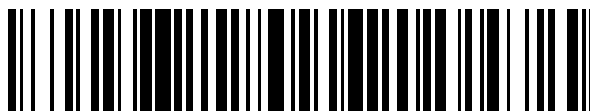


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 552**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2016 PCT/JP2016/074440**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17033905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2016 E 16839252 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3342862**

54 Título: **Método para detectar el gen de fusión OCLN-ARHGAP26**

30 Prioridad:

24.08.2015 US 201562209095 P

24.12.2015 JP 2015250996

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

07.10.2020

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP y
NATIONAL CANCER CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:

SASAKI, HIROKI;
ICHIKAWA, HITOSHI;
ASAUMI, MAKOTO y
TSUNOYAMA, KAZUHISA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 785 552 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para detectar el gen de fusión OCLN-ARHGAP26

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar un gen de fusión nuevo.

10 Antecedentes de la técnica

El gen de ocludina (OCLN) existe en el brazo largo del cromosoma 5 humano, y una proteína codificada por este gen es una proteína de cuatro transmembranas. OCLN forma un complejo con una proteína de la familia de las claudinas que es también una proteína de cuatro transmembranas y constituye una unión estrecha (J Cell Biol. 1998; 143(2): 391-401) y potencia la resistencia eléctrica entre células mediante sobreexpresión de OCLN en células (J Cell Sci. 1996; 109: 2287-2298). Como tal, se considera que OCLN mantiene un papel en la función de barrera de la unión estrecha. Con respecto al cáncer, se notifica que la sobreexpresión de OCLN en células potencia la señal de apoptosis y suprime el potencial metastásico (Cancer Res. 2006; 66(18): 9125-9133).

El gen de la proteína 26 activadora de Rho GTPasa (ARHGAP26), que tiene función activadora GTPasa existe en el brazo largo del cromosoma 5 humano, igual que OCLN, y la proteína codificada por este gen es una proteína activadora de GTPasa que posee un dominio Rho-GAP en el centro. El gen de ARHGAP26 se sabe que tiene una función para potenciar la actividad GTP hidrolasa de la pequeña familia de proteínas de GTPasa, particularmente RhoA y CDC42 (J Biol Chem. 2000; 275(49): 38605-38610.). Con respecto al cáncer, se encontró un gen de fusión con claudina 18 (CLDN18) en del 3 al 15% de pacientes que padecían cáncer gástrico de tipo difuso (Nature 2014; 513(7517): 202-209, Cell Rep. 2015; 12(2): 272-285), y se encontró un gen de fusión con un gen de leucemia de linaje mixto (MLL) en pacientes con leucemia (Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(16): 9168-9173., Genes Chromosomes Cancer 2004; 41(4): 400-404).

No hay informes hasta ahora de un gen de fusión que se compone de OCLN y ARHGAP26.

30 Sumario de invención

Problema que va a resolverse mediante la invención

La presente invención pretende elucidar un polinucleótido como gen nuevo responsable de cáncer, y de ese modo proporcionar un método para detectar un polinucleótido o un polipéptido que está codificado por el polinucleótido, así como un conjunto de cebadores o un kit de detección para tal detección.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores aislaron e identificaron un gen de fusión nuevo a partir de una línea celular de cáncer de estómago, en la que una parte del gen de ARHGAP26 y una parte del gen de OCLN se fusionan juntas (ejemplo 1), y se encuentra que este gen de fusión era el gen causal de cáncer por el hecho de que la viabilidad de la línea celular de cáncer de estómago disminuyó con la supresión de la expresión de genes de fusión en la línea celular de cáncer de estómago que expresa de manera endógena tales genes de fusión (ejemplo 2, ejemplo 4). Los presentes inventores construyeron un método de detección de un gen de fusión basándose en estos hallazgos, y proporcionaron conjuntos de cebadores para tal fin, usar de ese modo la detección de tal gen de fusión hizo posible seleccionar pacientes con cáncer (particularmente, pacientes con cáncer de estómago) que dieron positivo para un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 (ejemplo 3).

En otras palabras, la presente invención se refiere a [1] a [24] mostrados a continuación.

[1] Un método para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de ocludina (OCLN) y un gen de la proteína 26 activadora de Rho GTPasa (ARHGAP26), en el que el método comprende una etapa de detectar si un polinucleótido que codifica para un polipéptido descrito o bien por (1) o bien (2) mostrado a continuación existe en una muestra obtenida de un sujeto:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2;

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos.

[2] El método según [1], en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y tiene la capacidad de

desarrollar un tumor.

[3] El método según [1], en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y tiene la capacidad de desarrollar un tumor, o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos, y tiene la capacidad de desarrollar un tumor.

[4] El método según [1], en el que el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

[5] Un método para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que comprende una etapa de detectar si un polinucleótido que codifica para un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 existe en una muestra obtenida de un sujeto.

[6] El método según uno cualquiera de [1] a [5] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN, y un gen de ARHGAP26 existe, cuando se detecta un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

[7] El método según uno cualquiera de [1] a [6], que comprende además una etapa de amplificar un ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto, o una etapa de hibridar una sonda con un ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto para detectar un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

[8] El método según [7] que comprende una etapa de amplificar el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto usando un conjunto de cebadores mostrado a continuación:

un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, en el que el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con un polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

[9] El método según [8], en el que el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria de un polinucleótido que consiste en las bases n.º 1 a 891 de SEQ ID NO: 1, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con un polinucleótido que consiste en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1.

[10] El método según uno cualquiera de [7] a [9] que comprende una etapa de amplificar el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto usando un conjunto de cebadores mostrado a continuación:

un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, en el que un cebador sentido consiste en un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y un cebador antisentido consiste en un oligonucleótido complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.

[11] El método según uno cualquiera de [7] a [10] que comprende además una etapa de detectar si se obtuvo un fragmento amplificado de ácido nucleico de un tamaño objetivo.

[12] El método según [11] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando se obtiene un fragmento amplificado de ácido nucleico de un tamaño objetivo.

[13] El método según uno cualquiera de [7] a [10] que comprende además una etapa de determinar una secuencia de bases de un fragmento amplificado de ácido nucleico.

[14] El método según [13] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando un fragmento amplificado de ácido nucleico incluye una secuencia de bases de una sección que codifica para OCLN y una secuencia de bases de una sección que codifica para ARHGAP26 en un mismo fragmento.

[15] El método según [7] que comprende una etapa de hibridar una sonda con el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto, en el que la sonda comprende un oligonucleótido que se hibrida con el polinucleótido en una condición rigurosa.

[16] El método según [15] que comprende una etapa de realizar hibridación *in situ* usando una muestra obtenida de un sujeto, una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN del polinucleótido, y una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido.

5 [17] El método según [16] que usa múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para OCLN, y múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para ARHGAP26.

10 [18] El método según [7], [16] o [17] que usa múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que comprenden un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que comprenden un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1, en una etapa de hibridar una sonda con el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto.

15 [19] El método según uno cualquiera de [16] a [18] que comprende además una etapa de amplificar señales de hibridación.

20 [20] El método según uno cualquiera de [16] a [19] que comprende además una etapa de detectar un solapamiento de señales de una señal de una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN y una señal de una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26.

25 [21] El método según [20] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando se detectan dos señales en una misma posición.

[22] El método según uno cualquiera de [1] a [21] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

[23] El método según uno cualquiera de [1] a [22], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

30 [24] El método según [23], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [25] a [27] mostrados a continuación.

35 [25] Un método para detectar si existe cáncer en un sujeto que comprende la etapa según uno cualquiera de [1] a [21].

[26] El método según [25] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

40 [27] El método según [25] o [26], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [28] a [32] mostrados a continuación.

[28] El método para diagnosticar cáncer en un sujeto que comprende una etapa según uno cualquiera de [1] a [21].

45 [29] El método según [28] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

50 [30] El método según [28] o [29] que comprende además una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que un sujeto tenga cáncer, cuando un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

[31] El método según [28] o [29], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

55 [32] El método según [29] que comprende además una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que un sujeto tenga cáncer de estómago, cuando un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida de un sujeto.

Además, la presente invención se refiere a [33] a [36] mostrados a continuación.

60 [33] Un método para identificar un sujeto que es un candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de la función de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico para bloquear una señal anómala inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, que comprende una etapa según uno cualquiera de [1] a [21], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

[34] El método según [33] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

65 [35] El método según [33] o [34] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un sujeto es un

candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico para bloquear una señal anómala inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, cuando un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

[36] El método según uno cualquiera de [33] o [35], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [37] a [42] mostrados a continuación.

[37] Un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, en el que el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con el polinucleótido según uno cualquiera de [1] a [5], y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria del polinucleótido.

[38] El conjunto de cebadores según [37], en el que el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria de un polinucleótido que consiste en las bases n.º 1 a 891 de SEQ ID NO: 1, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con un polinucleótido que consiste en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1.

[39] Un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN o un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido según uno cualquiera de [1] a [5].

[40] El conjunto de cebadores según uno cualquiera de [37] a [39], en el que el cebador sentido consiste en un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.

[41] El conjunto de cebadores según uno cualquiera de [37] a [40], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

[42] El conjunto de cebadores según [41], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [43] a [48] mostrados a continuación.

[43] Una sonda para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo la sonda un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con el polinucleótido según uno cualquiera de [1] a [5].

[44] El conjunto de sondas que comprende múltiples sondas según [43], comprendiendo el conjunto de sondas una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN y una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido según uno cualquiera de [1] a [5].

[45] El conjunto de sondas según [44] que comprende múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para OCLN y múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para ARHGAP26.

[46] El conjunto de sondas según [44] o [45] que comprende múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que comprenden un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1 y múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que comprenden un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre las bases n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.

[47] La sonda o un conjunto de sondas según uno cualquiera de [43] a [46], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

[48] La sonda o el conjunto de sondas según [47], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente divulgación se refiere a [49] a [53] mostrados a continuación.

[49] Un kit de detección para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida del sujeto, comprendiendo el conjunto de detección un conjunto de cebadores según uno cualquiera de [37] a [40].

[50] Un kit de detección para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el kit de detección una sonda o un conjunto de sondas según uno cualquiera de [43] a [46].

5 [51] El kit de detección según [50] que comprende además un reactivo para amplificar una señal de hibridación.

[52] El kit de detección según uno cualquiera de [49] a [51], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

10 [53] El kit de detección según [52], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [54] a [63] mostrados a continuación.

[54] Un método de detección de una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 que comprende una etapa de detectar si un polipéptido según o bien (1) o bien (2) existe en una muestra obtenida de un sujeto:

15 (1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2;

20 (2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos.

25 [55] El método según [54], en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y tiene la capacidad de desarrollar un tumor.

30 [56] El método según [54], en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y tiene la capacidad de desarrollar un tumor, o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en la que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos, y tiene la capacidad de desarrollar un tumor.

[57] El método según [54], en el que el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

35 [58] Un método de detección de una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 que comprende una etapa de detectar si un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 existe en una muestra obtenida de un sujeto.

40 [59] El método según uno cualquiera de [54] a [58], en el que la etapa para detectar si el polipéptido existe comprende una etapa de poner un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de OCLN en el polipéptido y un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de ARHGAP26 en el polipéptido en contacto con una muestra obtenida de un sujeto.

