se muestra en ENST00000521956. En ciertas realizaciones, la segunda secuencia para el gen RSPO2 comprende o consiste de: i) el exón 2, el exón 3, el exón 4, el exón 5, y el exón 6 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000276659; ii) el exón 2, el exón 3, el exón 4 y el exón 5 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000517781; iii) el exón 2 y el exón 3 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000522333; iv) el exón 1, el exón 2 y el exón 3 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000521956; o v) el exón 2, el exón 3, el exón 4 y el exón 5 de un transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000378439.

En ciertas realizaciones, la segunda secuencia para RSPO2 comprende la SEQ ID NO: 2 (5'-3 '):

GTTCGTGGCGGAGAGATGCTGATCGCGCTGAACTGACCGGTGCGGCCCGGGGGT
 GAGTGGCGAGTCTCCCTCTGAGTCCTCCCCAGCAGCGCGGCCGGCGCCGGCTCTT
 TGGGCGAACCTCCAGTTCCTAGACTTTGAGAGGCGTCTCTCCCCCGCCCGACCG
 CC.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000276659, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000517781, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000522333, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000378439, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 2 del transcrito del gen RSPO2.

En ciertas realizaciones, la primera secuencia para HNF4G comprende una secuencia seleccionada de a) por lo menos una parte del exón 2 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000396419, y b) por lo menos una parte del exón 3 del transcrito del gen HNF4G como se muestra en ENST00000494318, y la segunda secuencia para RSPO2 comprende por lo menos una parte del exón 1 del transcrito del gen RSPO2 como se muestra en ENST00000521956, y el exón 2 del transcrito del gen HNF4G ENST00000396419 o el exón 3 del transcrito del gen HNF4G ENST00000494318 se fusiona con el exón 1 del transcrito del gen RSPO2.

El sitio donde la secuencia HNF4G se fusiona con la secuencia RSPO2 se conoce como unión de fusión. En algunas realizaciones, los genes de fusión proporcionados en la presente comprenden una unión de fusión de CCACAGCCTT|gttcgtggcg (SEQ ID NO: 3), en la que la secuencia HNF4G está en letras mayúsculas y la secuencia RSPO2 está en letras minúsculas. En algunas realizaciones, los genes de fusión comprenden la SEQ ID NO: 4, en la que la secuencia HNF4G está en letras mayúsculas y la secuencia RSPO2 está en letras minúsculas (ver Figura 2). En ciertas realizaciones, los genes de fusión comprenden la SEQ ID NO: 5, en la que la secuencia HNF4G está en mayúsculas y la secuencia RSPO2 está en letras minúsculas (ver Figura 4).

Ciertos ejemplos específicos de los genes de fusión se ilustran a continuación en la Tabla 1 y también en la Figura 1. Los exones que se fusionan entre sí en los genes de fusión están marcados en negrita. Los 5 genes de fusión comparten una unión de fusión idéntica que es la SEQ ID NO: 3. La Figura 1 Muestra una disposición y fusión ejemplar de los exones en los genes de fusión.

Tabla 1

Genes de fusión	Exones HNF4G	Exones RSPO2
5 HNF4G-004-RSPO2-001	Exones 1 y 2 en ENST00000396419	Exones 2 -6 en ENST00000276659
HNF4G-004-RSPO2-002	Exones 1 y 2 en ENST00000396419	Exones 2 -5 en ENST00000517781
HNF4G-004-RSPO2-004	Exones 1 y 2 en ENST00000396419	Exones 2 y 3 en ENST00000522333
HNF4G-004-RSPO2-005	Exones 1 y 2 en ENST00000396419	Exones 1 -3 en ENST00000521956
10 HNF4G-004-RSPO2-201	Exones 1 y 2 en ENST00000396419	Exones 2 -5 en ENST00000378439

Métodos para detectar el gen de fusión y/o el producto génico del mismo

15 En la presente también se proporcionan métodos para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2 proporcionado en la presente en una muestra que contiene ácido nucleico, que comprende: poner en contacto la muestra con un agente de detección que detecta específicamente un polinucleótido objetivo que comprende una fusión de una primera secuencia para HNF4G y una segunda secuencia para RSPO2, y detectar la presencia del polinucleótido objetivo.

20 La muestra que contiene ácido nucleico puede derivarse de una célula o un tejido de un sujeto. El "ácido nucleico", como se usa en la presente, puede ser un polímero de ARN o un polímero de ADN. La muestra puede contener ácido nucleico aislado, como ARN o ADNc aislado. Alternativamente, la muestra puede contener ácido nucleico en su estado natural o no purificado o no amplificado, por ejemplo, la muestra puede ser una célula o tejido
25 aislado, opcionalmente pretratado para liberar el ácido nucleico contenido en la misma. En una realización adicional, el ácido nucleico en la muestra puede amplificarse, por ejemplo, mediante reacción de PCR o transcripción inversa.

30 En ciertas realizaciones, la muestra se deriva de un sujeto que se sospecha tiene un tumor o cáncer gástrico. La muestra puede ser cualquier material biológico adecuado recogido del sujeto, como fluido corporal (por ejemplo, sangre) y una muestra de biopsia (por ejemplo, células o tejidos de un área afectada por la enfermedad). En ciertas realizaciones, la muestra se deriva de un tumor gástrico o de una célula o tejido canceroso. La muestra se puede tratar para extraer el ácido nucleico.

35 En el método de detección, la muestra se pone en contacto con un oligonucleótido que detecta específicamente un polinucleótido objetivo que comprende el gen de fusión. El polinucleótido objetivo puede ser ADNc o ARNm, dependiendo del tipo de ácido nucleico contenido en la muestra. El polinucleótido objetivo puede comprender cualquiera de los genes de fusión como se proporcionan en la presente. En ciertas realizaciones, el polinucleótido objetivo comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9 o la versión de ARN de la misma.

40 El polinucleótido objetivo puede detectarse en base a cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, pero no limitado a, métodos basados en hibridación y métodos basados en amplificación. Los métodos basados en hibridación implican habitualmente usar una sonda para hibridar y detectar la secuencia objetivo. Los ejemplos de métodos basados en hibridación incluyen: transferencia Northern, micromatriz de ADN, secuenciación del genoma completo, secuenciación de ARN (ARN-sec), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), método de análisis de expresión génica multiplexado digital (ver, por ejemplo, Kulkarni MM, Curr Protoc Mol Biol. abril 2011, Capítulo 25: Unidad 25B.10.), Método FISH (hibridación de fluorescencia in situ), CISH (hibridación cromogénica in situ), SISH (hibridación de plata in situ) y similares. Los métodos basados en amplificación implican habitualmente el uso de cebadores, polimerasas y mezclas de monómeros de nucleótidos para sintetizar la cadena de polinucleótidos
45 naciente en base a la secuencia de bases del polinucleótido de plantilla objetivo. Los ejemplos de métodos basados en amplificación incluyen PCR (reacción en cadena de la polimerasa), LCR (reacción en cadena de la ligasa), SDA (amplificación por desplazamiento de cadena), amplificación de ácidos nucleicos iniciada por cebadores isotérmica y quimérica, amplificación isotérmica mediada por giro, amplificación mediada por transcripción y similares.

