

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 644**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05732112 .7**
96 Fecha de presentación: **23.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1756577**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Métodos y composiciones para la detección de enfermedades de cuello uterino**

30 Prioridad:
24.03.2004 US 556495 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

73 Titular/es:
TRIPATH IMAGING, INC.
780 PLANTATION DRIVE
BURLINGTON, NC 27215, US

72 Inventor/es:
FISCHER, Timothy, J.;
MALINOWSKI, Douglas, P.;
TAYLOR, Adriann, J. y
PARKER, Margaret, R.

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 381 644 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

Métodos y composiciones para la detección de enfermedades de cuello uterino

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y a composiciones para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado.

10 **Antecedentes de la invención**

El carcinoma de cuello uterino es el segundo neoplasma más común en mujeres, representando aproximadamente un 12% de todos los cánceres en mujeres y ocasionando aproximadamente 250.000 muertes por año. Baldwin et al (2003) Nature Reviews Cancer 3:1-10. En muchos países en los que no se dispone de programas de exploración masiva, el problema clínico es más serio. En estos países, el cáncer de cuello uterino es la causa número uno de muerte por cáncer en mujeres.

La mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino representan carcinomas de células escamosas, aunque también se observan adenocarcinomas. El cáncer de cuello uterino puede prevenirse por exploración de la población a medida que evoluciona a través de fases intraepiteliales no invasivas bien definidas, que pueden diferenciarse morfológicamente. Williams et al (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14932-14937. Si bien no se conoce cómo se transforman las células normales, el concepto de un espectro continuo de cambios histopatológicos a partir del epitelio estratificado, normal por medio de neoplasia intraepitelial de cuello uterino (CIN) a cáncer invasivo se ha aceptado ampliamente durante años. El precursor del cáncer de cuello uterino es la displasia, conocida también en la técnica como CIN o lesiones intraepiteliales escamosas (SIL). Las anomalías intraepiteliales escamosas pueden clasificarse usando el sistema triple (CIN) o doble (Bethesda). En el sistema Bethesda, las lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL), que corresponden a CIN I e infección por el VPH, generalmente representan infecciones por el VPH productivas con un riesgo de progreso relativamente bajo hacia una enfermedad invasiva. Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL), que corresponden a CIN II y CIN III en el sistema triple, muestran un riesgo de progreso mayor a cáncer de cuello uterino que las LSIL, aunque tanto las LSIL como las HSIL se contemplan como precursores potenciales de malignidad. Las muestras de los pacientes también pueden clasificarse como ASCUS (células escamosas atípicas de significado desconocido) o AGUS (células glandulares atípicas de significado desconocido) con este sistema.

Se ha establecido una fuerte asociación del cáncer e infección de cuello uterino por tipos de virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo, tales como los tipos 16, 18 y 31. De hecho, un gran cúmulo de pruebas epidemiológicas y de biología molecular ha establecido la infección por VPH como un factor causal en el cáncer de cuello uterino. Por otra parte, el VPH se encuentra en un 85% o más de los casos de enfermedad de cuello uterino de alto grado. Sin embargo, la infección por VPH es muy habitual, produciéndose posiblemente en un 5-15% de las mujeres de más de 30 años de edad, pero pocas mujeres positivas al VPH desarrollarán alguna vez una enfermedad de cuello uterino de alto grado o cáncer. La presencia del VPH solo es indicativa únicamente de infección, no de enfermedad de cuello uterino de alto grado, y, por lo tanto, el ensayo para detectar infección por el VPH solo da como resultado muchos positivos falsos. Véase, por ejemplo, Wright et al (2004) Obstet Gynecol 103:304-309.

Las publicaciones actuales sugieren que el VPH infecta las células madre basales dentro del tejido subyacente del cuello uterino. La diferenciación de las células madre en queratinocitos maduros, con la migración resultante de las células al epitelio del cuello uterino estratificado, está asociada con la replicación viral del VPH y la re-infección de las células. Durante este proceso de replicación viral, se producen numerosos cambios celulares que incluyen la desregulación del ciclo celular, la proliferación activa, la replicación del ADN, la activación transcripcional y la inestabilidad genómica (Crum (2000) Modern Pathology 13:243-251; Middleton et al (2003) J. Virol. 77:10186-10201; Pett et al (2004) Cancer Res. 64:1359-1368).

La mayor parte de las infecciones por el VPH tienen una naturaleza transitoria, resolviéndose la infección viral por sí misma en un período de 12 meses. Para aquellos individuos que desarrollan infecciones persistentes con uno o más subtipos oncogénicos del VPH, existe el riesgo de desarrollo de neoplasia en comparación con los pacientes sin infección por el VPH. Dada la importancia del VPH en el desarrollo de neoplasia de cuello uterino, la detección clínica del VPH se ha convertido en una importante herramienta de diagnóstico en la identificación de pacientes con riesgo de desarrollo de neoplasia de cuello uterino. La utilidad clínica de la exploración basada en el VPH para enfermedades del cuello uterino se encuentra en su valor predictivo negativo. Un resultado negativo para el VPH combinado con un historial de frotis de Papanicolau normales es un indicador excelente de un estado libre de enfermedad y un bajo riesgo de desarrollo de neoplasia de cuello uterino durante los 1-3 años siguientes. Sin embargo, un resultado positivo para el VPH no es un diagnóstico de enfermedad de cuello uterino sino una indicación de infección. Aunque la mayoría de las infecciones por VPH son transitorias y se eliminarán espontáneamente en un período de 12 meses, una infección persistente con un subtipo viral de VPH de alto riesgo indica un riesgo mayor de desarrollo de neoplasia de cuello uterino. Para complementar el ensayo del VPH, se espera que la identificación de marcadores moleculares asociados con la neoplasia de cuello uterino mejore la

especificidad clínica para la diagnosis de las enfermedades de cuello uterino.