45 [60] El método según [59] que comprende además las etapas de i) a v) descritas a continuación:

50 i) una etapa de añadir anticuerpos secundarios que se conectan a oligonucleótidos y que se unen respectivamente con anticuerpos primarios; ii) una etapa de añadir una disolución de ligamiento que contiene dos tipos de oligonucleótidos que son parcialmente complementarios a oligonucleótidos conectados a los anticuerpos secundarios y una ligasa que puede ligar los dos tipos de oligonucleótidos para formar una estructura circular cuando los oligonucleótidos se aproximan entre sí, induciendo de ese modo una reacción de ligamiento; iii) una etapa de elongar un ácido nucleico a lo largo de una estructura circular que se forma; y iv) una etapa de hibridar una sonda oligonucleotídica marcada que puede hibridarse con un ácido nucleico elongado, y v) una etapa de detectar una señal marcada.

55 [61] El método según uno cualquiera de [54] a [60] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

[62] El método según uno cualquiera de [54] a [61], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

60 [63] El método según [62], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [64] a [66] mostrados a continuación.

[64] Un método para detectar si existe cáncer en un sujeto que comprende la etapa según uno cualquiera de [54] a [60].

65 [65] El método según [64] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

[66] El método según [64] o [65], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente invención se refiere a [67] a [71] mostrados a continuación.

[67] Un método para diagnosticar cáncer en un sujeto que comprende una etapa según uno cualquiera de [54] a [60].

[68] El método según [67] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

[69] El método según [67] o [68] que comprende además una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que un sujeto tenga cáncer, cuando una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

[70] El método según [67] o [68], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

[71] El método según [68] que comprende además una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que un sujeto tenga cáncer de estómago, cuando una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

Además, la presente invención se refiere a [72] a [75] mostrados a continuación.

[72] Un método para identificar un sujeto que es un candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de la función de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico para bloquear una señal anómala inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, comprendiendo el método una etapa según uno cualquiera de [54] a [60], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

[73] El método según [72] que comprende una etapa de obtener una muestra de un sujeto.

[74] El método según [72] o [73] que comprende además una etapa en la que se evalúa que un sujeto es un candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico para bloquear una señal anómala inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, cuando una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

[75] El método según [72] o [74], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente divulgación se refiere a [76] a [79] mostrados a continuación.

[76] Un kit de detección para detectar una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el kit de detección un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de OCLN en el polipéptido según uno cualquiera de [54] a [58], y un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de ARHGAP26 en dicho polipéptido.

[77] El kit de detección según [76] que comprende anticuerpos secundarios que se conectan a oligonucleótidos y que se unen respectivamente con anticuerpos primarios, dos tipos de oligonucleótidos que son parcialmente complementarios a los oligonucleótidos conectados a los anticuerpos secundarios, una ligasa que puede ligar los dos tipos de oligonucleótidos para formar una estructura circular cuando los oligonucleótidos se aproximan entre sí, y una sonda oligonucleotídica marcada.

[78] El kit de detección según [76] o [77], en el que el sujeto es un paciente con cáncer.

[79] El kit de detección según [78], en el que el cáncer es cáncer de estómago.

Además, la presente divulgación se refiere a [80] a [81] mostrados a continuación.

[80] Un polipéptido según uno cualquiera de (1) a (3) mostrados a continuación o un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2;

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos;

(3) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

[81] El polipéptido o un polinucleótido que codifica para dicho polipéptido según [80] que tiene la capacidad de desarrollar un tumor.

Efecto ventajoso de la invención

El método de detección de la presente invención puede usarse como método para detectar cáncer (particularmente, cáncer de estómago) que da positivo para un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 (a continuación en el presente documento denominado gen de fusión OCLN-ARHGAP26). El conjunto de cebadores, sonda, conjunto de sondas y kit de detección de la presente divulgación pueden usarse en un método de detección de la presente divulgación.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra el resultado de la inmunotransferencia de tipo Western. Muestra el cambio en la cantidad de expresión de proteína de la proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 mediante el tratamiento con ARNip de ARHGAP26.

[Figura 2] La figura 2 muestra el cambio en el número de células viables en la línea celular de cáncer de estómago provocado por el tratamiento con ARNip de ARHGAP26. La figura 2 compara el número de células viables cultivadas en un suero bovino al 0,5% que contiene medio RPMI-1640 después de la introducción de ARNip con el del control.

[Figura 3] La figura 3 muestra un resultado de amplificación mediante PCR de una región que contiene un punto de fusión de un gen de fusión OCLN-ARHGAP26.

[Figura 4] La figura 4 muestra un cambio provocado por un tratamiento con ARNip de OCLN, y un tratamiento con ARNip de ARHGAP26 en el número de células viables en la línea celular de cáncer de estómago a lo largo del tiempo.

Descripción de las realizaciones

<<Método de detección de la presente invención>>

El método de detección de la presente invención incluye un método para detectar un gen de fusión, y un método para detectar una proteína de fusión codificada en el gen de fusión. El método para detectar un gen de fusión de la presente invención o el método para detectar una proteína de fusión de la presente invención incluye una etapa de detectar si un polinucleótido o polipéptido específico existe en una muestra obtenida de un sujeto.

Los artículos recogidos del sujeto (muestras separadas de un organismo vivo) se usan como muestra obtenida del sujeto, específicamente, cualquier célula, tejido o líquido corporal que se recogieron (sangre, moco oral, células tumorales circulantes, exosoma, etc.), muestras sometidas a biopsia (muestras del foco primario, células cancerosas en la disolución de lavado peritoneal, células cancerosas en ascitis, etc.), cuyas muestras sometidas a biopsia se prefieren. Es posible usar ADN de genoma extraídos de las muestras recogidas o usar productos de transcripción de los mismos (productos que se obtienen mediante transcripción y traducción de un genoma; por ejemplo, ARN, proteína) o ADNc preparado a partir de ARN. Se prefiere usar ARN o ADNc que se habían formulado. También es posible usar una muestra estabilizada fijada en formalina e incrustada en parafina (muestra fijada en formalina – incrustada en parafina; muestra FFPE). También puede usarse una muestra FFPE cortada en una fina porción de FFPE. Un uso de una porción de FFPE permite una detección directa de un polinucleótido que existe en el corte.

El método para detectar un gen de fusión en la presente invención es un método para detectar “un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26”, en el que el gen de fusión es un gen de fusión que comprende una parte de un gen de OCLN y una parte de un gen de ARHGAP26. Un gen de fusión a modo de ejemplo que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 incluye un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1. El polinucleótido que consiste en una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1 es un polinucleótido con una secuencia de bases de base n.º 207 (correspondiente al extremo 5' terminal de la secuencia codificante (a continuación en el presente documento denominada CDS)) a 1097 de un gen de OCLN (n.º de registro de GenBank: NM_001205254.1) y de base n.º 1143 a 2315 (correspondiente al extremo 3' de CDS) de un gen de ARHGAP26 (n.º de registro de GenBank: NM_001135608.1), en el que la timina en la base n.º 1280 se sustituye con guanina, y la citosina en la base n.º 2225 se sustituye con timina. De la secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1, la secuencia de base n.º 1 a 891 se deriva de un gen de OCLN, y la secuencia de base n.º 892 a 2064 se deriva de un gen de ARHGAP26. El polinucleótido que consiste en una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1 también se denomina “polinucleótido de fusión”. La secuencia de aminoácidos codificada en las bases n.º 1 a 2064 de SEQ ID NO: 1 se muestra en SEQ ID NO: 2.

En la “etapa de detectar si existe un polinucleótido” en el método de detección de un gen de fusión de la presente invención, el polinucleótido que es la diana de detección (denominado en la presente memoria descriptiva

“polinucleótido seleccionado como diana en la detección”) incluye, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un polipéptido descrito en (1) o (2) mostrados a continuación:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2;

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, y tiene una capacidad de desarrollar un tumor.

En el polipéptido mencionado anteriormente, la “identidad con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2” es preferiblemente del 95% o mayor, y más preferiblemente del 98% o mayor.

Obsérvese que la “identidad” tal como se usa en la presente memoria descriptiva es un valor de “identidad” obtenido usando un parámetro preparado por defecto mediante la búsqueda con el programa NEEDLE (J Mol Biol 1970; 48: 443-453). El parámetro mencionado anteriormente se muestra a continuación.

Penalización de hueco = 10

Penalización de extensión = 0,5

Matriz = EBLOSUM62

Si un polipéptido “tiene una capacidad de desarrollar un tumor” o no, puede confirmarse mediante un método mostrado a continuación en el ejemplo 2. Un método específico es introducir ARNip que suprime la expresión de un polinucleótido que codifica para el polipéptido en una célula que expresa el polipéptido (línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA), y verificar que la viabilidad de la célula disminuye.

En una realización de la presente invención, el polinucleótido seleccionado como diana en la detección es un polinucleótido que codifica para un polipéptido según uno cualquiera de (1) a (4) mostrados a continuación:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos;

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos, y tiene la capacidad de desarrollar un tumor;

(3) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y tiene la capacidad de desarrollar un tumor; y

(4) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

En el polipéptido de (1) y (2), el número de aminoácidos que se había delecionado, sustituido, insertado y/o añadido en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 es preferiblemente de uno a unos pocos, más preferiblemente de 1 a 7, e incluso más preferiblemente de 1 a 5.

Un ejemplo de un polinucleótido que codifica para “un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2” incluye “un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1”.

El método para detectar un gen de fusión de la presente invención puede comprender una etapa en la que se evalúa si el polinucleótido seleccionado como diana en la detección existe mediante si el polinucleótido se detectó.

El método para detectar un gen de fusión de la presente invención puede comprender además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando se detecta un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

El método para detectar un gen de fusión de la presente invención puede comprender una etapa de amplificar el ácido nucleico existente en la muestra obtenida de un sujeto o una etapa de hibridar una sonda con el ácido nucleico existente en la muestra obtenida de un sujeto para detectar el polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

El ácido nucleico para su uso puede ser un ADN, ARN o ADNc de genoma preparado a partir de ARN. Los métodos de extracción de ADN, extracción de ARN o preparación de ADNc de ARN se conoce comúnmente en el campo, y puede realizarse fácilmente usando un kit de extracción de ADN, kit de extracción de ARN o un kit de síntesis de

ADNc comercialmente disponibles.

La etapa de amplificar un ácido nucleico en la muestra obtenida de un sujeto puede realizarse mediante un método comúnmente conocido de amplificación de un ácido nucleico. Tal método incluye PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo PCR en tiempo real), LCR (reacción en cadena de la ligasa), SDA (amplificación de desplazamiento de cadena), NASBA (amplificación basada en secuencia de ácido nucleico), ICAN (amplificación iniciada por cebadores isotérmica y química de ácidos nucleicos), LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucles), TMA (amplificación mediada por transcripción, por ejemplo, sistema de TMA de Gen-Probe), y un método preferible es PCR.

Específicamente, el ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN o ADNc de genoma preparado a partir de ARN, etc.) en la muestra obtenida de un sujeto se somete a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos usando un conjunto de cebadores diseñado para amplificar específicamente un polinucleótido seleccionado como diana en la detección. El conjunto de cebadores que va a usarse no está particularmente limitado siempre que pueda amplificar específicamente un polinucleótido seleccionado como diana en la detección. Por ejemplo, un uso de un software de diseño de cebadores (por ejemplo Primer Express; Applied Biosystems) permite que un experto en la técnica diseñe fácilmente el conjunto de cebadores basándose en la secuencia de bases de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección. Más específicamente, un conjunto de cebadores incluye un cebador sentido (cebador 5') diseñado a partir de una sección que codifica para la OCLN de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección (por ejemplo, cualquier sección en una región del gen de OCLN del polinucleótido de fusión (particularmente, ADNc)) y un cebador antisentido (cebador 3') diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección (por ejemplo, cualquier sección en una región del gen de ARHGAP26 del polinucleótido de fusión (particularmente, ADNc)), y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido seleccionado como diana en la detección en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa), y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con una cadena complementaria de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa). De otro modo, o bien el cebador sentido o bien el cebador antisentido pueden diseñarse de manera que corresponde con la región que comprende el punto de fusión del polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

La "condición rigurosa" en la presente memoria descriptiva se refiere a una condición de hibridación de "5×SSPE, 5×disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, formaldehído al 50%, ADN de esperma de salmón 200 µg/ml, a 42°C durante la noche" y una condición de lavado de "0,5SSC, SDS al 0,1%, 42°C". "Una condición muy rigurosa" se refiere a una condición de hibridación de "5×SSPE, 5×disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, formaldehído al 50%, ADN de esperma de salmón 200 µg/ml, a 42°C durante la noche" y una condición de lavado de "0,2×SSC, SDS al 0,1%, 65°C".