50 En ciertas realizaciones, el paso de detección implica un paso de amplificación. En tal caso, el agente de detección comprende por lo menos un par de cebadores que pueden hibridar con el polinucleótido objetivo y amplificar una región objetivo que abarca la unión de fusión en presencia de una polimerasa. En una realización, el agente de detección comprende un primer cebador dirigido a la primera secuencia para HNF4G, y un segundo cebador dirigido a la segunda secuencia para RSPO2. Como se usa en la presente, un cebador o una sonda "dirigida a" una secuencia, significa que el cebador o la sonda tiene suficiente identidad o complementariedad con
55 por lo menos una parte de la secuencia, de tal manera que el cebador o la sonda pueden hibridar específicamente con la secuencia o con su cadena complementaria. "Hibridar específicamente" como se usa en la presente significa que el cebador o la sonda pueden hibridar con la secuencia pretendida bajo condiciones rigurosas. "Condición rigurosa", como se usa en la presente, se refiere a la hibridación a 42° C en una solución que consiste en 5 x SSPE, 5 x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, y luego se lava a 42° C con una solución que comprende 0,5 x SSC y SDS al 0,1%.

En otra realización, el agente de detección comprende un cebador de unión dirigido a un fragmento que contiene la unión de fusión, y un cebador no de unión dirigido a la primera o la segunda secuencia. El cebador de unión hibridaría específicamente con la unión de fusión, permitiendo específicamente de este modo la amplificación cuando el polinucleótido objetivo está presente. De lo contrario, si el ácido nucleico en la muestra no contiene el polinucleótido objetivo, el cebador de unión no hibridaría específicamente con su secuencia objetivo y no podría efectuar una amplificación significativa.

Después de la amplificación mediante un método de amplificación de ácidos nucleicos adecuado, como PCR, se detecta el producto de amplificación. En ciertas realizaciones, el producto de amplificación tiene una longitud de 100bp-1500bp (por ejemplo, 100bp-1000bp, 100bp-900bp, 100bp-800bp, 100bp-700bp, 100bp-600bp, 100bp-500bp, 100bp-400bp, 100bp-350bp, 100bp- 100bp- 300bp, 200bp-1000bp, 200bp-900bp, 200bp-800bp, 200bp-700bp, 200bp-600bp, 200bp-500bp, 200bp-400bp, 200bp-350bp, 200bp-300bp, etc.). En ciertas realizaciones, la presencia del producto de amplificación sería indicativa de la presencia del polinucleótido objetivo. En ciertas realizaciones, se detecta adicionalmente el peso molecular o el tamaño o la secuencia del producto de amplificación, y un tamaño o secuencia deseados del producto de amplificación indica la presencia del polinucleótido objetivo.

Cuando el polinucleótido objetivo es ARN, el paso de amplificación puede comprender además opcionalmente un paso de transcripción inversa para producir ADNc del ARN en la muestra. El ADNc se amplifica luego usando los cebadores para permitir la detección de la presencia de la unión de fusión.

Los cebadores proporcionados en la presente tienen una longitud de aproximadamente 10-100 bp (por ejemplo, 10-50 bp, 10-40 bp, 10-30 bp, 10-25 bp, etc.). En ciertas realizaciones, el primer cebador comprende por lo menos 10 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) nucleótidos consecutivos complementarios a una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 6, y el segundo cebador comprende por lo menos 10 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) nucleótidos consecutivos de una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el primer cebador comprende por lo menos 10 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) nucleótidos consecutivos de una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, y el segundo cebador comprende por lo menos 10 nucleótidos consecutivos (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) complementarios a una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 2.

En ciertas realizaciones, el primer cebador o el segundo cebador se dirige a una región por lo menos 80 bp secuencia arriba o secuencia abajo de la unión de fusión del gen de fusión. En ciertas realizaciones, el gen de fusión comprende una unión de fusión de la SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, el primer cebador y el segundo cebador son útiles para amplificar un amplicón que tiene una longitud de aproximadamente 200 bp a 400 bp. En ciertas realizaciones, el primer cebador se dirige a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 y el segundo cebador se dirige a la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, el primer cebador y el segundo cebador se seleccionan del grupo que consta de 5' CAGGAGCACCAGCGAAAAG 3' (SEQ ID NO: 7), y 5' TGAGGGCAAAGGAGAAAAGG 3' (SEQ ID NO: 8).

El cebador de unión comprende por lo menos 6 (por ejemplo, 6, 7, 8, 9 o 10) nucleótidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, o comprende por lo menos 6 nucleótidos consecutivos complementarios a una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, el cebador de unión comprende la SEQ ID NO: 3 o es complementario de la SEQ ID NO: 3. El cebador no de unión puede diseñarse en base a la longitud deseada del producto de la amplificación, una vez que se determina el cebador de unión. Por ejemplo, cuando se desea tener un producto de la amplificación de 300 bp, entonces el cebador no de unión puede diseñarse para que sea complementario al polinucleótido objetivo aproximadamente 300 bp 5' en sentido ascendente de la unión de fusión o 3' en sentido descendente de la unión de fusión.

En ciertas realizaciones, el paso de detección implica un paso de hibridación. Las sondas pueden diseñarse para hibridar específicamente con el polinucleótido objetivo, permitiendo de este modo su detección. Las sondas proporcionadas en la presente pueden tener una longitud adecuada, por ejemplo, aproximadamente 20-200 bp (por ejemplo, 20-190 bp, 20-150 bp, 20-120 bp, 20-100 bp, 20-90 bp, 20-80 bp, 20-70 bp, 20-60 bp, 20-50 bp, 20-40 bp, y etc.).