5 El examen citológico de frotis de cuello uterino teñido con Papanicolau (frotis de Pap) es actualmente el método de
 elección para detectar el cáncer de cuello uterino. El ensayo de Pap es un método subjetivo que ha permanecido
 sustancialmente inalterado durante 60 años. Sin embargo, existen numerosas cuestiones, en lo que respecta a su
 realización. La sensibilidad referida de un único ensayo de Pap (la proporción de positivos para la enfermedad que
 es positiva para el ensayo) es baja y muestra una amplia variación (30-87%). La especificidad de un solo ensayo de
 Pap (la proporción de negativos para la enfermedad que son negativos para el ensayo) podría ser tan baja como un
 86% en una población en exploración y considerablemente más baja en la población ASCUS PLUS para la
 10 determinación de enfermedades de alto grado subyacentes. Véase, Baldwin et al., anteriormente. Un porcentaje
 significativo de frotis de Pap caracterizados como LSIL o CIN1 son realmente positivos para lesiones de alto grado.
 Además, hasta un 10% de los frotis de Pap se clasifican como ASCUS (células escamosas atípicas de significado no
 determinado), es decir, no es posible realizar una clasificación clara como lesión normal, moderada o grave, o tumor.
 Sin embargo, la experiencia demuestra que hasta el 10% de esta población ASCUS tiene lesiones de alto grado,
 15 que por consiguiente se pasan por alto. Véase, por ejemplo, Manos et al (1999) JAMA 281:1605-1610.

El documento de Baldwin P et al (2003), Nature Reviews, vol. 3 págs. 217-226 describe intentos para mejorar la
 exploración de cuello uterino. El documento WO02101075 describe genes, composiciones, kits y métodos en
 relación con el cáncer de cuello uterino. El documento de Santin A et al describe marcadores moleculares
 20 candidatos para el diagnóstico del cáncer de cuello uterino.

Por lo tanto, se necesita un método para el diagnóstico de enfermedades de cuello uterino de alto grado que sea
 independiente de o que funcione junto con los frotis de Pap y ensayos moleculares convencionales para la infección
 por VPH de alto riesgo. Tal método debe ser capaz de identificar específicamente enfermedades de cuello uterino de
 25 alto grado que estén presentes en todas las poblaciones de pacientes, incluyendo aquellos casos clasificados como
 LSIL o CIN1 por tinción con Pap que sean realmente positivos para lesiones de alto grado (es decir, "negativos
 falsos"). Por lo tanto, en la materia existe una necesidad de métodos de diagnóstico específicos, fiables que sean
 capaces de detectar enfermedades de cuello uterino de alto grado y de diferenciar enfermedades de alto grado de
 afecciones que no se consideran enfermedades clínicas, tales como infección por VPH de fase temprana y displasia
 30 leve.

Sumario de la invención

35 La invención, en su sentido más amplio, es como se detalla en las reivindicaciones.

Se proporcionan composiciones y métodos para el diagnóstico de enfermedades de cuello uterino de alto grado. Los
 métodos de la invención comprenden detectar la sobreexpresión de al menos dos biomarcadores, MCM2 y Topo 2A
 en una muestra corporal, en el que la detección de la sobreexpresión de dichos biomarcadores identifica
 específicamente muestras que son indicativas de enfermedades de cuello uterino de alto grado y en el que dicha
 40 detección comprende poner en contacto dicha muestra corporal al menos con tres anticuerpos, en el que un primer y
 segundo anticuerpo se unen específicamente a MCM2 y un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A. El
 presente método distingue muestras que son indicativas de enfermedades de cuello uterino de alto grado de
 muestras que son indicativas de proliferación benigna, infección por el VPH en fase temprana o displasia leve. Por
 tanto, el método se basa en la detección de los dos biomarcadores MCM2 y Topo2A que se sobreexpresan de
 45 manera selectiva en patologías de cuello uterino de alto grado pero que no se sobreexpresan en células normales o
 en células que no son indicativas de enfermedades clínicas.

Los biomarcadores en los que se basa la presente invención son las proteínas MCM2 y Topo2A, que se
 sobreexpresan de manera selectiva en enfermedades de cuello uterino de alto grado, posiblemente como resultado
 50 de una disfunción del ciclo celular inducida por el VPH y de una activación de determinados genes responsables de
 la inducción de la fase S. Los biomarcadores de interés particular incluyen genes de la fase S, cuya sobreexpresión
 resulta de una disfunción del ciclo celular inducida por el VPH y la activación posterior de los factores
 transcripcionales SP-1 y E2F. La detección de la sobreexpresión de las proteínas biomarcadoras en las que se basa
 la presente invención permite la diferenciación de muestras que son indicativas de enfermedades de alto grado,
 55 tales como displasia moderada a grave y carcinomas de cuello uterino, de células normales o de células que no son
 indicativas de enfermedades clínicas (por ejemplo, infección por el VPH en fase temprana sin displasia y displasia
 leve).

Adicionalmente, se proporcionan técnicas inmunocitoquímicas que utilizan anticuerpos para detectar la
 60 sobreexpresión de las dos proteínas biomarcadoras MCM2 y Topo2A en muestras citológicas de cuello uterino.
 También se proporcionan kits que comprenden reactivos para llevar a la práctica los métodos de la invención.