El "punto de fusión" del polinucleótido seleccionado como diana en la detección en la presente memoria descriptiva es un punto en el que se fusionan juntas una sección derivada de un gen de OCLN y una sección derivada de un gen de ARHGAP26 en el polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y la "región que comprende el punto de fusión" en el polinucleótido seleccionado como diana en la detección es, por ejemplo, la región que comprende las bases de n.º de base 891 y 892 cuando el polinucleótido seleccionado como diana en la detección es un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases representada por SEQ ID NO: 1.

En una realización de la presente invención, el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con una cadena complementaria de un polinucleótido que consiste en las bases n.º 1 a 891 de SEQ ID NO: 1 en una condición rigurosa, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con un polinucleótido que consiste en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1 en una condición rigurosa.

En una realización de la presente invención, el cebador sentido consiste en al menos 16 bases consecutivas de un oligonucleótido entre las bases n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que es complementario con al menos 16 bases consecutivas de un oligonucleótido que consiste en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1.

En una etapa para amplificar ácido nucleico, el cebador sentido y el cebador antisentido debe establecerse preferiblemente de modo que el tamaño del fragmento del ácido nucleico que va a amplificarse sea de 1 kb o menos, dado que un gran tamaño del fragmento del ácido nucleico que va a amplificarse conduce a una escasa eficiencia de amplificación. Los cebadores que van a usarse tienen generalmente una longitud de cadena de al menos 15 bases, preferiblemente al menos 16 bases, más preferiblemente al menos 18 bases, incluso más preferiblemente al menos 20 bases. En una realización de la presente invención, el cebador tiene de 15 a 40 bases, preferiblemente de 16 a 24 bases, más preferiblemente de 18 a 24 bases, incluso más preferiblemente de 20 a 24 bases.

El cebador puede producirse mediante síntesis química sin limitarse particularmente a eso.

En una realización preferible, el método de detección de un gen de fusión de la presente invención abarca además una etapa de detectar si un fragmento amplificado de ácido nucleico de un tamaño deseado se obtuvo además de

una etapa de amplificar ácido nucleico en la muestra obtenida de un sujeto. La etapa de detectar si un fragmento amplificado de ácido nucleico de un tamaño deseado se obtuvo puede realizarse usando electroforesis. Al usar electroforesis, el fragmento de ácido nucleico puede analizarse mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar si los fragmentos amplificados de ácido nucleico se produjeron en el tamaño deseado usando tinte de bromuro de etidio, etc.

Además, al realizar un monitor de amplificación de PCR en el proceso de amplificación del gen (PCR en tiempo real) (Genome Res. 1996; 6(10): 986-994), es posible realizar un análisis cuantificado de fragmentos amplificados de ácido nucleico. Un posible candidato que va a usarse en el método de monitorización de amplificación de PCR es ABI PRISM7900 (Applied Biosystems).

Cuando se obtiene un fragmento amplificado de ácido nucleico del tamaño deseado, eso significa que un polinucleótido seleccionado como diana en la detección existía en la muestra obtenida de un sujeto. El método de detección de un gen de fusión de la presente invención puede incluir además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando se obtiene un fragmento amplificado de ácido nucleico del tamaño deseado se obtiene.

En una realización preferible distinta, el método de detección del gen de fusión de la presente invención abarca además una etapa de determinar la secuencia de bases del ácido nucleico amplificada además de una etapa de amplificar el ácido nucleico de la muestra obtenida de un sujeto. La etapa de determinar la secuencia de bases del fragmento de ácido nucleico puede usar métodos de secuenciación comúnmente conocidos en el campo de la técnica incluyendo métodos de secuenciación de la próxima generación (Nature Biotechnology 2008; 26: 1135-1145) (por ejemplo, HiSeq2500 (Illumina)), tal como la secuenciación Sanger (por ejemplo, puede usarse ABI PRISM3100 (Applied Biosystems)) o secuenciación mediante síntesis, etc.

La etapa de determinar la secuencia de bases del fragmento de ácido nucleico incluye no sólo una etapa de secuenciar la longitud completa de un fragmento de ácido nucleico, sino una etapa de secuenciar secuencias parciales correspondientes a ambos extremos del fragmento de ácido nucleico.

Cuando el fragmento secuenciado de ácido nucleico incluye una secuencia de bases de una sección que codifica para OCLN y una secuencia de bases de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido seleccionado como diana en la detección en el mismo fragmento, eso significa que el polinucleótido seleccionado como diana en la detección existía en la muestra obtenida de un sujeto. El método de detección del gen de fusión de la presente invención puede incluir además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando el fragmento amplificado de ácido nucleico incluye una secuencia de bases de una sección que codifica para OCLN y una secuencia de bases de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido seleccionado como diana en la detección en el mismo fragmento,.

La etapa de hibridar una sonda con un ácido nucleico en la muestra obtenida de un sujeto puede realizarse usando una sonda que incluye un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa) con un polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y usando un método de hibridación comúnmente conocido. Tales métodos incluyen, por ejemplo, hibridación de tipo Northern, método de transferencia puntual, método de microalineamiento de ADN, método de protección de ARN, hibridación *in situ*, etc. Un método que es preferible es la hibridación *in situ*. Puede realizarse detección usando la hibridación *in situ* mediante una hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación *in situ* cromogénica (CISH) o hibridación *in situ* con plata (SISH) comúnmente conocidas. La longitud de cadena de la sonda usada en la hibridación puede seleccionarse según sea necesario por un experto en la técnica según el método de hibridación que va a usarse, pero la sonda preferiblemente tiene una longitud de cadena de al menos 16 bases.

En una realización de la presente invención, la sonda usada en hibridación es un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa) con un polinucleótido seleccionado como diana en la detección, o una cadena complementaria del mismo, e incluye un oligonucleótido de al menos 16 bases en 5' y al menos 16 bases en 3' del punto de fusión en el polinucleótido seleccionado como diana en la detección (siendo un ejemplo específico una secuencia de base n.º 876 a 907 en SEQ ID NO: 1) o un oligonucleótido que es complementario a dicho oligonucleótido.

En una realización de la presente invención, la etapa de hibridar una sonda con un ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto puede realizarse según el método FISH de ARN comúnmente conocido (J. Mol. Diagn. 2012; 14(1): 22-29). Más específicamente, se realiza hibridación *in situ* usando una muestra obtenida de un sujeto (por ejemplo, fragmento de FFPE), una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN del polinucleótido seleccionado como diana en la detección (por ejemplo, cualquier sección en una región del gen de OCLN del polinucleótido de fusión), y una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido seleccionado como diana en la detección (por ejemplo, cualquier sección en una región del gen de ARHGAP26 del polinucleótido de fusión). Las sondas incluyen oligonucleótidos que se hibridan en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa) con el polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

En una realización de la presente invención, la hibridación *in situ* se realiza usando múltiples sondas de detección diseñadas a partir de una sección que codifica para OCLN y múltiples sondas de detección diseñadas a partir de una sección que codifica para ARHGAP26.

En una realización de la presente invención, la hibridación *in situ* se realiza usando las siguientes sondas:

múltiples tipos de pares de sondas adyacentes incluyendo oligonucleótidos que son complementarios a al menos 16 oligonucleótidos consecutivos aleatorios en las bases n.º 1 a 891 de SEQ ID NO: 1 (preferiblemente, de 10 a 25 tipos, más preferiblemente de 18 a 22 tipos, incluso más preferiblemente 20 tipos de pares de sondas), y múltiples tipos de pares de sondas adyacentes incluyendo oligonucleótidos que son complementarios a al menos 16 oligonucleótidos consecutivos aleatorios en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1 (preferiblemente, de 10 a 25 tipos, más preferiblemente de 18 a 22 tipos, incluso más preferiblemente 20 tipos de pares de sondas).

Los “pares de sondas adyacentes” en la presente memoria descriptiva consisten en dos tipos de sondas que están dispuestas una al lado de la otra cuando se hibridan con el polinucleótido seleccionado como diana en la detección. Las sondas incluyen un oligonucleótido que es complementario al polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y la longitud del oligonucleótido es generalmente de al menos 16 bases, preferiblemente de al menos 18 bases. En una realización de la presente invención, la longitud del oligonucleótido es de 16 a 30 bases, preferiblemente de 18 a 25 bases.

En una realización preferible de la presente invención, el método de detección del gen de fusión de la presente invención abarca además una etapa de amplificar una señal de hibridación además de una etapa de realizar hibridación *in situ*. Para realizar una etapa de amplificar una señal de hibridación, un reactivo que amplifica una señal de hibridación puede hibridarse con una sonda que se hibrida con un ácido nucleico contenido en la muestra.

Los reactivos que amplifican una señal de hibridación usada en hibridación *in situ* incluyen PreAmplifier Mix QT, Amplifier Mix QT, Label Probe Mix y Label Probe Diluent QF, que pueden obtenerse de Affymetrix.

En una realización más preferible, el método de detección del gen de fusión de la presente invención abarca además una etapa de detectar un solapamiento de señales entre una señal de una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN y una señal de una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26. Al separar el reactivo fluorescente o el reactivo de color que detecta una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN y una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, es posible observar si las señales de las dos sondas diferentes están en el mismo área (dentro de la misma molécula). Cuando se observa que las señales de las dos sondas diferentes están en la misma área (dentro de la misma molécula), eso significaría que el polinucleótido seleccionado como diana en la detección existía en la muestra obtenida de un sujeto. El método de detección del gen de fusión de la presente invención puede incluir además una etapa en la que se evalúa que un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 existe, cuando las dos señales están en la misma área (dentro de la misma molécula).

Las sondas no están particularmente limitadas, pero pueden producirse mediante un método de síntesis química.

El método de detección de la proteína de fusión de la presente invención es un método para detectar “una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26” y la proteína de fusión es una proteína de fusión codificada por el gen de fusión del gen de OCLN y el gen de ARHGAP26.

En la “etapa de detectar si existe el polipéptido” en el método de detección de la proteína de fusión de la presente invención, el polipéptido seleccionado como diana en la detección incluye un polipéptido que está codificado por un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.

El método de detección de la proteína de fusión de la presente invención puede abarcar una etapa en la que se evalúa si existe un polinucleótido mediante si se detecta el polipéptido seleccionado como diana en la detección.

El método de detección de la proteína de fusión de la presente invención puede abarcar además una etapa en la que se evalúa que una proteína de fusión de OCLN y ARHGAP26 existe cuando el polipéptido seleccionado como diana en la detección se detecta.