En ciertas realizaciones, el agente de detección comprende una primera sonda dirigida a la primera secuencia para HNF4G, y una segunda sonda dirigida a la segunda secuencia para RSPO2. En ciertas realizaciones, la primera sonda comprende por lo menos 10 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) nucleótidos consecutivos dirigidos a una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, y la segunda sonda comprende por lo menos 10 (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.) nucleótidos consecutivos dirigidos a una parte de igual longitud de la SEQ ID NO: 2. En un ejemplo ilustrativo, una de las primeras y segundas sondas puede ser una sonda de captura que comprende además un resto inmovilizador capaz de asociarse con un sustrato a través de un enlace covalente o no covalente, y la otra sonda puede ser una sonda de detección que comprende además un marcador detectable. La sonda de captura puede contactar primero con la muestra para permitir la hibridación con el ácido nucleico, luego el complejo se inmoviliza sobre un sustrato a través

del resto inmovilizador en la sonda de captura, y se eliminan las moléculas no unidas. La sonda de detección se añade luego a los complejos inmovilizados para permitir que tenga lugar la hibridación. Después de lavar el exceso de sonda, se detecta el marcador detectable inmovilizado sobre el sustrato. Los ejemplos ilustrativos del resto inmovilizador incluyen, pero no están limitados a, biotina, estreptavidina, antígeno, anticuerpo, proteína A, proteína G, oligonucleótido, etc. El marcador detectable en la sonda de detección puede ser, por ejemplo, colorante fluorescente, radioisótopo, anticuerpo, enzima y oligonucleótido (por ejemplo, un código de barras de oligonucleótido). En otro ejemplo ilustrativo, una de las primeras y segundas sondas comprende además un colorante fluorescente y la otra sonda comprende un amortiguador. Después de que ambas sondas se unen al polinucleótido objetivo, las dos sondas están una cerca de la otra, de tal manera que el amortiguador en una sonda inactiva la señal fluorescente del colorante en la otra sonda. Los ejemplos ilustrativos de colorante fluorescente incluyen, pero no están limitados a, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Alexa 488, Alexa 532, cy3, cy5, 6-joe, EDANS; rodamina 6G (P6G) y sus derivados (tetrametilrodamina (TMR), isotiocianato de tetrametilrodamina (TMRITC), x-rodamina, rojo de Texas, "BODJYPY FL" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA), "BODIPY FL/C3" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), "BODIPY EL/C6" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), "BODIPY 5-FAM" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), "BODIPY TMR" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.) y derivados de los mismos (por ejemplo, "BODIPY TR" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), "BODIPY R6G" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), "BODIPY 564" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.), y "BODIPY 581" (nombre comercial, producto de Molecular Probes, Inc.)). Los ejemplos ilustrativos del amortiguador incluyen, entre pero no están limitados a, Dabcyl, "QSY7" (Molecular Probes), "QSY33" (Molecular Probes), Ferroceno y sus derivados, metil viologen y N,N'-dimetil-2,9-diazopirenio y similares.

En ciertas realizaciones, el agente de detección comprende una sonda de unión dirigida a un fragmento que contiene la unión de fusión. La sonda de unión comprende por lo menos 6 (por ejemplo, 6, 7, 8, 9 o 10) nucleótidos consecutivos de una longitud igual a la SEQ ID NO: 3, o comprende por lo menos 6 nucleótidos consecutivos complementarios de una longitud igual a la SEQ ID NO: 3. La sonda de unión puede comprender además un marcador detectable. En un ejemplo ilustrativo, el ácido nucleico en la muestra puede inmovilizarse sobre un sustrato, y luego ponerse en contacto con la sonda que reconoce la unión de fusión. Después de lavar las sondas sin reaccionar, puede detectarse en el sustrato la presencia de la sonda, lo que puede indicar la presencia de la unión de fusión del gen de fusión. En otro ejemplo ilustrativo, la sonda de unión puede comprender tanto un colorante fluorescente como un amortiguador, de tal manera que el amortiguador inactiva la fluorescencia del colorante cuando la sonda está intacta. La sonda puede usarse en un método de amplificación en el que una región objetivo que abarca la unión de fusión debe amplificarse usando una polimerasa que tenga actividad exonucleasa 5'-3' (como la Taq polimerasa). Durante la amplificación, la sonda que hibrida con la unión de fusión puede degradarse por la polimerasa a medida que avanza a lo largo del polinucleótido objetivo, separando de este modo el colorante fluorescente y el amortiguador de la sonda, y permitiendo que el tinte fluorescente emita su señal a ser detectada.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona además métodos para detectar el gen de fusión proporcionado en la presente en una muestra que contiene proteínas, que comprende poner en contacto la muestra con un agente de detección que detecta específicamente una proteína de fusión codificada por el gen de fusión, y detectar la presencia de proteína de fusión.

Se puede detectar la presencia y el nivel de la proteína de fusión codificada por el gen de fusión. Por ejemplo, la muestra puede ponerse en contacto con un anticuerpo específico para la proteína de fusión, y se puede detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y la proteína de fusión usando métodos conocidos en la técnica como, por ejemplo, un ensayo de inmunohistoquímica, método de transferencia Western, ELISA, ELIFA, método de inmunoensayo de fluorescencia, método de radioinmunoensayo, método de inmunoensayo enzimático, método de sándwich de anticuerpos dobles, etc.

50 **Kits**

Los conjuntos de cebadores o conjuntos de sondas o sondas de unión como se proporcionan en la presente son útiles para detectar el gen de fusión de HNF4G y RSPO2. Por lo tanto, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a kits que comprenden los conjuntos de cebadores, o los conjuntos de sondas, o la sonda de unión descrita en la presente.

En ciertas realizaciones, los kits comprenden un primer cebador dirigido a una primera secuencia para HNF4G, y un segundo cebador dirigido a una segunda secuencia para RSPO2. En ciertas realizaciones, los kits comprenden un cebador de unión dirigido a un fragmento que contiene la unión de fusión de HNF4G y RSPO2, y un cebador no de unión dirigido a la primera secuencia para HNF4G o la segunda secuencia para RSPO2.

En ciertas realizaciones, los kits comprenden una primera sonda dirigida a una primera secuencia para HNF4G, y una segunda sonda dirigida a una segunda secuencia para RSPO2. En ciertas realizaciones, los kits comprenden una sonda de unión dirigida a un fragmento que contiene la unión de fusión.

65

Los kits proporcionados en la presente pueden comprender además uno o más componentes útiles para la detección, por ejemplo, polimerasa, un tampón útil para la amplificación, y/o un tampón útil para la hibridación de la sonda.

5 **Métodos de uso**

La presente divulgación proporciona además métodos para usar el gen de fusión.

10 La fusión del gen de HNF4G-RSPO2 es un reordenamiento intracromosoma en Chr.8 humano. Los presentes inventores han descubierto que este gen de fusión de HNF4G y RSPO2 está presente en un tejido de cáncer gástrico, mientras que las fusiones de genes anteriores de R-Espondina se describieron solo en muestras de tumores colorrectales. Por tanto, el gen de fusión de HNF4G y RSPO2 puede ser un objetivo tratable con fármacos para una enfermedad positiva para el gen de fusión, y en particular, para una enfermedad asociada con la señalización de wnt.

15 En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para identificar un agente candidato útil para tratar una enfermedad positiva para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2 en un sujeto, que comprende: proporcionar una célula positiva para el gen de fusión, exponer la célula a agentes candidatos, e identificar un agente candidato que module la actividad biológica del gen de fusión o el producto génico del mismo.