Los métodos de la invención también pueden usarse en combinación con técnicas de diagnóstico ginecológico
 tradicional que analizan características morfológicas o estados de infección por el VPH. Por tanto, por ejemplo, los
 65 métodos inmunocitoquímicos presentados en el presente documento pueden combinarse con el ensayo de Pap de
 manera que toda la información morfológica procedente del método convencional se conserva. De esta manera, la

detección de biomarcadores que se sobreexpresan de manera selectiva en enfermedades de cuello uterino de alto grado puede reducir el alto índice de negativos falsos del ensayo de Pap y puede facilitar la exploración masiva automatizada.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un resumen esquemático de proliferación y desregulación del ciclo celular en displasia de cuello uterino. En la neoplasia de cuello uterino se producen modificaciones del ciclo celular y defectos sobre el control en la proliferación. La infección por el VPH y la sobreexpresión de las oncoproteínas E6 y E7 producen una serie de modificaciones en el ciclo celular y en control de la proliferación. La oncoproteína E6 del VPH anula puntos de control del ciclo celular en los límites G1/S y G2/M con posterior replicación del ADN con mutaciones somáticas. E7 promueve la aceleración en la fase S con expresión prolongada de genes de la fase S necesarios para la replicación del ADN (inducción aberrante de la fase S). Del mismo modo, E6 promueve la expresión de la telomerasa que garantiza la integridad del telómero cromosómico continuada durante la proliferación e inmortalización celular. Por último, E7 anula la ruta de señalización del TGF-beta y anula este mecanismo de control para detener G1 y el control de proliferación.

La Figura 2 proporciona una representación esquemática de la inducción aberrante de la fase S en neoplasia de cuello uterino. El efecto de las proteínas del VPH sobre el control del ciclo celular y la proliferación incluye la activación de las rutas supresoras tumorales p53 y Rb, la activación de transcripción de E2F-1, inducción de los genes MCM-2, MCM-6, MCM-7, TOP2A y Ciclina E1, entre otros, de la fase S. Además, E2 interacciona con el factor de transcripción Sp-1 para activar la expresión génica de p21-waf-1.

La Figura 3 proporciona una representación esquemática del bucle de retroalimentación sobre la proliferación celular en la fase S aberrante del ciclo celular. La sobreexpresión de la Ciclina E y CDK2 en la fase S da como resultado un mecanismo independiente que permite la inducción de los genes de la fase S.

La Figura 4 proporciona una representación esquemática de la función de c-myc en la inducción aberrante de la fase S. C-myc es un activador transcripcional importante en la proliferación celular. El gen que codifica c-myc se localiza en el cromosoma. Existen documentos que indican que este es el mismo sitio que el de la integración del VPH 18 con una amplificación correspondiente de esta región génica. La amplificación del gen c-myc daría como resultado la sobreexpresión de la proteína codificada y los niveles aumentados de c-myc contribuirían independientemente a la transcripción génica en la fase S acelerando adicionalmente la proliferación celular.

La Figura 5 proporciona una representación esquemática de cebadores TaqMan® dirigidos a variantes de transcripción de MCM7.

La Figura 6 ilustra el patrón de tinción diferencial de un anticuerpo dirigido contra Claudina 1 en un ensayo IHC (inmunohistoquímico) para una paciente con displasia leve y una paciente con carcinoma de células escamosas.

La Figura 7 ilustra el patrón de tinción diferencial de un anticuerpo dirigido contra Claudina 1 en un formato IHC (inmunohistoquímico) e ICC (inmunocitoquímico). Se muestran células normales y células indicativas de CINIII y HSIL.

La Figura 8 ilustra patrones de tinción nuclear obtenidos con un biomarcador nuclear (es decir, MCM2) y patrones de tinción citoplásmica obtenidos con un biomarcador citoplásmico (p 16). Los resultados proceden de un ensayo inmunocitoquímico (ICC) de una muestra de una paciente con una enfermedad de cuello uterino de alto grado.

La Figura 9 ilustra una tinción deseable y no deseable de anticuerpos en un ensayo inmunohistoquímico (IHC) usando dos anticuerpos diferentes dirigidos contra MCM6 en tejido de cuello uterino procedente de una paciente con una enfermedad de cuello uterino de alto grado.

Descripción detallada de la invención

La invención, en su sentido más amplio, es como se detalla en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona composiciones y métodos para identificar o diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado. Los métodos comprenden la detección de la sobreexpresión de biomarcadores específicos que se sobreexpresan selectivamente en enfermedades de cuello uterino de alto grado (por ejemplo, displasia moderada a grave y cáncer de cuello uterino). Esto es, los biomarcadores son capaces de distinguir entre células infectadas por el VPH y células infectadas por el VPH que son premalignas, malignas o claramente cancerosas. Los métodos para diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado implican detectar la sobreexpresión de al menos un biomarcador lo que es indicativo de una enfermedad de cuello uterino de alto grado en una muestra de

tejido o de líquido corporal procedente de una paciente. Para detectar la expresión del biomarcador de interés se usan anticuerpos y técnicas inmunocitoquímicas. Adicionalmente se proporcionan kits para la realización práctica de los métodos de la invención.

La expresión “diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado” significa incluir, por ejemplo, realizar un diagnóstico o detectar la presencia de una enfermedad de cuello uterino, controlando la progresión de la enfermedad e identificando o detectando células o muestras que son indicativas de una enfermedad de cuello uterino de alto grado. En el presente documento, los términos *diagnosticar*, *detectar* e *identificar* una enfermedad de cuello uterino de alto grado se usan indistintamente. Por “enfermedad de cuello uterino de alto grado” se entiende aquellas afecciones clasificadas por colposcopia como patología premaligna, patología maligna, displasia moderada a grave y cáncer de cuello uterino. Básicamente una enfermedad de cuello uterino de alto grado incluye la identificación histológica de CINII, CINIII, HSIL, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma y cáncer (etapas mediante el Sistema de Clasificación FIGO I-IV).

Como se ha indicado anteriormente, un porcentaje significativo de pacientes que presentan frotis de Pap clasificados como normales, CINI o ASCUS realmente poseen lesiones características de una enfermedad de cuello uterino de alto grado. Por tanto, los métodos de la presente invención permiten identificar enfermedades de cuello uterino de alto grado en todas las poblaciones de pacientes, incluyendo aquellas pacientes con “negativos falsos” y facilitar la detección de células anómalas raras procedentes de una muestra de una paciente. El diagnóstico puede realizarse independientemente de la morfología celular y del estado de infección por el VPH, aunque los métodos de la invención también pueden usarse junto con técnicas de diagnóstico convencionales, por ejemplo, ensayo Pap, ensayo molecular para tipos de VPH de alto riesgo, etc.