La etapa de detectar si existe un polipéptido puede realizarse preparando un lisado derivado de una muestra obtenida de un sujeto (por ejemplo, célula o tejido canceroso de un sujeto) y medir el polipéptido seleccionado como diana en la detección, contenido en la muestra mediante un método de medición inmunológica o un método de medición activa de enzimas, que combinan anticuerpos contra proteínas que constituyen la proteína de fusión, o un método de detección que combina estos métodos o mediante espectrometría de masas. Además, esta etapa puede realizarse mediante un método de detección usando una tecnología de tinción de tejido inmunológico realizada combinando el polipéptido seleccionado como diana en la detección incluido en la muestra (por ejemplo, fragmento de FFPE) obtenida de un sujeto, que se había sometido apropiadamente a tratamiento previo (tal como, retirada de

parafina), con los anticuerpos contra proteínas que constituyen la proteína de fusión. De otro modo, esta etapa puede realizarse intercambiando los anticuerpos contra proteínas que constituyen la proteína de fusión con anticuerpos que reconocen la sección de fusión de la proteína de fusión. Los enfoques a modo de ejemplos de estos métodos incluyen los siguientes métodos que usan anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido seleccionado como diana en la detección: medición de inmunización enzimática, método de ELISA en sándwich de anticuerpo doble, método de medición inmunológica fluorescente, método de medición radioinmunológica, inmunotransferencia de tipo Western, tinción inmunohistológica, un método de detección que combina precipitación inmunitaria y espectrometría de masas, etc.

La "sección de fusión" de la proteína de fusión de la presente memoria descriptiva se refiere a una sección en el polipéptido seleccionado como diana en la detección, en la que la sección derivada de un gen de OCLN y una sección derivada de un gen de ARHGAP26 se fusionan.

La detección usando una tecnología de tinción inmunohistológica puede realizarse según el ensayo de ligamiento de proximidad (Nat. Methods. 2006; 3(12): 995-1000). Más específicamente, si el polipéptido seleccionado como diana en la detección existe o no puede detectarse usando un anticuerpo que reconoce una sección derivada del gen de OCLN del polipéptido seleccionado como diana en la detección, y un anticuerpo que reconoce una sección derivada de un gen de ARHGAP26 de un polipéptido seleccionado como diana en la detección, y detectando que los dos anticuerpos reconocen la misma molécula mediante las tecnologías mencionadas anteriormente. Más específicamente, la detección puede realizarse mediante i) una etapa de poner un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de OCLN de polipéptido seleccionado como diana en la detección, y el anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de ARHGAP26 de polipéptido seleccionado como diana en la detección, en contacto con la muestra obtenida del sujeto; ii) una etapa de añadir anticuerpos secundarios que se conectan a oligonucleótidos, y se une a los respectivos anticuerpos primarios, iii) una etapa de inducir ligamiento añadiendo dos tipos de oligonucleótidos que son parcialmente complementarios a oligonucleótidos conectados a los anticuerpos secundarios, y una disolución de ligamiento que contiene ligasa que puede formar una estructura circular mediante ligamiento de los dos tipos de oligonucleótidos cuando se aproximan entre sí; iv) una etapa de elongar un ácido nucleico a lo largo de la estructura circular que se formó, v) una etapa de hibridar una sonda oligonucleotídica marcada que puede hibridarse con el ácido nucleico elongado; y vi) una etapa de detectar la señal de marcaje. Tal detección puede realizarse usando una sonda de PLA y reactivos incluidos en el kit de reactivos Duolink II o el kit de reactivos de campo brillante Duolink II (Olink).

En una realización de la presente invención, el método de detección de la presente invención abarca una etapa de obtener una muestra del sujeto.

En una realización de la presente invención, el sujeto del método de detección de la presente invención es un paciente con cáncer, y en una realización más específica, el cáncer es cáncer de estómago. El tipo de cáncer de estómago no está particularmente limitado, pero puede ser un tipo difuso, un tipo intestinal o un tipo mixto en la clasificación de Lauren. Además, sin limitarse a eso, el cáncer de estómago puede ser cualquiera de adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma escasamente diferenciado, carcinoma de células en anillo de sello o carcinoma mucinoso, etc.

En el método de detección de la presente invención, es posible evaluar que el sujeto tiene cáncer (particularmente, cáncer de estómago) cuando el polinucleótido seleccionado como diana en la detección, o el polipéptido seleccionado como diana en la detección se detecta en la muestra obtenida del sujeto.

La etapa de detección en el método de detección de la presente invención puede usarse como un método para detectar si existe cáncer (particularmente, cáncer de estómago) en un sujeto o un método para diagnosticar cáncer (particularmente, cáncer de estómago) en el sujeto. El método de diagnóstico de la presente invención puede incluir, además de la etapa de detección mencionada anteriormente, una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que el sujeto tenga cáncer (particularmente, cáncer de estómago), cuando el polinucleótido seleccionado como diana en la detección, o el polipéptido seleccionado como diana en la detección se detecta en la muestra obtenida del sujeto. Además, la etapa de detección puede usarse en un método para identificar un sujeto (un paciente con cáncer de estómago, etc.) que es un candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de la función de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico que bloquea la señal de anomalía inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26. El método de identificación de la presente invención puede incluir, además de la etapa de detección, una etapa en la que se evalúa que el sujeto es un candidato para recibir un tratamiento mediante un inhibidor de la función de ARHGAP26 y/o un agente farmacéutico que bloquea la señal de anomalía inducida por un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, cuando un polinucleótido se detecta en una muestra obtenida del sujeto.

((El conjunto de cebadores, sonda, conjunto de sondas y kit de detección de la presente divulgación))

La presente divulgación abarca un conjunto de cebadores, sonda, conjunto de sondas y un kit de detección usados en el método de detección de la presente divulgación.

El conjunto de cebadores de la presente invención incluye un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con el polinucleótido seleccionado como diana en la detección en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa), y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida con una cadena complementaria de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa).

En el conjunto de cebadores de la presente invención, o bien el cebador sentido o bien el cebador antisentido pueden diseñarse de modo que corresponde a una región en un polinucleótido seleccionado como diana en la detección que comprende un punto de fusión.

Una realización específica del conjunto de cebadores de la presente invención incluye el siguiente conjunto de cebadores:

un conjunto de cebadores que consisten en un cebador sentido que consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria de un polinucleótido que consiste en las bases n.º 1 a 891 de SEQ ID NO: 1 y un cebador antisentido que consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con un polinucleótido que consiste en las bases n.º 892 a 2064 de SEQ ID NO: 1.

Una realización más específica del conjunto de cebadores de la presente invención incluye el siguiente conjunto de cebadores:

un conjunto de cebadores que consisten en un cebador sentido que consiste en un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1 y un cebador antisentido que consiste en un oligonucleótido que es complementario con al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.

Es preferible que el conjunto de cebadores tenga un espacio de 1 kb o menos entre las posiciones seleccionadas del cebador sentido y el cebador antisentido, o un fragmento de ácido nucleico amplificado por el cebador sentido y el cebador antisentido con un tamaño de 1 kb o menos. Además, el cebador de la presente invención tiene normalmente una longitud de cadena de al menos 15 bases, preferiblemente al menos 16 bases, más preferiblemente al menos 18 bases, incluso más preferiblemente al menos 20 bases. En una realización de la presente invención, el cebador tiene una longitud de cadena de 15 a 40 bases, preferiblemente de 16 a 24 bases, más preferiblemente de 18 a 24 bases, e incluso más preferiblemente de 20 a 24 bases.

Los cebadores incluidos en el conjunto de cebadores de la presente invención, sin estar particularmente limitados, pueden producirse mediante un método de síntesis química.

Las sondas incluidas en la sonda de la presente invención y el conjunto de sondas de la presente invención incluyen un oligonucleótido que se hibrida con el polinucleótido seleccionado como diana en la detección en una condición rigurosa (preferiblemente, en una condición muy rigurosa). La longitud de cadena de las sondas incluidas en la sonda de la presente invención o el conjunto de sondas de la presente invención puede seleccionarse según sea necesario por un experto en la técnica según el método de hibridación aplicado, pero la sonda tiene preferiblemente una longitud de cadena de al menos 16 bases.

En una realización de la presente invención, la sonda de la presente invención incluye un oligonucleótido de al menos 16 bases en 5' y al menos 16 bases en 3' del punto de fusión en el polinucleótido seleccionado como diana en la detección (específicamente, la secuencia entre las bases n.º 876 a 907 de SEQ ID NO: 1) o un oligonucleótido que es complementario a la misma.

En una realización de la presente invención, el conjunto de sondas de la presente invención incluye una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para OCLN (por ejemplo, cualquier sección en la región del gen de OCLN del polinucleótido de fusión) y una sonda diseñada a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 (por ejemplo, cualquier sección en la región del gen de ARHGAP26 del polinucleótido de fusión).

En una realización de la presente invención, el conjunto de sondas de la presente invención incluye múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para OCLN y múltiples tipos de sondas diseñadas a partir de una sección que codifica para ARHGAP26.

En una realización de la presente invención, el conjunto de sondas de la presente invención incluye lo siguiente:

múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que incluyen un oligonucleótido que es complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1 (preferiblemente, de 10 a 25 tipos, más preferiblemente de 18 a 22 tipos, incluso más preferiblemente 20 tipos de pares de sonda), y múltiples tipos de pares de sondas adyacentes que incluyen un oligonucleótido que es complementario con un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 892 y 2064

de SEQ ID NO: 1 (preferiblemente, de 10 a 25 tipos, más preferiblemente de 18 a 22 tipos, incluso más preferiblemente 20 tipos de pares de sonda).

Las sondas del par de sondas incluyen un oligonucleótido que es complementario con el polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y la longitud del oligonucleótido es normalmente de al menos 16 bases, preferiblemente de al menos 18 bases. En una realización de la presente invención, la longitud del oligonucleótido es de 16 a 30 bases, preferiblemente de 18 a 25 bases.

La sonda de la presente invención y la sonda incluida en el conjunto de sondas de la presente invención, sin limitarse de ese modo, pueden producirse mediante síntesis química.

La presente divulgación abarca un kit de detección que incluye un conjunto de cebadores de la presente invención, una sonda de la presente invención o el conjunto de sondas de la presente invención. El kit de detección de la presente divulgación puede incluir además del conjunto de cebadores de la presente invención, la sonda de la presente invención o el conjunto de sondas de la presente invención, componentes que pueden usarse juntos con el conjunto de cebadores, la sonda o el conjunto de sondas para la detección de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección tal como reactivos para amplificar la señal de hibridación.

La presente divulgación también abarca un kit de detección para detectar un polipéptido seleccionado como diana en la detección. Preferiblemente, el kit de detección incluye un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de OCLN de polipéptido seleccionado como diana en la detección, y un anticuerpo (anticuerpo primario) que reconoce una sección derivada de un gen de ARHGAP26 de polipéptido seleccionado como diana en la detección. Más preferiblemente, la presente divulgación puede incluir anticuerpos secundarios conectados con oligonucleótidos que se unen respectivamente a anticuerpos primarios, dos tipos de oligonucleótidos que son parcialmente complementarios a los oligonucleótidos conectados a los anticuerpos secundarios, ligasa que forma una estructura circular mediante ligamiento de los dos tipos de oligonucleótidos cuando se aproximan entre sí y sondas oligonucleotídicas marcadas.

El conjunto de cebadores, sonda, conjunto de sondas y kit de detección de la presente divulgación pueden usarse para el método de detección, método de diagnóstico, método de identificación de un paciente y método de identificación de un sujeto de la presente invención. En una realización de la presente divulgación, con respecto al conjunto de cebadores, sonda, conjunto de sondas y kit de detección de la presente divulgación, el sujeto es un paciente con cáncer y más específicamente, el cáncer es cáncer de estómago. El cáncer de estómago no está particularmente limitado, pero puede ser un tipo difuso, un tipo intestinal o un tipo mixto en la clasificación de Lauren. Además, sin limitarse de ese modo, el cáncer de estómago puede ser cualquiera de adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma escasamente diferenciado, carcinoma de células en anillo de sello o carcinoma mucinoso.