20 El término "modular" usado en la presente se refiere a la regulación por incremento o a la regulación por disminución del nivel de expresión y/o actividad biológica del gen de fusión o su producto génico. En ciertos aspectos, la célula se deriva de un tejido o una muestra de un sujeto positivo para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, la célula se deriva de un tejido o muestra de un sujeto con tumor gástrico o cáncer gástrico que se detecta como positivo para el gen de fusión. En ciertos aspectos, la célula puede ser diseñada genéticamente para comprender el gen de fusión. En ciertos aspectos, los agentes candidatos pueden incluir, pero no están limitados a, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas, y anticuerpos o el fragmento de unión al antígeno de los mismos. En ciertos aspectos, el agente candidato es un antagonista de la vía wnt. En ciertos aspectos, el agente candidato se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente candidato es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o el gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, el agente candidato es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2.

25 En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona además métodos para evaluar el efecto de un agente de prueba sobre el gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: obtener una célula positiva para el gen de fusión; exponer la célula al agente de prueba; y determinar el efecto del agente de prueba sobre el gen de fusión o sobre la célula. El efecto del agente de prueba sobre el gen de fusión puede ser, por ejemplo, reducir o elevar el nivel de expresión y/o la actividad biológica del gen de fusión o su producto génico.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad asociada con un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente terapéutico capaz de modular la actividad biológica del gen de fusión o el producto génico del mismo, tratando de este modo la enfermedad.

45 En ciertos aspectos, la enfermedad es una enfermedad proliferativa que implica el crecimiento celular incontrolado. En ciertos aspectos, la enfermedad es tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, la enfermedad es un tumor gástrico o cáncer gástrico.

50 Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a una o más actividades terapéuticas que se llevan a cabo para tener uno o más resultados deseados o beneficiosos y se pueden realizar ya sea para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. En esta divulgación, el tratamiento deseado o beneficioso incluye, pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: prevenir la aparición o recurrencia de la enfermedad, el alivio de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, la disminución de las consecuencias patológicas de la enfermedad, prevenir la metástasis, mejora de la enfermedad, aumento de la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminución de la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de quienes padecen la enfermedad. En ciertos aspectos, el agente terapéutico puede ser uno cualquiera de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, una proteína de unión, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, un ácido nucleico y cualquier combinación de los mismos.

60 En ciertos aspectos, el agente terapéutico incluye, pero no está limitado a, ácidos nucleicos, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, y un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En ciertos aspectos, el agente terapéutico es un antagonista de la vía wnt. En ciertos aspectos, el agente terapéutico se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente

65

terapéutico es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. La presente divulgación proporciona además un método para evaluar el efecto de un agente de prueba sobre el gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: obtener una célula positiva para el gen de fusión; exponer la célula al agente de prueba; y determinar el efecto del agente de prueba sobre el gen de fusión o sobre la célula.

Como se usa en la presente, la expresión "efecto del agente de prueba" puede incluir el efecto sobre el nivel de expresión o la actividad biológica del gen de fusión, y/o sobre el nivel de expresión o la actividad biológica del producto proteico del gen de fusión.

En algunos aspectos, el agente de prueba es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente terapéutico es un antagonista de la vía wnt. En algunas realizaciones, el agente de prueba se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2, o al producto génico del gen de fusión. En ciertos aspectos, el agente de prueba es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente de prueba es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, la enfermedad es tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, la enfermedad es un tumor gástrico o cáncer gástrico.

Modelo animal y uso del modelo animal.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona modelos animales para una enfermedad humana positiva para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende un xenoinjerto humano que comprende el gen de fusión proporcionado en la presente.

El xenoinjerto humano comprende una célula o tejido positivo para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que, después de ser injertado en el animal, puede simular o imitar la enfermedad humana o una lesión de la enfermedad asociada con el gen de fusión. El xenoinjerto puede injertarse en el modelo animal usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, injertando células por vía subcutánea, intraperitoneal o intravenosa mediante inyección; o alternativamente, implantando una fracción de tejido mediante cirugía. En algunos aspectos, los xenoinjertos son células cancerosas y se injertan en el modelo animal mediante inyección subcutánea. En ciertos aspectos, los xenoinjertos son células o tejidos del tumor gástrico humano o cáncer gástrico. La presencia del gen de fusión puede llevar a una diferencia en la enfermedad, por ejemplo, diferente gravedad de la enfermedad, diferentes subtipos de la enfermedad, diferentes etapas de la enfermedad, diferente capacidad de respuesta a un agente terapéutico particular, y demás. Como tales, los modelos animales proporcionados en la presente son particularmente útiles para estudiar una enfermedad humana asociada con el gen de fusión, y también para evaluar la capacidad de respuesta de la enfermedad a un agente terapéutico particular. En ciertos aspectos, la enfermedad es tumor o cáncer. En ciertos aspectos, la enfermedad es tumor gástrico o cáncer gástrico.

El término "animal", como se usa en la presente, se refiere a todos los animales vertebrados, excepto los humanos, preferiblemente un mamífero, como un perro, un cerdo, un conejo o un roedor (por ejemplo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o similar). En ciertas realizaciones, el modelo animal es un mamífero. En ciertos aspectos, el modelo animal es un roedor. En ciertos aspectos, el roedor es un ratón, una rata, una cobaya o un hámster. En ciertos aspectos, el modelo animal es inmunodeficiente. El animal inmunodeficiente está agotado de células T endógenas activas, células B endógenas activas y células asesinas naturales endógenas activas. Los ejemplos de animales inmunodeficientes incluyen, por ejemplo: animales deficientes en linfocitos T (por ejemplo, ratones desnudos BALB/c, ratones desnudos C57BL, ratones desnudos NIH, rata desnuda, etc.); animales deficientes en linfocitos B (por ejemplo, ratones CBA/N); animal deficiente en células NK (por ejemplo, ratones beige); animales inmunodeficientes combinados (por ejemplo, ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID) (deficientes en linfocitos T y B combinados), Beige/desnudo (deficientes en linfocitos T y células NK combinados), ratones SCID Beige/SCID NOD (deficientes en linfocitos T y células NK combinados), y animales que se tratan o manipulan para tener un sistema inmune que se parece a cualquiera de los animales inmunodeficientes mencionados anteriormente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para evaluar el efecto de un agente de prueba sobre una enfermedad humana positiva para un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: obtener el modelo animal para la enfermedad humana proporcionada en la presente; administrar el agente de prueba al modelo animal; determinar el efecto del agente de prueba en el xenoinjerto humano; y evaluar el efecto del agente de prueba sobre la enfermedad humana.