Los tipos del VPH se han dividido en categorías de alto y bajo riesgo basándose en su asociación con el cáncer de cuello uterino y lesiones precancerosas. Los tipos del VPH de bajo riesgo incluyen los tipos 6, 11, 42, 43, 44 y no están asociados con un riesgo aumentado de cáncer de cuello uterino. Por otro lado, los tipos del VPH de alto riesgo, que incluyen los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, se han asociado estrechamente con cáncer de cuello uterino y con lesiones intraepiteliales escamosas. Véase, por ejemplo, Wright et al (2004) *Obstet Gynecol* 103:304-309. De hecho, más del 99% de los cánceres de cuello uterino están asociados con infección por el VPH de alto riesgo. La infección persistente por el VPH de alto riesgo conduce a la interrupción del ciclo celular y de los puntos de control de la mitosis en células de cuello uterino a través de la acción de los genes E2, E6 y E7 del VPH. En particular, el E7 del VPH produce un aumento en ciclina E y la liberación posterior del factor de transcripción E2f de la proteína del retinoblastoma (Rb). El factor de transcripción E2f liberado desencadena después la transcripción de una diversidad de genes de la fase S, incluyendo la topoisomerasa II alfa (Topo2A), proteínas MCM, ciclinas E1 y E2 y p14arf, dando como resultado la pérdida del control del ciclo celular. Además, el gen E2 del VPH estimula la sobreexpresión de genes de la fase S tales como p21^{waf-1} mediante la activación del factor de transcripción Sp-1. La interrupción del ciclo celular causada por infección persistente por el VPH puede conducir a displasia de cuello uterino leve que después puede progresar a displasia moderada o grave y eventualmente, en algunos casos, a cáncer de cuello uterino. Por “cáncer de cuello uterino” se entiende cualquier cáncer o lesión cancerosa asociada con tejido de cuello uterino o células de cuello uterino.

La infección por VPH en queratinocitos del cuello uterino da como resultado una serie de modificaciones que interrumpen las actividades dentro del ciclo celular. Las oncoproteínas E6 y E7 de los subtipos del VPH de alto riesgo se han implicado en una serie de procesos celulares relacionados con una proliferación aumentada y una transformación neoplásica de los queratinocitos infectados. La proteína E6 se ha implicado en dos procesos críticos. El primero es la degradación de la proteína supresora tumoral p53 mediante proteólisis mediada por ubiquitina. La retirada de la p53 funcional elimina un punto de control principal del ciclo celular responsable de la reparación del ADN antes de entrar en la replicación del ADN y en la mitosis (Duensing y Munger (2003) *Prog Cell Cycle Res.* 5:383-391). Además, se ha demostrado que E6 interacciona con la proteína c-myc y que es responsable de la activación transcripcional directa del gen hTERT con expresión posterior de telomerasa (McMurray y McCance (2003) *J Virol.* 77:9852-9861; Veldman et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 8211-8216). La activación de la telomerasa es una etapa clave en la biología del cáncer responsable del mantenimiento de la longitud del telómero en los cromosomas que se replican y esta enzima garantiza cromosomas funcionalmente intactos durante la inmortalización celular.

Se sabe que la oncoproteína E7 del VPH contribuye a la proliferación celular mediante dos mecanismos independientes. El primero es la inactivación de la ruta supresora tumoral del TGF-beta responsable de la detención del ciclo celular en la fase G1 a través de interacción directa de E7 con las proteínas Smad (Smad 2, 3 y 4), inhibiendo de esta manera su capacidad para unirse al ADN (Lee et al. (2002) *J Biol Chem.* 277:38557-38564). Del mismo modo, se sabe que E7 interacciona específicamente con la proteína supresora tumoral Rb. Dentro de la fase G1 del ciclo celular, Rb forma complejos con el factor de transcripción E2F e impide que E2F active la transcripción génica. En el límite de G1/S, la proteína Rb se fosforila con la liberación del factor de transcripción E2F- iniciando de esta manera la transcripción del gen E2F y la entrada en la fase S del ciclo celular. La oncoproteína E7 del VPH anula este mecanismo de control uniéndose directamente con Rb y desplazando a E2F del complejo. Esto da como resultado la transcripción génica conducida por E2F independientemente del control del ciclo celular normal (Duensing y Munger (2003) *Prog Cell Cycle Res.* 5:383-391; Duensing y Munger (2004) *Int J Cancer* 109:157-162; Clarke y Chetty (2001) *Gynecol Oncol.* 82:238-246). Esta liberación de E2F desacopla la transcripción génica del

control del ciclo celular y da como resultado una transcripción prolongada y aberrante de genes de la fase S responsables de la síntesis del ADN y de la proliferación celular. Además, se ha demostrado que las acciones combinadas de E6 y E7 contribuyen a anomalías en el centrosoma y a la posterior inestabilidad genómica en neoplasia de cuello uterino (Duensing y Munger (2004) Int J Cancer 109:157-162).