Ejemplos

Los ejemplos pueden realizarse mediante métodos comúnmente conocidos a menos que se indique lo contrario. Cuando se usan kits o reactivos comercialmente disponibles, los ejemplos pueden realizarse según los manuales de los productos comerciales.

Ejemplo 1. Aislamiento del gen de fusión OCLN-ARHGAP26

Se preparó ARN total a partir de OKAJIMA, una línea celular de cáncer de estómago proporcionada por el Primer Departamento de Patología, Escuela Universitaria de Medicina de Hiroshima (actualmente, Departamento de Patología Molecular, Escuela de posgrado de Ciencias Biomédicas y de la Salud, Universidad de Hiroshima) y se sometió a transcripción inversa en ADNc con una transcriptasa inversa (SuperScriptIII; Life Technologies) y cebador Oligo(dT) (cebador Oligo(dT)20; Life Technologies) según el protocolo convencional del reactivo.

A continuación, se usaron cebadores de OCLN_full fwd21 representados por SEQ ID NO: 3 y ARHGAP26_full rev01 representados por SEQ ID NO: 4 para realizar PCR (10 s a 98°C, 15 s a 55°C y 3 min a 68°C, 30 ciclos, seguido por 5 min a 68°C) usando ADN polimerasa (PrimeSTAR GXL; TAKARA BIO INC.) con ADNc obtenido en la etapa anterior como molde. Luego, usando el producto de PCR mencionado anteriormente diluido 10 veces como molde, se usaron cebadores de OCLN_full fwd22 representados por SEQ ID NO: 5 y ARHGAP26_full rev02 representados por SEQ ID NO: 6 para realizar PCR (10 s a 98°C, 15 s a 55°C y 3 min a 68°C, 30 ciclos, seguido por 5 min a 68°C) usando la misma ADN polimerasa. Se realizó electroforesis después de la PCR para obtener un producto de PCR de aproximadamente 2 kbp. Después de añadir A al extremo 3' del producto de PCR usando Takara Taq (TAKARA BIO INC.), se clonó en un vector de clonación (kit de clonación de PCR TOPO XL; Life Technologies) y se secuenció mediante un método de secuenciación de dideoxilo (kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle; Life Technologies). Por consiguiente, se encontró que el producto de PCR que es de aproximadamente 2 kbp derivado de la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA era un producto de transcripción (SEQ ID NO: 1) en el que una secuencia de nucleótidos de base n.º 207 (correspondiente al extremo 5' de CDS) a 1097 de OCLN (NM_001205254.1) registrada en NCBI se fusiona con una secuencia de nucleótidos de base n.º 1143 a 2315 de

ARHGAP26 (NM_001135608.1) (correspondiente al extremo 3' terminal de CDS) con sustituciones de timina por guanina en la base n.º 1280 y citosina por timina en la base n.º 2225. La secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado en SEQ ID NO: 1 se representa por SEQ ID NO: 2.

5 Ejemplo 2. Evaluación de la capacidad de suprimir la expresión de proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 en una línea celular de cáncer de estómago que expresa el gen de fusión OCLN-ARHGAP26 usando ARNip de ARHGAP26 y evaluación de la viabilidad de la línea celular en la condición

10 Después de cultivar la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA que expresa el gen de fusión OCLN-ARHGAP26, tal como se muestra en el ejemplo 1 en medio RPMI-1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía suero bovino al 10% (Gibco), se introdujo ARNip en las células según el protocolo convencional del reactivo de transfección DharmaFECT1 (GE Healthcare). Específicamente, se sembraron las células cancerosas anteriores a 2×10^5 células por pocillo a una placa de 6 pocillos (140675, Nunc). Se añadieron 75 pmol de ARNip que selecciona como diana ARHGAP26 (s23013, Life Technologies) y ARNip de control (AM4611, Life Technologies) a las células (concentración final 75 nM), y se cultivaron las células a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂ durante 120 h (a continuación en el presente documento, el grupo en el que se transfectó ARNip de control se denomina grupo de ARNip de control, y el grupo en el que se transfecta ARNip que selecciona como diana ARHGAP26 se denomina grupo de ARNip de ARHGAP26).

20 Se evaluó el efecto supresor de la proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 mediante tratamiento con ARNip mediante el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Específicamente, se disolvieron las células cultivadas en tampón de muestra Laemmli (Bio-Rad) que contenía ditiotretol 350 mM (Fermentas) para extraer la proteína. Se midió la concentración de proteína mediante ensayo de cuantificación de proteínas (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Se cargó el extracto de proteínas en un gel de poliacrilamida al 8% o al 12% (Serva) que contenía SDS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) de modo que se cargaron 5 µg o 20 µg de proteína en cada carril y se realizó electroforesis en gel durante 1 h en una condición de 40 mA. Después de 80 min de transferencia a una membrana de PVDF (Millipore Corporation) en una condición de 60 mA usando TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad), se realizó bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente usando PBS que contenía agente de bloqueo de membrana al 5% (GE Healthcare) (a continuación en el presente documento denominado tampón de bloqueo). Se agitó la membrana en una disolución de anticuerpo primario de anticuerpo anti-ARHGAP26 (HPA035107, Sigma-Aldrich) diluido con un tampón de bloqueo a una proporción de 1:500 y anticuerpo anti-β-actina (4967, Cell Signaling Technology) diluido con un tampón de bloqueo a una proporción de 1:3000, y se incubó durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (a continuación en el presente documento denominado tampón de lavado), se agitó la membrana en una disolución de anticuerpo secundario de anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP (P0399, Daco) diluido con un tampón de bloqueo a una proporción de 1:3000, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con un tampón de lavado, se añadió Pierce Western blot Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific Inc.) a la membrana, y se detectó la quimioluminiscencia en una membrana usando LAS-4000R (Fuji Film). Como resultado de inmunotransferencia de tipo Western, se confirmó que la expresión de proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 se suprimió mediante el ARNip que selecciona como diana ARHGAP26 (figura 1).

A continuación, con el fin de evaluar el efecto del gen de fusión OCLN-ARHGAP26 sobre la viabilidad de las células cancerosas, se introdujeron ARNip que selecciona como diana ARHGAP26 y el ARNip de control en la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA en las mismas condiciones tal como se mostró anteriormente. Después de 24 h, se cambió el medio a un medio RPMI-1640 que contenía suero bovino al 0,5%, y se sembraron las células a 1×10^3 células por pocillo a una placa de 96 pocillos (167008, Nunc), a 100 µl cada una, de modo que se sembraron las células de cada grupo a 6 pocillos, y se cultivaron durante 48 h adicionales a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂. Se prepararon pocillos que contenían sólo medio RPMI-1640 que contenía suero bovino al 10% sin células como control (a continuación en el presente documento denominado grupo de medio). Se midió el número de células vivas según el protocolo convencional de Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES). Específicamente, se añadieron 10 µl del reactivo por pocillo y se cultivaron las células durante 4 h a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂ luego, el número de células vivas se determinó midiendo una absorbancia de 450 nm mediante un lector de microplacas (BioTek). Se adoptaron 4 pocillos en total excluyendo los valores de absorbancia máximos y mínimos de cada grupo. Se determinó la viabilidad del grupo de ARNip de control y el grupo de ARNip de ARHGAP26 restando la absorbancia del grupo de medio de la absorbancia de cada grupo (a continuación en el presente documento denominado valor de corrección), y estableciendo el valor de corrección del grupo de ARNip de control como el 100%. Se usó la prueba de la t de Student para la prueba de significación entre el grupo de ARNip de control y el grupo de ARNip de ARHGAP26. Se determinó la significación estadística cuando al valor p se le dio menos de 0,05.

60 Por consiguiente, la viabilidad de células disminuyó significativamente (figura 2) cuando el nivel de expresión de proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 se suprimió mediante la introducción de ARNip que selecciona como diana ARHGAP26 en la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA, que es una línea celular que expresa de manera endógena el gen de fusión OCLN-ARHGAP26. Por tanto, se encontró que suprimir la expresión del gen de fusión en células cancerosas que expresan de manera endógena el gen de fusión OCLN-ARHGAP26 inhibió el crecimiento de células cancerosas y/o disminuyó la supervivencia de esas células.

Por tanto, se encontró que el OCLN-ARHGAP26 definió la capacidad de avance del tumor de células cancerosas.

Ejemplo 3. Detección del gen de fusión OCLN-ARHGAP26

Se sometieron a transcripción inversa ARN total preparado a partir de las líneas celulares de cáncer de estómago KATO-III (JCRB0611, banco de células JCRB) y HSC-39 (proporcionada por el National Cancer Center Japan, Animal Experiment Section) y las líneas celulares de cáncer de estómago NSC-9C, NSC-6C y NSC-16C que se establecieron en el National Cancer Center Japan, Biomarker Search Section, además de la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA que expresa un gen de fusión OCLN-ARHGAP26 mostrada en el ejemplo 1, en ADNc usando transcriptasa inversa (SuperScriptIII; Life Technologies) y cebador oligo(dT) (cebador oligo(dT)20; Life Technologies).

A continuación, se usaron cebadores de OCLN-ARHGAP26_O5A12_partial fwd02 representados por SEQ ID NO: 7 y OCLN-ARHGAP26_O5A12_partial rev02 de SEQ ID NO: 8 para realizar PCR (2 min a 94°C, seguido por 15 s a 94°C, 15 s a 55°C y 1 min a 68°C, 30 ciclos) usando ADN polimerasa (AccuPrime Taq ADN polimerasa; Life Technologies) y ADNc obtenido antes como molde (200 ng cuando se convierte en ARN total). Asimismo, para confirmar la cantidad igual de ADNc molde en las reacciones, se usaron cebadores de ACTB_F2 representados por SEQ ID NO: 9 y ACTB_R2 representados por SEQ ID NO: 10 para realizar PCR (2 min a 94°C, seguido por 15 s a 94°C, 15 s a 55°C y 1 min a 68°C, 25 ciclos) usando la misma ADN polimerasa tal como antes. Se realizó electroforesis con gel de agarosa al 2% (Lonza) después de la reacción de PCR, y se amplificó un producto de PCR de aproximadamente 500 pb sólo en la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA que ya confirmó la expresión del gen de fusión OCLN-ARHGAP26 (figura 3). El producto de PCR amplificado por el conjunto de cebadores mencionado anteriormente tenía 511 pb según la secuencia de nucleótidos del gen de fusión identificado en el ejemplo 1. Por tanto, se mostró que es posible detectar el gen de fusión expresado en células cancerosas con el método de PCR.