En ciertos aspectos, el agente de prueba puede incluir, pero no están limitado a, ácidos nucleicos, molécula pequeñas s orgánicas o inorgánicas, y anticuerpos o el fragmento de unión al antígeno de los mismos. En algunos aspectos, el agente de prueba es un antagonista de la vía wnt. En algunos aspectos, el agente terapéutico se dirige a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertas realizaciones, el agente de prueba es un ARN de interferencia pequeño (ARNip) que se une a RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En algunos aspectos, el agente de prueba es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a

5 RSPO2 o al gen de fusión de HNF4G y RSPO2. En ciertos aspectos, la enfermedad es tumor o cáncer. En ciertas realizaciones, la enfermedad es un tumor gástrico o cáncer gástrico. El agente de prueba puede administrarse al modelo animal en una o más dosis adecuadas, y pueden evaluarse los efectos sobre el modelo animal. El agente de prueba puede administrarse al modelo animal de cualquier manera adecuada conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, el agente de prueba puede administrarse por vía oral, gastrointestinal, tópica, intrarrectal, intravenosa, transdérmica, transmucosal, etc. En ciertos aspectos, el término "dosis adecuada" o "dosis" se refiere a unidades físicamente discretas que contienen una cantidad predeterminada del agente de prueba, que se calcula para producir un efecto deseado. En ciertos aspectos, al animal se le administra una dosis individual o dosis múltiples. En ciertos aspectos, la evaluación se lleva a cabo una o varias veces. En ciertos aspectos, la evaluación se lleva a cabo en muestras o especímenes (por ejemplo, sangre, una biopsia) de los animales antes y después de la administración de los agentes de prueba. En algunos aspectos, la prueba se lleva a cabo observando los cambios físicos (por ejemplo, pérdida/ganancia de peso, estado mental) del animal antes y después de la administración de los agentes de prueba. En ciertos aspectos, la evaluación se realiza comparando el tamaño/peso del xenoinjerto y/o comparando la presencia y/o el nivel de ciertos biomarcadores en el modelo animal antes y después de la administración de los agentes de prueba.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención. No se pretende que la limiten de ninguna manera.

20 EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Realización del perfil genómico de modelos de xenoinjerto derivado de paciente (PDX)

25 Los xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) reflejan la patología y los perfiles genéticos de los pacientes, por lo que se valoran como modelos experimentales predictivos para estudiar oncogénesis y tratamientos personalizados. Para comprender mejor los mecanismos subyacentes del desarrollo del cáncer y para identificar biomarcadores y objetivos moleculares para un diagnóstico y tratamiento del cáncer eficaces, se realiza el perfil genómico en una colección de 50 modelos de cáncer gástrico PDX.

30 El ARN total derivado de tejidos tumorales congelados al instante de los 50 modelos de PDX se preparó y purificó usando reactivo Tri® siguiendo el protocolo estándar. La secuenciación de transcriptomas se realizó en la plataforma Illumina HiSeq 2500, seguido de un análisis de datos RNAseq (como se muestra en la Tabla 2) sobre la fusión génica con SOAPfuse y Defuse.

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2. La fusión de genes HNF4G-RSPO2 se detectó en el modelo de PDX GA3055

Up_gene	PDX_mo del	Validación	Up_chr	Up_strand	Up_genome_pos	Dw_gene	Dw_chr	Dw_strand	Dw_genome_pos	Spannum bys-oapfuse	Juncnum bys-oapfuse	Spannum bydefuse	Juncnum bydefuse
HNF4G	GA3055-P2	Sí P6	chr8	+	76402443	RSPO2	chr8	-	109095035	5	15	8	19
HNF4G	GA3055-P3	Sí P6	chr8	+	76402443	RSPO2	chr8	-	109095035	10	15	no detectado	no detectado
RSPO2	GA3055-P3	ND	chr8	-	109095035	HNF4G	chr8	+	76402443	no detectado	no detectado	10	18

Los datos de expresión génica generados por la tecnología RNA-seq de los 50 modelos de cáncer gástrico PDX (ver Figura 3) se denotaron usando log₁₀ (FPKM). El log₁₀ más bajo (FPKM) se estableció en -2. Para los genes cuyo log₁₀(FPKM) fue menor de -2 se mostró a -2 cuando se representaron en gráficos los valores de la expresión. Los genes y los transcritos usados para el análisis de RNA-seq se basaron en la base de datos ENSEMBL versión 66, es conveniente buscar información de los genes relacionada en la página web "<http://feb2012.archive.ensembl.org/index.html>".

Se detectó una fusión de genes HNF4G-RSPO2 en un modelo PDX de cáncer gástrico mediante secuenciación del transcriptoma. Este es el primer informe sobre tal constructo de fusión génica encontrado en muestras de xenoinjertos de cáncer gástrico humano.

En más de 50 modelos PDX gástricos examinados, solo se encontró un modelo que contenía la fusión de genes HNF4G-RSPO2, que puede representar una subpoblación de pacientes con cáncer gástrico. El evento de fusión HNF4G-RSPO2 parece activar la expresión del gen RSPO2 ya que el resto de los modelos de PDX de cáncer gástrico no expresan el gen.

EJEMPLO 2: Validación de la fusión de genes HNF4G-RSPO2 en modelos de tejido de cáncer HuPrime® usando PCR

Para validar la presencia del gen de fusión de HNF4G-RSPO2, se extrajo ARN de los modelos de tejido de cáncer HuPrime® y se purificó usando Reactivo Tri® siguiendo el protocolo estándar. El Luego se preparó el ADNc usando transcripción inversa siguiendo un protocolo estándar seguido de amplificación por PCR específica del gen y secuencia directa. Los cebadores se diseñaron como se muestra en la Tabla 3 a partir de la localización de la unión de fusión génica como se muestra en la Figura 4.

Tabla 3. Información de Cebadores

Cebador	SEQ ID NO:	Secuencia	Tamaño del amplicón
RSPO2/HNF4G-F	7	5' CAGGAGCACCCAGCGAAAG 3'	323 bp
RSPO2/HNF4G-R	8	5' TGAGGGCAAAGGAGAAAAGG 3'	

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en 50 µl de reacciones compuestas de lo siguiente: 1 µl de muestra de ADNc, 5 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de cebadores, 4 µl de dNTP y 1 µl de TaqE. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94° C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 s, apareamiento a 55-65° C durante 30 s y extensión a 72° C durante 30 s, con una extensión final a 72° C durante 7 min. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (ver Figura 5).

Los productos de PCR se secuenciaron mediante el método de secuenciación de Sanger usando cebadores directos (superiores) e inversos (inferiores), y se muestra que los cromatogramas tienen una unión de secuencia consistente según se detecta por secuenciación de ARN (ver la Figura 6). Por lo tanto, se confirmó la presencia de la fusión génica HNF4G-RSPO2 mediante RT-PCR y secuenciación directa.

La identificación de la fusión génica HNF4G-RSPO2 en el modelo PDX de cáncer gástrico proporcionó una herramienta valiosa para estudiar la tumorigénesis en pacientes con cáncer con antecedentes genéticos similares. Además, el modelo de fusión génica también proporcionó una herramienta valiosa para evaluar nuevos medicamentos contra el cáncer que se dirigen a las R-espondinas o miembros en las vías de señalización Wnt.