5 Sin pretender limitarse a ningún mecanismo particular, en algunas realizaciones, el comportamiento molecular de una enfermedad de cuello uterino de alto grado puede caracterizarse como la sobreexpresión de genes específicos, normalmente expresados sólo durante la fase S del ciclo celular, como resultado de infección por cepas oncogénicas del VPH. La activación posterior no controlada de la transcripción génica e inducción aberrante de la fase S está
10 mediada a través de la ruta del factor de transcripción E2F-1. Este comportamiento parece ser indicativo de enfermedad de cuello uterino de alto grado y proporciona una relación entre infecciones oncogénicas por el VPH y el comportamiento molecular de neoplasia de cuello uterino. El uso de estos biomarcadores moleculares de neoplasia de cuello uterino en formatos de ensayo de diagnóstico molecular puede mejorar la detección de enfermedades de
15 cuello uterino con una sensibilidad y especificidad mejoradas sobre los métodos actuales. Véase, en líneas generales, las Figuras 1-4 y Malinowski (2005) BioTechniques 38:1-8 (publicado). Por tanto, un método para diagnosticar una enfermedad de cuello uterino de alto grado comprende detectar la sobreexpresión de un biomarcador, en el que la sobreexpresión del biomarcador es indicativa de una inducción aberrante de la fase S, como se describe en el presente documento. Los métodos comprenden detectar la sobreexpresión de un biomarcador, en el que la sobreexpresión del biomarcador es indicativa de una transcripción o sobreexpresión activa de los genes a E6 y E7 del VPH.

20 La displasia se define convencionalmente en términos morfológicos por una pérdida de orientación normal de las células epiteliales, acompañada por cambios en cuanto al tamaño, forma y a las características de tinción en el núcleo y en las células. La displasia se clasifica de acuerdo con el grado de anomalías celulares (es decir, leve, moderada, grave) y se acepta ampliamente que es una fase intermedia en el progreso desde tejidos normales a
25 neoplasia, como demuestra la identificación de afecciones displásicas premalignas tales como CIN. Los métodos de la presente invención permiten la identificación de enfermedades de cuello uterino de alto grado, que incluyen displasia moderada a grave y cáncer de cuello uterino (es decir, estados CINII y los citados anteriormente), basándose en la sobreexpresión de los biomarcadores MCM2 y Topo2A que son específicos de enfermedades de
30 cuello uterino de alto grado.

Los métodos descritos en el presente documento proporcionan una mejor detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado en comparación con frotis de Pap y/o ensayos de infección por VPH. En aspectos particulares de la invención, la sensibilidad y especificidad de los métodos de la presente invención son iguales a o superiores
35 que los de los frotis de Pap convencionales. Como se usa en el presente documento, "especificidad" se refiere al nivel al cual un método de la invención puede identificar con precisión muestras que se han confirmado como NIL por colposcopia (es decir negativos verdaderos). Esto es, especificidad es la proporción de negativos a enfermedad que son negativos a ensayo. En un estudio clínico, la especificidad se calcula dividiendo el número de negativos verdaderos entre la suma de negativos verdaderos y positivos falsos. Por "sensibilidad" se entiende el nivel al cual el método de la invención puede identificar con precisión muestras que se han confirmado como positivas por
40 colposcopia para enfermedad de cuello uterino de alto grado (es decir, positivos verdaderos). Por tanto, la sensibilidad es la proporción de positivos a enfermedad que es positivo a ensayo. En un estudio clínico, la sensibilidad se calcula dividiendo el número de positivos verdaderos entre la suma de positivos verdaderos y negativos falsos. Véanse los Ejemplos 1-3 más adelante. En algunas realizaciones, la sensibilidad de los métodos descritos para la detección de una enfermedad de cuello uterino de alto grado es al menos del 90, 91, 92, 93, 94, 95,
45 96, 97, 98, 99% o más. Adicionalmente, la especificidad de los métodos de la presente invención es preferentemente al menos un 85%, más preferentemente al menos aproximadamente un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más.

50 La expresión "valor predictivo positivo" o "VPP" se refiere a la probabilidad de que una paciente posea una enfermedad de cuello uterino de alto grado cuando se limita a esos pacientes que se han clasificado como positivos usando un método de la invención. En un estudio clínico, el VPP se calcula dividiendo el número de positivos verdaderos entre la suma de positivos verdaderos y positivos falsos. En algunas realizaciones, el VPP de un método de la invención, para diagnosticar una enfermedad de cuello uterino de alto grado, es de al menos aproximadamente 40% manteniendo al mismo al tiempo una sensibilidad de al menos 90%, más particularmente al menos 95%. El
55 "valor predictivo negativo" o "VPN" de un ensayo, es la probabilidad de que una paciente no tenga la enfermedad cuando se limita a todos los pacientes que son negativos al ensayo. En un estudio clínico, el VPN se calcula dividiendo el número de negativos verdaderos entre la suma de negativos verdaderos y negativos falsos.

60 Los biomarcadores descritos en el presente documento incluyen genes y proteínas, y variantes y fragmentos de los mismos. Tales biomarcadores incluyen ADN que comprende la secuencia total o parcial de la secuencia de ácido nucleico que codifica al biomarcador o el complemento de tal secuencia. Los ácidos nucleicos del biomarcador también incluyen ARN que comprende la secuencia total o parcial de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de interés. Una proteína biomarcadora es una proteína codificada por o correspondiente a un biomarcador de ADN. Una proteína biomarcadora comprende la secuencia total o parcial de aminoácidos de cualquiera de las proteínas o
65 polipéptidos biomarcadores.