Ejemplo 4. Evaluación de la viabilidad de línea celular de cáncer de estómago que expresa el gen de fusión OCLN-ARHGAP26 bajo la supresión de la expresión de la proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26

Se cultivó la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA que expresa gen de fusión OCLN-ARHGAP26 mostrado en el ejemplo 1 en medio RPMI-1640 que contiene suero bovino al 10%, luego se introdujo el ARNip diana según el protocolo convencional de un reactivo de transfección DharmaFECT1 (T2001-03, GE Healthcare). Específicamente, se sembraron las células cancerosas mencionadas anteriormente a 2×10^5 células por pocillo en una placa de 12 pocillos (3815-012, AGC TECHNO GLASS Co., Ltd.), luego se añadieron dos ARNip que seleccionan como diana OCLN (Ambion s9814 y s458015 (ambos de Life Technologies)) y tres ARNip que seleccionan como diana ARHGAP26 (Ambion s23013, s23015 (ambos de Life Technologies) y SI03077690 (Qiagen)) a las células a 75 pmol cada uno (concentración final 75 nM), y se cultivaron durante 72 h a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂. Al mismo tiempo, se añadió de manera similar ARNip de control AllStars Negative (1027280, Qiagen) a las células como control negativo y ARNip (SI02653770, Qiagen) que selecciona como diana KIF11 se añadió de manera similar a las células como control positivo de apoptosis, y se cultivaron las células durante 72 h a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂. Entre los ARNip que seleccionan como diana ARHGAP26, se esperó que s23015 sólo seleccionase como diana ARHGAP26 de tipo natural y no OCLN-ARHGAP26 basándose en su secuencia.

Se evaluó la actividad supresora de ARNip frente a la expresión de la proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 mediante inmunotransferencia de tipo Western. Específicamente, se disolvieron las células cultivadas en el tampón de lisis celular (9803, Cell Signaling Technology, Japón) de una concentración $1 \times$ que comprende un cóctel inhibidor de proteasa (25955-11, Nacalai) y un cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa Halt (78441, Thermo Fisher Scientific) cada uno a una cantidad de 1/100 para extraer la proteína. Se midió la concentración de proteína mediante el kit de ensayo de proteína BCA (23227, Thermo Fisher Scientific). Se cargó el extracto de proteínas en un gel Bis-Tris al 4-12% NuPAGE Novex (NP0322BOX, Thermo Fisher Scientific) de modo que habría 4 µg de extracto de proteína diana por carril, y se realizó electroforesis en gel durante 40 min en una condición de 180 V, seguido por transferencia a una membrana de PVDF (162-0176, Bio-Rad) en una condición de 120 min, 190 mA usando un dispositivo de transferencia de doble tampón mini (BE-351W, Biocraft). Luego, se bloqueó la membrana con reactivo de bloqueo PVDF para Can Get Signal (NYPBR01, TOYOBO) durante 1 h a temperatura ambiente. Se agitó la membrana en una disolución de anticuerpo primario de anticuerpo anti-ARHGAP26 (HPA035107, Atlas Antibodies) y anticuerpo anti-β-actina (4967S, Cell Signaling Technology) respectivamente diluido con disolución 1 potenciadora de inmunorreacción Can Get Signal (NKB-201, TOYOBO) a una proporción de 1:1.000, y se hizo reaccionar durante la noche a 4°C. Después de lavar con disolución de tampón Tris que contenía Tween 20 al 0,2% (a continuación en el presente documento denominado tampón de lavado), se agitó la membrana en una disolución de anticuerpo secundario de anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con HRP (NA9340, GE Healthcare) diluido con disolución 2 potenciadora de inmunorreacción Can Get Signal (NKB-301, TOYOBO) a una proporción de 1:10.000, y se hizo reaccionar durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con un tampón de lavado, se añadió el reactivo de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Prime (RPN2232, GE Healthcare) a la membrana y se detectó la señal de quimioluminiscencia de la membrana usando LAS-4010 (GE Healthcare). Como resultado del experimento de inmunotransferencia de tipo Western, se confirmó que la expresión de proteína de fusión de OCLN-

ARHGAP26 se suprimió mediante dos ARNip de OCLN y dos ARNip de ARHGAP26, distintos de s23015.

Para evaluar el impacto del gen de fusión OCLN-ARHGAP26 sobre la viabilidad de las células cancerosas, se realizó transfección de ARNip que seleccionaban como diana OCLN, ARHGAP26 y el ARNip de control a la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA en la misma condición tal como se mencionó anteriormente. Después de 24 h, se cambió el medio a medio RPMI-1640 que contenía suero bovino al 10%, y se sembraron las células a 1×10^3 células por pocillo a una placa de 96 pocillos (3860-096, AGC TECHNO GLASS Co., Ltd.), a 100 μ l cada una, de modo que cada grupo se sembró en 3 pocillos, y pocillos a los que se añadió sólo medio RPMI-1640 que contenía suero bovino al 10% sin ninguna célula sembrada en los mismos (a continuación en el presente documento denominados grupo de medio), y se sometieron las células a cultivo adicional a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂ durante 48 h (a continuación en el presente documento denominado día 3) y 120 h (a continuación en el presente documento denominado día 6). Además, como control para la normalización, se prepararon placas en las que las células sólo se siembran y no se cultivan (en el presente documento después del día 1). Se determinó el número de células vivas según el protocolo convencional del ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titer Glo (G7571, Promega Corp.) en el punto de tiempo dado anteriormente. Específicamente, se añadieron 100 μ l de un reactivo por pocillo y se incubaron las células durante 10 min a temperatura ambiente, luego, se determinó el número de células vivas midiendo la luminiscencia mediante un lector de microplacas Infinite M1000 (Deccan). La viabilidad del grupo celular tratado con ARNip de cada punto de tiempo se obtuvo restando la luminiscencia del grupo de medio de la luminiscencia de cada grupo (a continuación en el presente documento denominado valor de corrección), y estableciendo el valor de corrección del grupo tratado con ARNip en el día 1 como el 100%.

Por consiguiente, la viabilidad de las células disminuyó significativamente (figura 4) mediante la transfección de ARNip que seleccionaba como diana un gen de fusión para suprimir la expresión de la proteína de fusión de OCLN-ARHGAP26 en la línea celular de cáncer de estómago OKAJIMA, que es una línea celular que expresa de manera endógena el gen de fusión de OCLN-ARHGAP26 (figura 4). Por tanto, se encontró que suprimir la expresión del gen de fusión en células cancerosas que expresan de manera endógena el gen de fusión OCLN-ARHGAP26 inhibió el crecimiento de células cancerosas y/o disminuyó la supervivencia de esas células.

Por tanto, se mostró que OCLN-ARHGAP26 está implicado en la capacidad de la célula cancerosa de diseminar un tumor.

Aplicabilidad industrial

El método de detección de la presente invención es un método para detectar un gen de fusión que se compone del gen de OCLN y el gen de ARHGAP26, y es útil como un método para detectar y diagnosticar cáncer en un sujeto. Además, el conjunto de cebadores y el kit de detección de la presente divulgación pueden usarse en un método de la presente divulgación.

Lista de secuencias

<110> Astellas Pharma Inc.
National Cancer Center

<120> Un método para detectar el gen OCLN-ARHGAP26

<130> A16018A00

<150> Documento US62/209095

<151> 24-08-2015

<150> Documento JP2015-250996

<151> 24-12-2015

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2064

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2064)

ES 2 785 552 T3

```

<400> 1
atg tca tcc agg cct ctt gaa agt cca cct cct tac agg cct gat gaa      48
Met Ser Ser Arg Pro Leu Glu Ser Pro Pro Pro Tyr Arg Pro Asp Glu
1          5          10          15

ttc aaa ccg aat cat tat gca cca agc aat gac ata tat ggt gga gag      96
Phe Lys Pro Asn His Tyr Ala Pro Ser Asn Asp Ile Tyr Gly Gly Glu
          20          25          30

atg cat gtt cga cca atg ctc tct cag cca gcc tac tct ttt tac cca      144
Met His Val Arg Pro Met Leu Ser Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Tyr Pro
          35          40          45

gaa gat gaa att ctt cac ttc tac aaa tgg acc tct cct cca gga gtg      192
Glu Asp Glu Ile Leu His Phe Tyr Lys Trp Thr Ser Pro Pro Gly Val
50          55          60

att cgg atc ctg tct atg ctc att att gtg atg tgc att gcc atc ttt      240
Ile Arg Ile Leu Ser Met Leu Ile Ile Val Met Cys Ile Ala Ile Phe
65          70          75          80

gcc tgt gtg gcc tcc acg ctt gcc tgg gac aga ggc tat gga act tcc      288
Ala Cys Val Ala Ser Thr Leu Ala Trp Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Ser
          85          90          95

ctt tta gga ggt agt gta ggc tac cct tat gga gga agt ggc ttt ggt      336
Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Phe Gly
          100          105          110

agc tac gga agt ggc tat ggc tat ggc tat ggt tat ggc tat ggc tac      384
Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr
          115          120          125

gga ggc tat aca gac cca aga gca gca aag ggc ttc atg ttg gcc atg      432

```

ES 2 785 552 T3

Gly	Gly	Tyr	Thr	Asp	Pro	Arg	Ala	Ala	Lys	Gly	Phe	Met	Leu	Ala	Met	
130						135					140					
gct	gcc	ttt	tgt	ttc	att	gcc	gcg	ttg	gtg	atc	ttt	gtt	acc	agt	gtt	480
Ala	Ala	Phe	Cys	Phe	Ile	Ala	Ala	Leu	Val	Ile	Phe	Val	Thr	Ser	Val	
145					150					155					160	
ata	aga	tct	gaa	atg	tcc	aga	aca	aga	aga	tac	tac	tta	agt	gtg	ata	528
Ile	Arg	Ser	Glu	Met	Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Val	Ile	
				165					170					175		
ata	gtg	agt	gct	atc	ctg	ggc	atc	atg	gtg	ttt	att	gcc	aca	att	gtc	576
Ile	Val	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Met	Val	Phe	Ile	Ala	Thr	Ile	Val	
			180					185					190			
tat	ata	atg	gga	gtg	aac	cca	act	gct	cag	tct	tct	gga	tct	cta	tat	624
Tyr	Ile	Met	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Ala	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Tyr	
		195					200					205				
ggt	tca	caa	ata	tat	gcc	ctc	tgc	aac	caa	ttt	tat	aca	cct	gca	gct	672
Gly	Ser	Gln	Ile	Tyr	Ala	Leu	Cys	Asn	Gln	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ala	Ala	
	210					215						220				
act	gga	ctc	tac	gtg	gat	cag	tat	ttg	tat	cac	tac	tgt	gtt	gtg	gat	720
Thr	Gly	Leu	Tyr	Val	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Tyr	Cys	Val	Val	Asp	
225					230					235					240	
ccc	cag	gag	gcc	att	gcc	att	gta	ctg	ggg	ttc	atg	att	att	gtg	gct	768
Pro	Gln	Glu	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Met	Ile	Ile	Val	Ala	
				245					250					255		
ttt	gct	tta	ata	att	ttc	ttt	gct	gtg	aaa	act	cga	aga	aag	atg	gac	816
Phe	Ala	Leu	Ile	Ile	Phe	Phe	Ala	Val	Lys	Thr	Arg	Arg	Lys	Met	Asp	
			260					265						270		
agg	tat	gac	aag	tcc	aat	att	ttg	tgg	gac	aag	gaa	cac	att	tat	gat	864
Arg	Tyr	Asp	Lys	Ser	Asn	Ile	Leu	Trp	Asp	Lys	Glu	His	Ile	Tyr	Asp	
		275					280					285				
gag	cag	ccc	ccc	aat	gtc	gag	gag	tgg	gtc	tac	aac	tcg	aac	aaa	gac	912
Glu	Gln	Pro	Pro	Asn	Val	Glu	Glu	Trp	Val	Tyr	Asn	Ser	Asn	Lys	Asp	
		290				295					300					
agc	cag	agt	gaa	ggg	act	gcg	cag	ttg	gac	agc	att	ggc	ttc	agc	ata	960
Ser	Gln	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	Ile	
					310					315					320	
atc	agg	aaa	tgc	atc	cat	gct	gtg	gaa	acc	aga	ggg	atc	aac	gag	caa	1008
Ile	Arg	Lys	Cys	Ile	His	Ala	Val	Glu	Thr	Arg	Gly	Ile	Asn	Glu	Gln	
				325					330					335		
ggg	ctg	tat	cga	att	gtg	ggg	gtc	aac	tcc	aga	gtg	cag	aag	ttg	ctg	1056
Gly	Leu	Tyr	Arg	Ile	Val	Gly	Val	Asn	Ser	Arg	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	
				340				345					350			
agt	gtc	ctg	atg	gac	ccc	aag	act	gct	tct	gag	aca	gaa	aca	gat	atc	1104
Ser	Val	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	
				355				360					365			
tgt	gct	gaa	tgg	gag	ata	aag	acc	atc	act	agt	gct	ctg	aag	acc	tac	1152
Cys	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Tyr	
		370				375					380					