Aunque la invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a realizaciones específicas (algunas de las cuales son realizaciones preferidas), los expertos en la técnica deberían entender que se pueden realizar varios cambios en la forma y el detalle sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención como se divulga en la presente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Crown Bioscience, INC.(Taicang)

<120> GEN DE FUSION HNF4G-RSPO2 Y USO DEL MISMO EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER

<130> 061557-8011WO01

<150> CN201410135569.9

<151> 2014-04-04

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
 <211> 143
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 1

agctccggga gcggcccgcg caggagcacc agcgaagca gccagtctga gatattgaca 60
 ctacagaaaa aactgacagc ttactccttg tattgattct actcttctct acaaatatag 120
 actccgttcc ctaccacagc ctt 143

20 <210> 2
 <211> 166
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2

gttcgtggcg gagagatgct gatcgcgctg aactgaccgg tgcggcccgg gggtagtggt 60
 cgagtctccc tctgagtcct ccccagcagc gcgccggcg ccggtcttt gggcgaacct 120
 tccagttcct agactttgag aggcgtctct cccccgccc accgcc 166

35 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ccacagcctt gttcgtggcg 20

40 <210> 4
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

45 <400> 4

gcgcccgcg cagtgattgc tgccttgacc gtccctgctc ttgaagagca ccagcgaag 60
 cagccagtct gagatattga cactacagaa aaaactgaca gcttactcct tgtattgatt 120
 ctactcttct ctacaaatat agactccgtt ccctaccaca gccttgttcg tggcggagag 180
 atgctgatcg cgctgaactg accggtgcgg cccgggggtg agtggcgagt ctccctctga 240
 55 gtcctcccca gcagcgcggc cggcgcggc tctttggggc aaccctccag ttcctagact 300
 ttgagaggcg tctctcccc gcccgaccgc c 331

60 <210> 5
 <211> 343
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

65

ES 2 727 374 T3

<400> 5

agctccggga gcgggccgcg caggagcacc agcgaagca gccagtctga gatattgaca 60

5 ctacagaaaa aactgacagc ttactccttg tattgattct actcttctct acaaatatag 120

actccgttcc ctaccacagc cttgttcgtg gcgagagat gctgatcgcg ctgaactgac 180

10 cgggtgcgcc cgggggtgag tggcgagtct ccctctgagt cctcccagc agcgcggccg 240

gcgccggctc tttgggcgaa ccctccagtt cctagacttt gagaggcgtc tctccccgc 300

ccgaccgcc agatgcagtt tgccttttc tctttgccc tca 343

15 <210> 6
<211> 165
<212> ADN
<213> Homo sapiens

20 <400> 6

gcggcccgcg cagtgattgc tgccttgacc gtcctgctc ttgaagagca ccagcgaag 60

25 cagccagtct gagatattga cactacagaa aaaactgaca gcttactcct tgtattgatt 120

ctactcttct ctacaaatat agactccggt ccctaccaca gcctt 165

30 <210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 7
caggagcacc agcgaag 18

40 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Oligonucleótido

50 <400> 8
tgaggcaaa ggagaaaagg 20

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2 en una muestra que contiene ácido nucleico, que comprende:
- 10 a) poner en contacto la muestra con un agente de detección que detecta específicamente un polinucleótido que comprende una fusión de una primera secuencia codificante para HNF4G y una segunda secuencia codificante para RSPO2, y
- 10 b) detectar la presencia del polinucleótido.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en el que la primera secuencia codificante para HNF4G está 5' en sentido ascendente de la segunda secuencia codificante para RSPO2.
- 3.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el gen de fusión comprende una unión de fusión de GCCTT|gttcg (SEQ ID NO: 3).
- 4.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polinucleótido es ADNc o ARNm, preferiblemente en el que el agente de detección comprende un primer cebador complementario a la primera secuencia codificante para HNF4G, y un segundo cebador complementario a la segunda secuencia codificante para RSPO2; o
- 20 en el que el agente de detección comprende una primera sonda complementaria a la primera secuencia codificante para HNF4G, y una segunda sonda complementaria a la segunda secuencia codificante para RSPO2.
- 5.** El método de la reivindicación 3, en el que el agente de detección comprende un cebador de unión complementario a un fragmento que contiene la unión de fusión, y un cebador no de unión complementario a la primera o la segunda secuencia codificante; o
- 25 en el que el agente de detección comprende una sonda de unión complementaria a un fragmento que contiene la unión de fusión,
- 6.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además detectar el nivel del polinucleótido, preferiblemente en el que la muestra de ácido nucleico se deriva de un sujeto que se sospecha tiene cáncer gástrico.
- 7.** Un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende:
- 35 a) un primer cebador complementario de una primera secuencia codificante para HNF4G, y un segundo cebador complementario de una segunda secuencia codificante para RSPO2; o
- 40 b) un cebador de unión complementario a un fragmento que contiene la unión de fusión de HNF4G y RSPO2, y un cebador no de unión complementario a la primera secuencia codificante para HNF4G o la segunda secuencia codificante para RSPO2.
- 8.** El conjunto de cebadores de la reivindicación 7, en el que el primer cebador o el segundo cebador es complementario a una región por lo menos 80 bp en sentido ascendente o en sentido descendente de la unión de fusión del gen de fusión, en el que la unión de fusión comprende GCCTT|gttcg (SEQ ID NO: 3) o
- 45 en el que el primer cebador y el segundo cebador son útiles para amplificar un amplicón que tiene una longitud de aproximadamente 200 bp a 400 bp, preferiblemente en el que el primer cebador es complementario a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6; el segundo cebador es complementario a la SEQ ID NO: 2.
- 9.** Un conjunto de sondas para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende: una sonda de unión complementaria a un fragmento que contiene la unión de fusión de HNF4G y RSPO2.
- 50 **10.** Un kit para detectar un gen de fusión de HNF4G y RSPO2, que comprende un conjunto de cebadores de la reivindicación 7 o un conjunto de sondas de la reivindicación 9.