Un "biomarcador" es cualquier gen o proteína cuyo nivel de expresión en un tejido o célula está modificado en comparación con el de una célula o tejido normal o sano. Los biomarcadores MCM2 y Topo2A, en los que se basa la presente invención, son selectivos para enfermedades de cuello uterino de alto grado subyacentes. Por "sobrexpresado selectivamente en enfermedades de cuello uterino de alto grado" se entiende que el biomarcador de interés se sobreexpresa en enfermedades de cuello uterino de alto grado pero no se sobreexpresa en afecciones clasificadas como LSIL, CINI, muestras infectadas por el VPH sin presencia de displasia, células metaplásicas inmaduras y otras afecciones que no se consideran que son enfermedades clínicas. Por tanto, la detección de los biomarcadores permite la diferenciación de muestras indicativas de enfermedades de cuello uterino de alto grado subyacentes procedentes de muestras que son indicativas de proliferación benigna, infección por el VPH en fase temprana o displasia leve. Por "infección por el VPH en fase temprana" se entiende infección por el VPH que no ha progresado a displasia de cuello uterino. Como se usa en el presente documento, "displasia leve" se refiere a LSIL y CINI donde no está presente ninguna lesión de alto grado. Los métodos de la invención también distinguen células indicativas de enfermedades de alto grado de células normales, células metaplásicas inmaduras y otras células que no son indicativas de enfermedades clínicas. De esta manera, los métodos de la invención permiten identificar con precisión enfermedades de cuello uterino de alto grado, incluso en casos erróneamente clasificados como normales, CINI, LSIL o ASCUS por ensayo Pap tradicional (es decir, "negativos falsos"). En algunas realizaciones, los métodos para diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado se realizan en respuesta a un frotis Pap anómalo o atípico. Es decir, los métodos de la invención pueden realizarse en respuesta a una paciente que posee un resultado de frotis Pap anómalo o atípico. En otros aspectos de la invención, los métodos se realizan como un ensayo de exploración primario para detectar enfermedades de cuello uterino de alto grado en la población general de mujeres, exactamente como actualmente se realiza el ensayo Pap convencional.

Los biomarcadores descritos en el presente documento pueden identificar células, en una suspensión celular citológica, que sean premalignas, malignas o claramente cancerosas. Los biomarcadores en los que se basa la invención detectan células de afecciones CINII y citadas anteriormente, pero no detectan CINI ni células infectadas por el VPH en las que no hay enfermedad de alto grado subyacente. Los biomarcadores descritos en el presente documento incluyen genes y proteínas implicados en la regulación del ciclo celular, interrupción del ciclo celular del VPH, replicación y transcripción del ADN y transducción de señal. Algunos de los biomarcadores descritos en el presente documento son genes de la fase S, incluyendo aquellos genes cuya expresión estimula el factor de transcripción E2f o el factor de transcripción Sp-1. Para la realización práctica de determinados aspectos de la descripción pueden usarse biomarcadores nucleares. Por "biomarcador nuclear" se entiende un biomarcador que se expresa predominantemente en el núcleo de la célula. Un biomarcador nuclear puede expresarse a un menor grado en otras partes de la célula.

Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) desempeñan una función esencial en la replicación de ADN eucariota. Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) actúan en las etapas tempranas de la replicación del ADN cargando el complejo pre-replicativo sobre el ADN y actúan como una helicasa para ayudar a desenrollar el ADN dúplex durante la síntesis de *nov*o de la cadena de ADN duplicada. Cada una de las proteínas MCM posee motivos de ATPasa dependientes de ADN en su dominio central altamente conservado. Los niveles de proteínas MCM generalmente aumentan de una manera variable a medida que las células normales avanzan de la fase G0 a la fase G1/S del ciclo celular. En la fase G0, las proteínas MCM2 y MCM5 son mucho menos abundantes que las proteínas MCM7 y MCM3. MCM6 forma un complejo con MCM2, MCM4 y MCM7, que se une a histona H3. Además, el subcomplejo de MCM4, MCM6 y MCM7 posee actividad helicasa, que está mediada por la actividad de unión al ATP de la MCM6 y la actividad de unión al ADN de la MCM4. Véase, por ejemplo, Freeman et al. (1999) Clin. Cancen Res. 5:2121-2132; Lei et al. (2001) J. Cell Sci. 114:1447-1454; Ishimi et al. (2003) Eur. J. Biochem. 270:1089-1101.

Publicaciones antiguas han demostrado que las proteínas MCM, y en particular, la MCM-5, son útiles para detección de enfermedades de cuello uterino (Williams et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95:14932-14937), así como de otros cánceres (Freeman et al. (1999) Clin Cancer Res. 5:2121-2132). La bibliografía publicada indica que los anticuerpos contra MCM-5 son capaces de detectar células neoplásicas de cuello uterino. La especificidad para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado no se ha demostrado para la MCM-5 (Williams et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95:14932-14937). La detección de la expresión de MCM-5 no está limitada a enfermedades de cuello uterino de alto grado sino que también se detecta en displasia de bajo grado identificada y en células proliferativas que han vuelto a entrar en el ciclo celular después de infección por VPH de alto riesgo. En la Figura 4 se muestra la detección de neoplasia de cuello uterino con anticuerpos contra MCM-5. Además de MCM-5, otros miembros de la familia de MCM, incluyendo MCM-2 y MCM-7, han demostrado ser marcadores potencialmente útiles para la detección de neoplasia de cuello uterino en muestras de tejido (Freeman et al. (1999) Clin Cancer Res. 5:2121-2132; Brake et al. (2003) Cancer Res. 63:8173-8180). Resultados recientes han demostrado que, usando formatos inmunoquímicos, la MCM-7 parece ser un marcador específico para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado (Brake et al. (2003) Cancer Res. 63:8173-8180; Malinowski et al. (2004) Acta Cytol. 43:696).

La topoisomerasa II alfa (Topo2a) es una enzima nuclear esencial implicada en la replicación del ADN y es una diana para muchos fármacos anticancerosos usados para la terapia contra el cáncer. La expresión disminuida de Topo2a es un mecanismo predominante de resistencia frente a diversos agentes quimioterapéuticos. Una variación

significativa en el intervalo de expresión de esta proteína se ha observado en muchos tumores diferentes. Topo2a es predominante en células proliferativas y se modifica en la fase M por fosforilación en sitios específicos, lo que es crítico para la condensación y segregación del cromosoma durante la mitosis.