ES 2 785 552 T3

cta aga atg ctt cca gga cca ctc atg atg tac cag ttt caa aga agt Leu Arg Met Leu Pro Gly Pro Leu Met Met Tyr Gln Phe Gln Arg Ser 385 390 395 400	1200
ttc atc aaa gca gca aaa ctg gag aac cag gag tct cgg gtc tct gaa Phe Ile Lys Ala Ala Lys Leu Glu Asn Gln Glu Ser Arg Val Ser Glu 405 410 415	1248
atc cac agc ctt gtt cat cgg ctc cca gag aaa aat cgg cag atg tta Ile His Ser Leu Val His Arg Leu Pro Glu Lys Asn Arg Gln Met Leu 420 425 430	1296
cag ctg ctc atg aac cac ttg gca aat gtt gct aac aac cac aag cag Gln Leu Leu Met Asn His Leu Ala Asn Val Ala Asn Asn His Lys Gln 435 440 445	1344
aat ttg atg acg gtg gca aac ctt ggt gtg gtg ttt gga ccc act ctg Asn Leu Met Thr Val Ala Asn Leu Gly Val Val Phe Gly Pro Thr Leu 450 455 460	1392
ctg agg cct cag gaa gaa aca gta gca gcc atc atg gac atc aaa ttt Leu Arg Pro Gln Glu Glu Thr Val Ala Ala Ile Met Asp Ile Lys Phe 465 470 475 480	1440
cag aac att gtc att gag atc cta ata gaa aac cac gaa aag ata ttt Gln Asn Ile Val Ile Glu Ile Leu Ile Glu Asn His Glu Lys Ile Phe 485 490 495	1488
aac acc gtg ccc gat atg cct ctc acc aat gcc cag ctg cac ctg tct Asn Thr Val Pro Asp Met Pro Leu Thr Asn Ala Gln Leu His Leu Ser 500 505 510	1536
cgg aag aag agc agt gac tcc aag ccc ccg tcc tgc agc gag agg ccc Arg Lys Lys Ser Ser Asp Ser Lys Pro Pro Ser Cys Ser Glu Arg Pro 515 520 525	1584
ctg acg ctc ttc cac acc gtt cag tca aca gag aaa cag gaa caa agg Leu Thr Leu Phe His Thr Val Gln Ser Thr Glu Lys Gln Glu Gln Arg 530 535 540	1632
aac agc atc atc aac tcc agt ttg gaa tct gtc tca tca aat cca aac Asn Ser Ile Ile Asn Ser Ser Leu Glu Ser Val Ser Ser Asn Pro Asn 545 550 555 560	1680
agc atc ctt aat tcc agc agc agc tta cag ccc aac atg aac tcc agt Ser Ile Leu Asn Ser Ser Ser Ser Leu Gln Pro Asn Met Asn Ser Ser 565 570 575	1728
gac cca gac ctg gct gtg gtc aaa ccc acc cgg ccc aac tca ctc ccc Asp Pro Asp Leu Ala Val Val Lys Pro Thr Arg Pro Asn Ser Leu Pro 580 585 590	1776
ccg aat cca agc cca act tca ccc ctc tcg cca tct tgg ccc atg ttc Pro Asn Pro Ser Pro Thr Ser Pro Leu Ser Pro Ser Trp Pro Met Phe 595 600 605	1824
tcg gcg cca tcc agc cct atg ccc acc tca tcc acg tcc agc gac tca Ser Ala Pro Ser Ser Pro Met Pro Thr Ser Ser Thr Ser Ser Asp Ser 610 615 620	1872
tcc ccc gtc agc aca ccg ttc cgg aag gca aaa gcc ttg tat gcc tgc Ser Pro Val Ser Thr Pro Phe Arg Lys Ala Lys Ala Leu Tyr Ala Cys 625 630 635 640	1920
aaa gct gaa cat gac tca gaa ctt tcg ttc aca gca ggc acg gtc ttc Lys Ala Glu His Asp Ser Glu Leu Ser Phe Thr Ala Gly Thr Val Phe 645 650 655	1968
gat aat gtt cac cca tct cag gag cct ggc tgg ttg gag ggg act ctg Asp Asn Val His Pro Ser Gln Glu Pro Gly Trp Leu Glu Gly Thr Leu 660 665 670	2016
aac gga aag act ggc ctc atc cct gag aat tac gtg gag ttc ctc taa Asn Gly Lys Thr Gly Leu Ile Pro Glu Asn Tyr Val Glu Phe Leu 675 680 685	2064

ES 2 785 552 T3

<210> 2
 <211> 687
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2
 Met Ser Ser Arg Pro Leu Glu Ser Pro Pro Pro Tyr Arg Pro Asp Glu
 1 5 10 15
 Phe Lys Pro Asn His Tyr Ala Pro Ser Asn Asp Ile Tyr Gly Gly Glu
 20 25 30
 Met His Val Arg Pro Met Leu Ser Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Tyr Pro
 35 40 45
 Glu Asp Glu Ile Leu His Phe Tyr Lys Trp Thr Ser Pro Pro Gly Val
 50 55 60
 Ile Arg Ile Leu Ser Met Leu Ile Ile Val Met Cys Ile Ala Ile Phe
 65 70 75 80
 Ala Cys Val Ala Ser Thr Leu Ala Trp Asp Arg Gly Tyr Gly Thr Ser
 85 90 95
 Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Tyr Pro Tyr Gly Gly Ser Gly Phe Gly
 100 105 110
 Ser Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr
 115 120 125
 Gly Gly Tyr Thr Asp Pro Arg Ala Ala Lys Gly Phe Met Leu Ala Met
 130 135 140
 Ala Ala Phe Cys Phe Ile Ala Ala Leu Val Ile Phe Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Ile Arg Ser Glu Met Ser Arg Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Ser Val Ile
 165 170 175

ES 2 785 552 T3

Ile	Val	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Met	Val	Phe	Ile	Ala	Thr	Ile	Val	180	185	190	
Tyr	Ile	Met	Gly	Val	Asn	Pro	Thr	Ala	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Tyr	195	200	205	
Gly	Ser	Gln	Ile	Tyr	Ala	Leu	Cys	Asn	Gln	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ala	Ala	210	215	220	
Thr	Gly	Leu	Tyr	Val	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	His	Tyr	Cys	Val	Val	Asp	225	230	235	240
Pro	Gln	Glu	Ala	Ile	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Phe	Met	Ile	Ile	Val	Ala	245	250	255	
Phe	Ala	Leu	Ile	Ile	Phe	Phe	Ala	Val	Lys	Thr	Arg	Arg	Lys	Met	Asp	260	265	270	
Arg	Tyr	Asp	Lys	Ser	Asn	Ile	Leu	Trp	Asp	Lys	Glu	His	Ile	Tyr	Asp	275	280	285	
Glu	Gln	Pro	Pro	Asn	Val	Glu	Glu	Trp	Val	Tyr	Asn	Ser	Asn	Lys	Asp	290	295	300	
Ser	Gln	Ser	Glu	Gly	Thr	Ala	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Gly	Phe	Ser	Ile	305	310	315	320
Ile	Arg	Lys	Cys	Ile	His	Ala	Val	Glu	Thr	Arg	Gly	Ile	Asn	Glu	Gln	325	330	335	
Gly	Leu	Tyr	Arg	Ile	Val	Gly	Val	Asn	Ser	Arg	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	340	345	350	
Ser	Val	Leu	Met	Asp	Pro	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	355	360	365	
Cys	Ala	Glu	Trp	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Tyr	370	375	380	
Leu	Arg	Met	Leu	Pro	Gly	Pro	Leu	Met	Met	Tyr	Gln	Phe	Gln	Arg	Ser	385	390	395	400
Phe	Ile	Lys	Ala	Ala	Lys	Leu	Glu	Asn	Gln	Glu	Ser	Arg	Val	Ser	Glu	405	410	415	
Ile	His	Ser	Leu	Val	His	Arg	Leu	Pro	Glu	Lys	Asn	Arg	Gln	Met	Leu				

ES 2 785 552 T3

420					425					430					
Gln	Leu	Leu	Met	Asn	His	Leu	Ala	Asn	Val	Ala	Asn	Asn	His	Lys	Gln
		435				440						445			
Asn	Leu	Met	Thr	Val	Ala	Asn	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly	Pro	Thr	Leu
		450				455				460					
Leu	Arg	Pro	Gln	Glu	Glu	Thr	Val	Ala	Ala	Ile	Met	Asp	Ile	Lys	Phe
				470						475				480	
Gln	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Ile	Leu	Ile	Glu	Asn	His	Glu	Lys	Ile	Phe
				485				490						495	
Asn	Thr	Val	Pro	Asp	Met	Pro	Leu	Thr	Asn	Ala	Gln	Leu	His	Leu	Ser
		500						505				510			
Arg	Lys	Lys	Ser	Ser	Asp	Ser	Lys	Pro	Pro	Ser	Cys	Ser	Glu	Arg	Pro
		515				520						525			
Leu	Thr	Leu	Phe	His	Thr	Val	Gln	Ser	Thr	Glu	Lys	Gln	Glu	Gln	Arg
		530				535				540					
Asn	Ser	Ile	Ile	Asn	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Pro	Asn
				550						555				560	
Ser	Ile	Leu	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Asn	Met	Asn	Ser	Ser
				565				570						575	
Asp	Pro	Asp	Leu	Ala	Val	Val	Lys	Pro	Thr	Arg	Pro	Asn	Ser	Leu	Pro
		580						585				590			
Pro	Asn	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Ser	Pro	Ser	Trp	Pro	Met	Phe
		595				600						605			
Ser	Ala	Pro	Ser	Ser	Pro	Met	Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Asp	Ser
		610				615				620					
Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Pro	Phe	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Leu	Tyr	Ala	Cys
				630						635				640	
Lys	Ala	Glu	His	Asp	Ser	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Ala	Gly	Thr	Val	Phe
				645				650						655	
Asp	Asn	Val	His	Pro	Ser	Gln	Glu	Pro	Gly	Trp	Leu	Glu	Gly	Thr	Leu
		660						665				670			
Asn	Gly	Lys	Thr	Gly	Leu	Ile	Pro	Glu	Asn	Tyr	Val	Glu	Phe	Leu	
		675				680						685			

<210> 3
<211> 18
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 3
cgagcggatt ggtttatc

	<210> 4	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 4	
	acgctgcatt tctcagtg	18
10	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 5	
	agctaaaggg cattgctc	18
20	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 6	
	ctggaatcag cagttgtc	18
25	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 7	
	atacacctgc agctactg	18
35	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8	
	cctggaagca ttcttagg	18
40	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 9	
	gaagtcctt gccatcctaa	20
50	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 10	
	gcacgaaggc tcattcattca	20