55

60

65

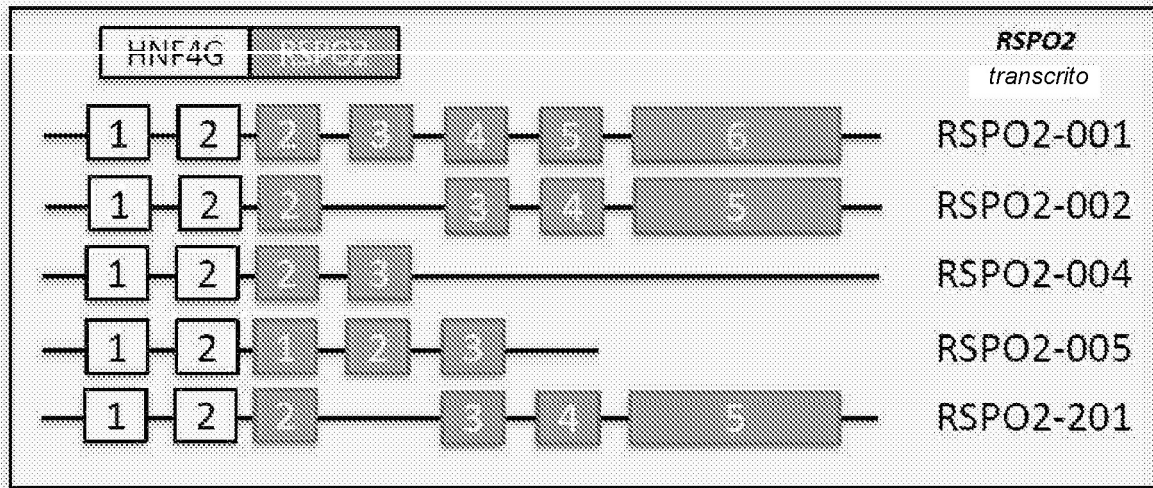


Figura 1

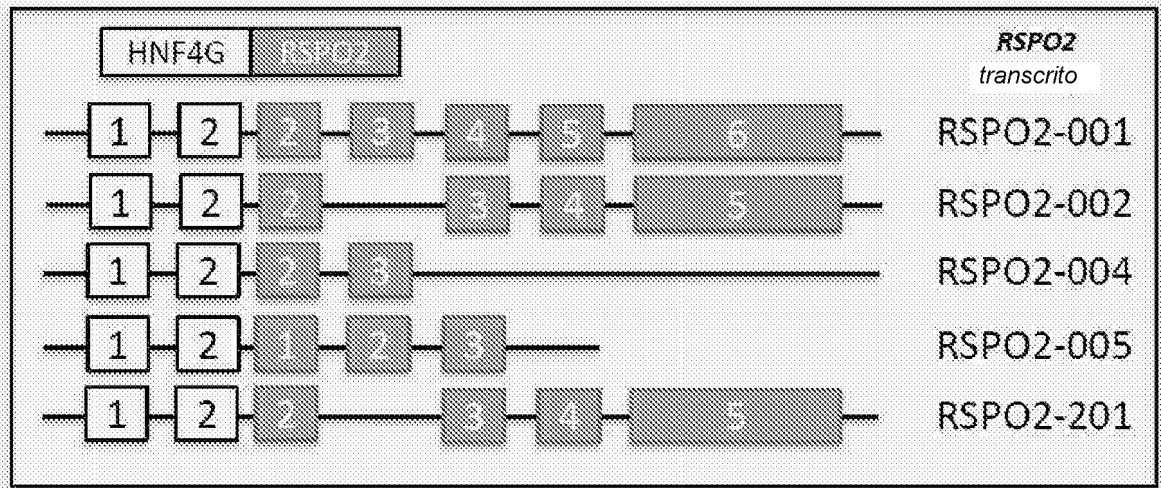


Figura 1

```
GCGGCCCGCGCAGTGATTGCTGCCTTGACCGTCCCTGCTCTTGAAGAGCACCAGCGAAAGCAG
CCAGTCTGAGATATTGACACTACAGAAAAACTGACAGCTTACTCCTTGATTGATTCTACTCTTC
TCTACAAATATAGACTCCGTTCCCTACCACAGCCTT|gttegtggcggagagatgctgatcgcgctgaactgac
cggtgccggcccggggggtgagtgccgagtcctcctctgagtcctccccagcagcgcggccggcggcctttgggcgaac
cctccagttcctagactttgagagggcgtctctccccgcccgaccgcc
```