La proteína p21 es una proteína codificada por el gen WAF1/Cip1 en el cromosoma 6p. Se ha demostrado que este gen inhibe la actividad de diversos complejos ciclina/quinasa dependientes de ciclina y bloquean la progresión del ciclo celular. La expresión de p21^{WAF1} media la función de detención del ciclo celular de p53. Dado que p21 parece mediar varias de las funciones reguladoras del crecimiento de p53, su expresión puede reflejar el estado funcional de p53 más exactamente que la acumulación de p53. Además, p21^{WAF1} puede inhibir la replicación de ADN bloqueando la acción del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

La ciclina E es una subunidad reguladora de cdk-2 y controla la transición de G1/S durante el ciclo celular de mamíferos. Isoformas múltiples de Ciclina E se expresan sólo en tumores pero no en tejidos normales, lo que sugiere una regulación post-transcripcional de la Ciclina E. En análisis realizados *in vitro* se indica que estas isoformas variantes de Ciclina E truncadas pueden fosforilar la histona H1. Modificaciones en proteínas de Ciclina E se han implicado como indicadores de mal pronóstico en diversos cánceres.

Otros biomarcadores de interés incluyen genes regulados por el ciclo celular que son específicos para el límite de la fase G1/S o para la fase S. Tales genes incluyen, pero sin limitación, helicasa (DDX11), uracil ADN glucolasa (UNG), E2F5, ciclina E1 (CCNE1), ciclina E2 (CCNE2), CDC25A, CDC45L, CDC6, p21 WAF-1(CDKN1A), CDKN3, E2F1, MCM2, MCM6, NPAT, PCNA, tallo-lazo PB (SLBP), BRCA1, BRCA2, CCNG2, CDKN2C, dihidrofolato reductasa (DHFR), histona H1, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, MSH2, NASP, ribonucleótido reductasa M1 (RRM1), ribonucleótido reductasa M2 (RRM2), timidina sintetasa (TYMS), factor de replicación C4 (RFC4), RAD51, Factor 1A de cromatina (CHAF1A), Factor 1B de cromatina (CHAF1B), topoisomerasa III (TOP3A), ORC1, primasa 2A (PRIM2A), CDC27, primasa 1 (PRIM1), endonucleasa de estructura flap (FEN1), anemia de fanconi comp. grp A (FNACA), PKMYT1 y la proteína de replicación A2 (RPA2). Véase, por ejemplo, Whitfield et al. (2002) Mol. Biol. Cell 13:1977-2000. Otros genes de fase S de interés incluyen quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2), MCM3, MCM4, MCM5, ADN polimerasa I alfa (ADN POL1), ADN ligasa 1, B-Myb, ADN metil transferasa (ADN MET), pericentrina (PER), KIF4, DP-1, ID-3, proteína de unión a RAN (RANBP1), alfa 6 de unión comunicante (GJA6), aminolevulinato deshidratasa (ALDH), histona 2A Z (H2A.Z), espermina sintasa (SpmS), proliferina 2, proteína de activación de linfocitos T, fosfolipasa A2 (PLA2) y antígeno L6 (L6). Véase, por ejemplo, Nevins et al. (2001) Mol. Cell. Biol. 21:4689-4699.

También se describen genes biomarcadores que están inducidos por el factor de transcripción E2f. Tales genes incluyen, pero sin limitación, timidilato sintasa, timidina quinasa 1, ribonucleótido reductasa M1, ribonucleótido reductasa M2, CDK2, ciclina E, MCM3, MCM7, PCNA, subunidad pequeña de ADN primasa, topoisomerasa II A (Topo2A), ADN ligasa 1, endonucleasa flap 1, RAD51, CDC2, ciclina A2, ciclina B1, ciclina B2, KI-67, KIFC1, FIN16, BUB1, importina alfa-2, HMG2, potenciador de zeste, STK-1, BP tallo-bucle histona, Rb, P18-INK4C, annexina VIII, c-Myb, CDC25A, ciclina D3, ciclina E1, desoxicitosina quinasa, DP-1, enzima convertidora de endotelina, enolasa 2, P18 INK4C, ribonucleótido reductasa y uracil-ADN-glucolasa 2. Véase, por ejemplo Nevins *et al.*, anteriormente citados; Muller et al. (2000) Genes y Dev. 15:267-285. También se describe un biomarcador de interés que es un gen inducido por el factor de transcripción E2f que está implicado en la regulación del ciclo celular y en la replicación del ADN, tales como, por ejemplo, ciclina E2, Ki-67, p57KIP2, RANBPM y la proteína de replicación A1. Algunos genes de interés inducidos por E2f están implicados en la apoptosis, incluyendo APAF1, Bcl-2, caspasa 3, MAP3 quinasa 5 y el factor asociado al receptor del TNF. Otros genes inducidos por E2f están implicados en la regulación de la transcripción e incluyen, por ejemplo, el polihomeótico 2 similar a ash2, la proteína ectodérmica embrionaria, el potenciador de zeste, hairy/potenciador de división, homeocaja A10, homeocaja A7, homeocaja A9, homeodominio TF1, leucemia pre-cel_Bi FT3, YY1 TF, dominio POU TF, TAFII130, factor TBP 172, TF3 básico, bromodominio/dedo de zinc, SWI/SNF, ID4, TEA-4, NFATC1, NFATC3, BT, CNC-1, MAF, MAFF, MAFG, proteína de unión al núcleo, factor 4 similar a E74, c-FOS, JUNB, BP ADN dedo de zinc, y transactivador de Cbp/p300. Los genes inducidos por E2f implicados en la transducción de señal también son biomarcadores potenciales de interés e incluyen TGF beta, follistatina, proteína morfogenética ósea 2, receptor de BMP de tipo 1A, homólogo frizzled 1, WNT10B, esfingosina quinasa 1, fosfatasa 7 de especificidad dual, fosfatasa (Y) de especificidad dual, Receptor 3 del FGF, proteína tirosina fosfatasa, fosfatasa (Y) de especificidad dual D6655, receptor de insulina, proliferación 1 de linfocitos T maduros, receptor 2 del FGF, TGF alfa, proteína 3 efectora CDC42, Met, CD58, CD83, TACC1 y TEAD4.