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de ocludina (OCLN) y un gen de la proteína 26 activadora de Rho GTPasa (ARHGAP26), en el que el método comprende una etapa de detectar si un polinucleótido que codifica para un polipéptido descrito o bien por (1) o bien (2) mostrado a continuación existe en una muestra obtenida de un sujeto:
 - (1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2;
 - (2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de no menos del 90% con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y tiene la capacidad de desarrollar un tumor.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 y tiene la capacidad de desarrollar un tumor, o el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2, en el que se delecionan, sustituyen, insertan y/o añaden de 1 a 10 aminoácidos, y tiene la capacidad de desarrollar un tumor.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una etapa de amplificar un ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto, o una etapa de hibridar una sonda con un ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto para detectar el polinucleótido.
6. Método según la reivindicación 5, que comprende una etapa de amplificar el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto usando un conjunto de cebadores mostrado a continuación:

un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, en el que el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con un polinucleótido seleccionado como diana en la detección, y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con una cadena complementaria de un polinucleótido seleccionado como diana en la detección.
7. Método según la reivindicación 5, que comprende una etapa de amplificar el ácido nucleico existente en una muestra obtenida de un sujeto usando un conjunto de cebadores mostrado a continuación:

un conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26, en el que un cebador sentido consiste en un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y un cebador antisentido consiste en un oligonucleótido complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto es un paciente con cáncer.
9. Método según la reivindicación 8, en el que cáncer es cáncer de estómago.
10. Método para diagnosticar cáncer en un sujeto que comprende una etapa de detección según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y una etapa en la que se evalúa que existe una elevada posibilidad de que el sujeto tenga cáncer, cuando el polinucleótido se detecta en una muestra obtenida del sujeto.
11. Método según la reivindicación 10, en el que el cáncer es cáncer de estómago.
12. Conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26, en el que el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una condición rigurosa con el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y el cebador sentido consiste en un oligonucleótido que se hibrida en una

condición rigurosa con una cadena complementaria de dicho polinucleótido.

- 5 13. Conjunto de cebadores para detectar un gen de fusión que se compone de un gen de OCLN y un gen de ARHGAP26 que existe en una muestra obtenida de un sujeto, comprendiendo el conjunto de cebadores un cebador sentido diseñado a partir de una sección que codifica para OCLN y un cebador antisentido diseñado a partir de una sección que codifica para ARHGAP26 del polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 10 14. Conjunto de cebadores según la reivindicación 13, en el que el cebador sentido consiste en un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 1 y 891 de SEQ ID NO: 1, y el cebador antisentido consiste en un oligonucleótido complementario a un oligonucleótido de al menos 16 bases consecutivas aleatorias entre la base n.º 892 y 2064 de SEQ ID NO: 1.

Figura 1

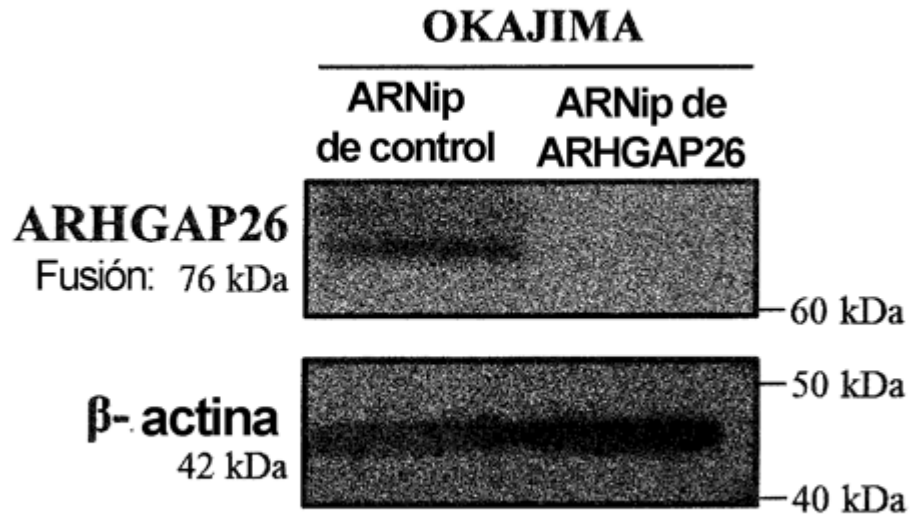


Figura 2

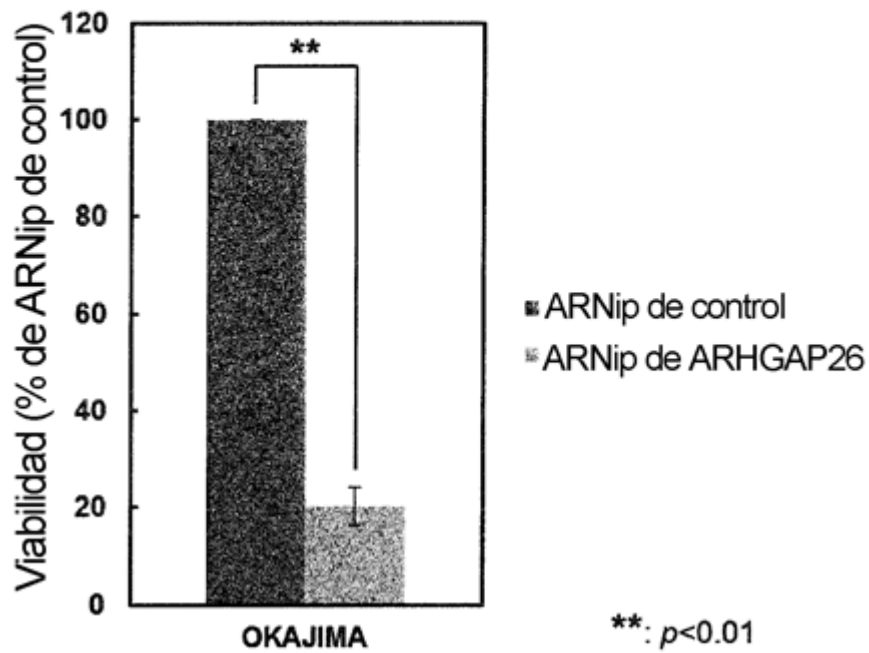


Figura 3

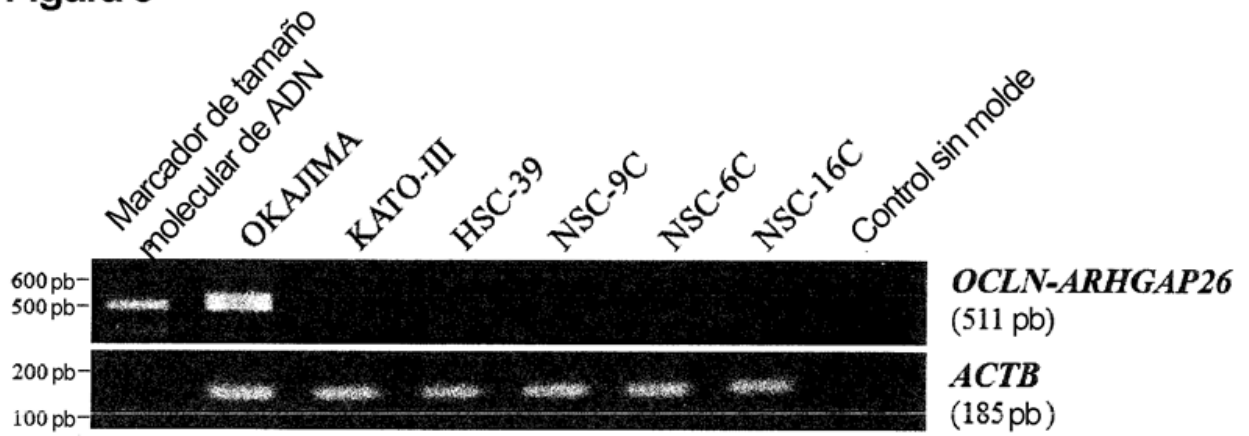
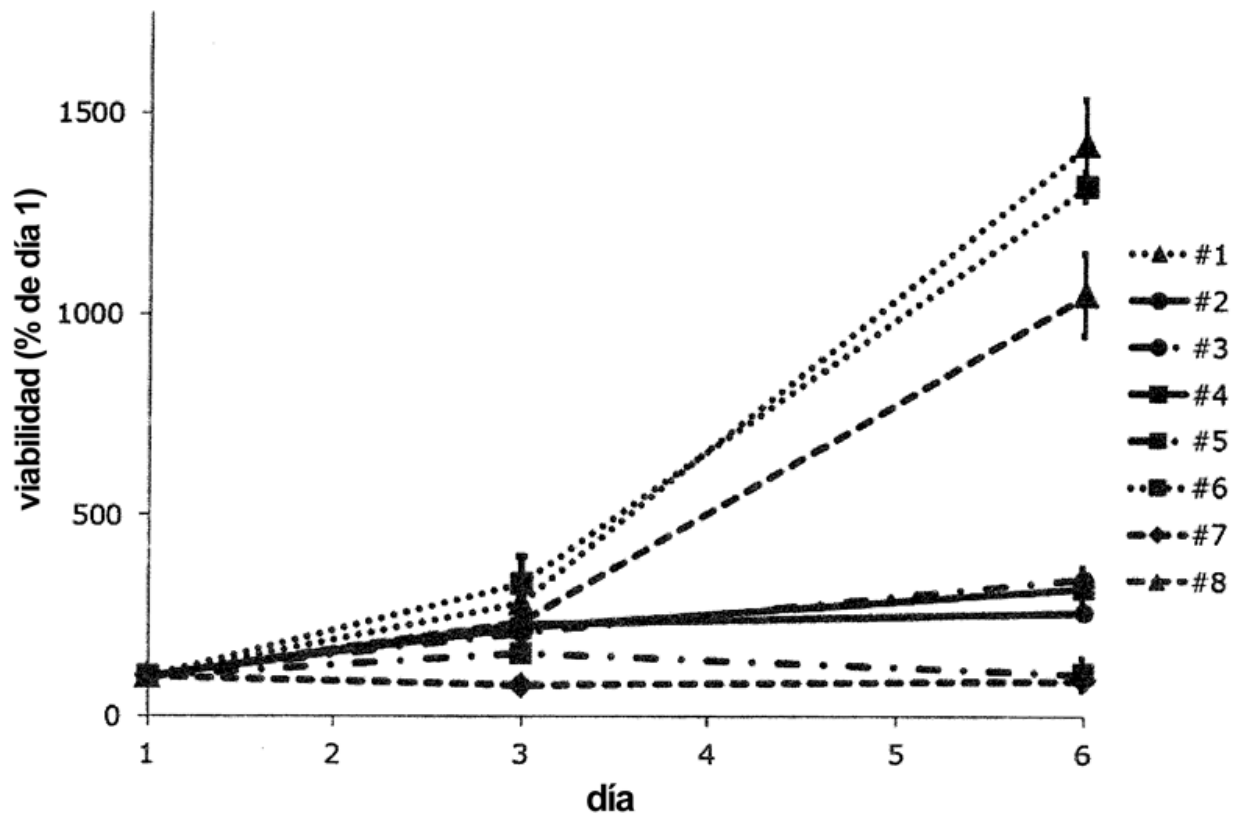


Figura 4



N.º	diana	información de ARNip
#1	simulada	---
#2	OCLN	Ambion s9814
#3	OCLN	Ambion s458015
#4	ARHGAP26	Ambion s23013
#5	ARHGAP26	QIAGEN SI03077690
#6	ARHGAP26	Ambion s23015
#7	KIF11	QIAGEN SI02653770
#8	AliStar	QIAGEN 1027280