Figura 2

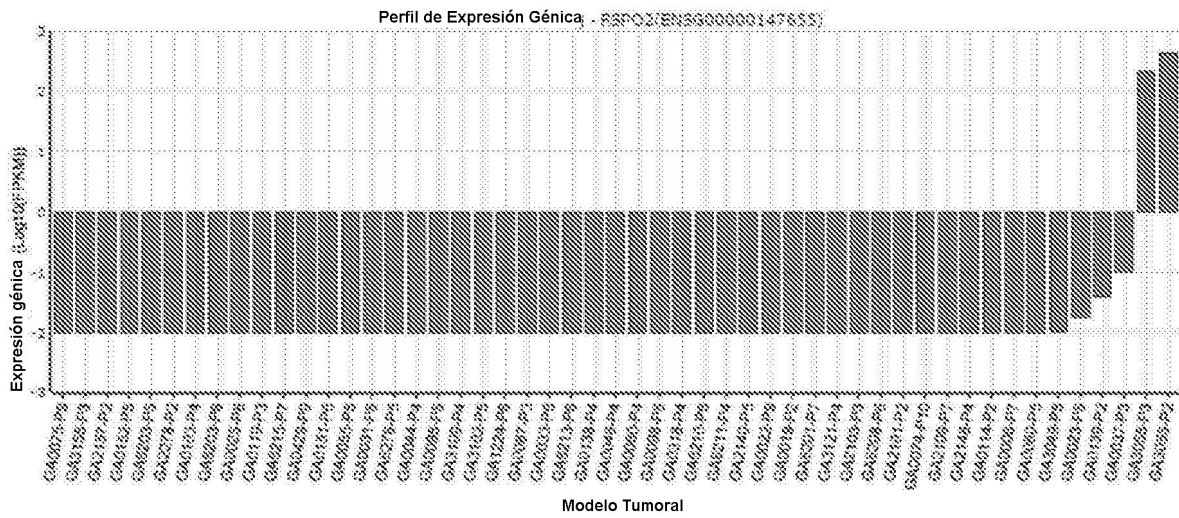


Figura 3

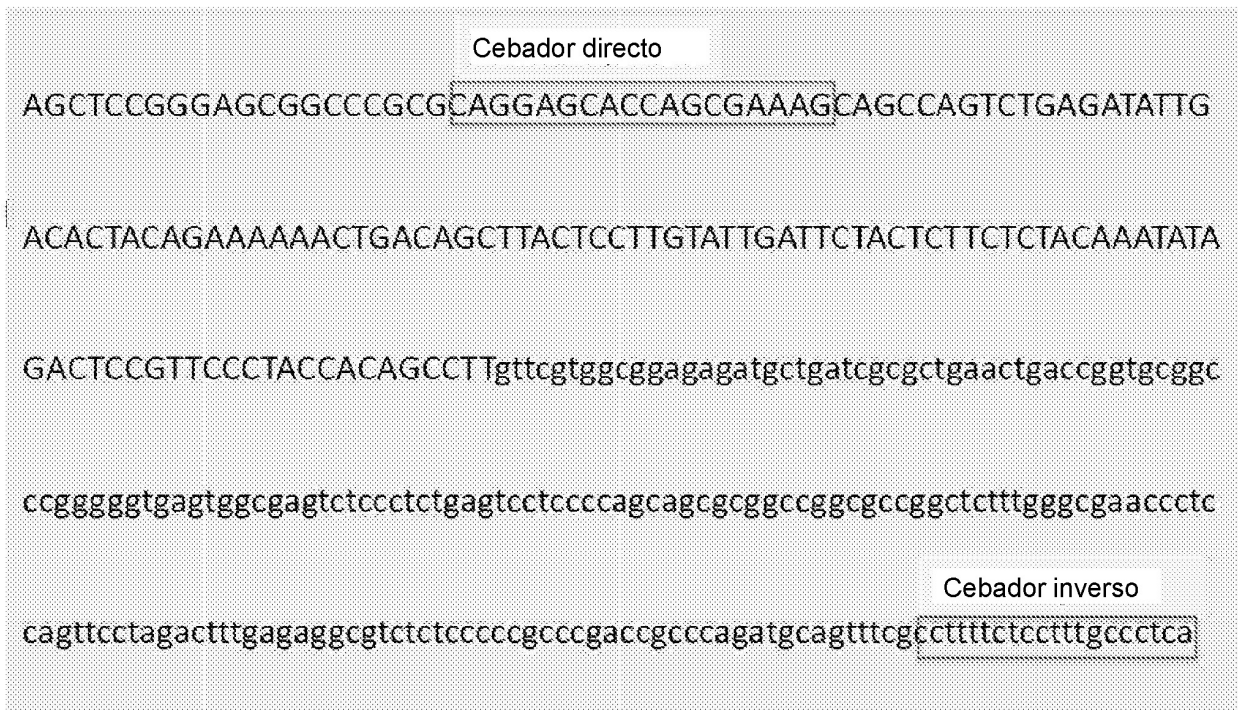


Figura 4

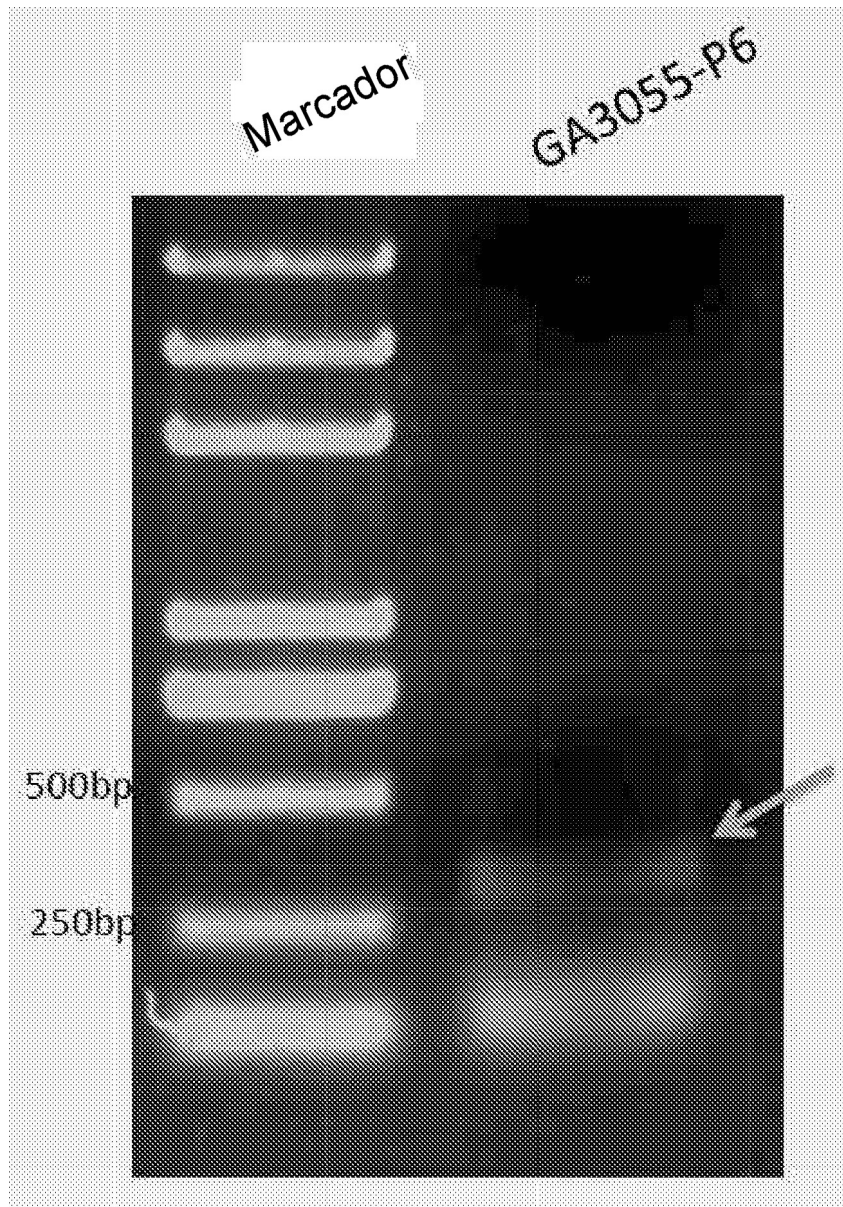


Figura 5

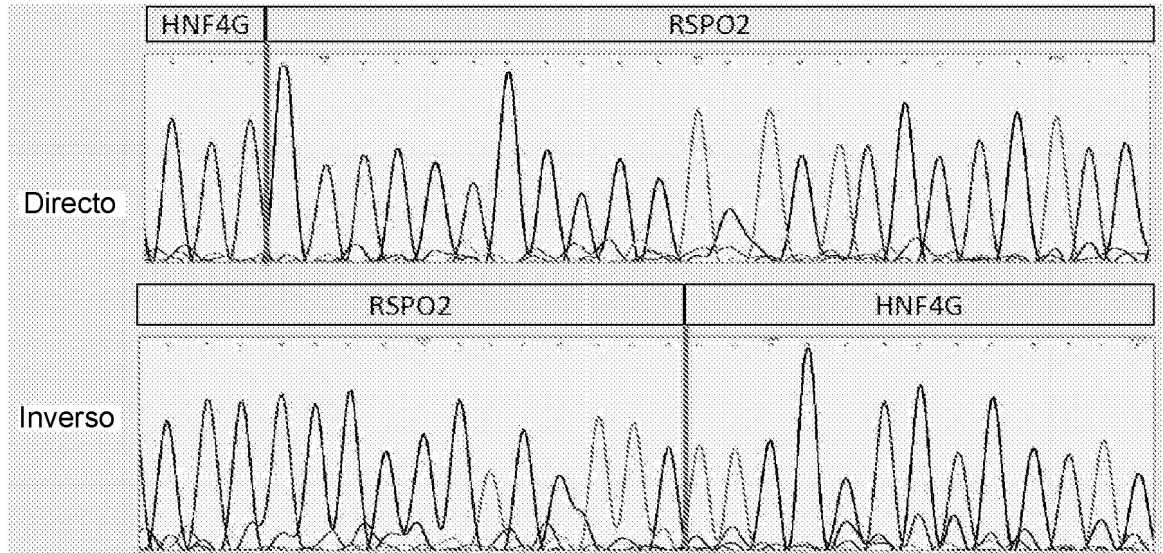


Figura 6