Aunque para la detección de una enfermedad de cuello uterino de alto grado los métodos de la invención requieren la detección de al menos dos biomarcadores MCM2 y Topo2A en una muestra procedente de una paciente, para la realización práctica de la presente invención pueden usarse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más biomarcadores. Se reconoce que, para identificar casos de enfermedades de cuello uterino de alto grado, en una muestra corporal, puede usarse la detección de más de los dos biomarcadores MCM2 y Topo2A. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se usan más de dos biomarcadores, más preferentemente, más de dos biomarcadores complementarios. Por "complementario" se entiende que la detección de la combinación de biomarcadores en una muestra corporal da como resultado la identificación satisfactoria de una enfermedad de cuello uterino de alto grado con un mayor porcentaje de casos de los que podrían identificarse si sólo se usase uno de los biomarcadores. Por tanto, una determinación más exacta de una enfermedad de cuello uterino de alto grado se realiza usando al menos los dos biomarcadores MCM2 y Topo2A.

Por consiguiente, cuando para la realización práctica de los métodos inmunocitoquímicos descritos en el presente documento se usan al menos dos biomarcadores, se usarán al menos dos anticuerpos dirigidos contra proteínas biomarcadoras distintas. Los anticuerpos pueden ponerse en contacto con la muestra corporal simultánea o conjuntamente. En la invención, la sobreexpresión de MCM2 y de Topo2A se detecta usando tres anticuerpos, en el que dos de los anticuerpos son específicos para MCM2 y el tercer anticuerpo es específico para Topo2A.

Los métodos de diagnóstico de la invención comprenden poner en contacto una muestra corporal, procedente de una paciente, al menos con tres anticuerpos, en el que un primer y un segundo anticuerpo se unen específicamente a MCM2 y un tercer anticuerpo se une a Topo2A y detectar la unión de los anticuerpos. Las muestras que presentan sobreexpresión de los biomarcadores MCM2 y Topo2A, determinada por la detección de la unión de los anticuerpos, se consideran positivas para una enfermedad de cuello uterino de alto grado. En realizaciones particulares, la muestra corporal es una monocapa de células de cuello uterino. En algunos aspectos de la invención, la monocapa de células de cuello uterino se proporciona en un portaobjetos de vidrio.

Por "muestra corporal" se entiende cualquier muestreo de células, tejidos o líquidos corporales en los que pueda detectarse la expresión de un biomarcador. Son ejemplos de tales muestras corporales los que incluyen, pero sin limitación, sangre, linfa, orina, líquidos ginecológicos, biopsias y frotis. Las muestras corporales pueden obtenerse de una paciente mediante una diversidad de técnicas que incluyen, por ejemplo, raspado o frotis de un área o usando una aguja para aspirar líquidos corporales. En la materia se conocen bien métodos para recoger diversas muestras corporales. En realizaciones particulares, la muestra corporal comprende células de cuello uterino, como muestras de tejido de cuello uterino o como células en suspensión de cuello uterino, particularmente en una preparación basada en líquido. En una realización, las muestras de cuello uterino se recogen siguiendo las directrices de preparación de especímenes citológicos basados en líquido, tales como, por ejemplo, la preparación SurePath[®] (TriPath Imaging, Inc.) o ThinPrep[®] (CYTYC, Inc.). Las muestras corporales pueden transferirse a un portaobjetos de vidrio para observar al microscopio. En el portaobjetos de vidrio a las células pueden aplicarse soluciones fijadoras y colorantes para conservar el espécimen y para facilitar el examen. En una realización, la muestra de cuello uterino se extraerá y se procesará para proporcionar una muestra en monocapa, como se expone en la Patente de Estados Unidos N° 5.346.831.

El método en monocapa se refiere a un método que produce una monocapa de material citológico sobre un sustrato cargado con cationes. El método comprende las etapas de separar el material citológico por centrifugación sobre un gradiente de densidad, producir un sedimento compacto del material citológico, mezclar el sedimento del material citológico, extraer una alícuota de un volumen predeterminado del sedimento mixto, depositar la alícuota y un volumen predeterminado de agua en un recipiente de sedimentación, que puede fijarse de manera extraíble al sustrato cargado con cationes, permitiendo que - debido a la fuerza gravedad- el material citológico se asiente sobre el sustrato, y después del asentamiento del material citológico, eliminar el agua del recipiente de sedimentación. Para un análisis automatizado, el recipiente de sedimentación puede desprenderse del sustrato. La desagregación puede realizarse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia, tal como mediante inyección con jeringa, tripsinización, ultrasonido, agitación, agitación vorticial o usando el dispositivo descrito en la Patente relacionada de Estados Unidos 5.316.814. En algunas realizaciones, los portaobjetos que comprenden una monocapa de células de cuello uterino se preparan a partir de muestras SurePath[™] (TriPath Imaging, Inc.) usando el procesador de portaobjetos PrepStain[™] (TriPath Imaging, Inc.).

La sobreexpresión de un biomarcador puede detectarse sobre un nivel de ácido nucleico o de proteína. Para determinar la sobreexpresión, la muestra corporal a examinar puede compararse con una muestra corporal correspondiente que se origina de una persona sana. Es decir, el nivel de expresión "normal" es el nivel de expresión del biomarcador en las células de cuello uterino de un sujeto humano o de una paciente que no padece una enfermedad de cuello uterino de alto grado. Tal muestra puede estar presente en forma convencional. En algunas realizaciones, particularmente cuando la muestra corporal comprende una monocapa de células de cuello uterino, la determinación de la sobreexpresión del biomarcador no requiere la comparación entre la muestra corporal y una muestra corporal correspondiente que se origina de una persona sana. En esta situación, la monocapa de células de cuello uterino de un solo paciente puede contener solo 1-2 células anómalas por 50.000 células normales presentes. La detección de estas células anómalas, identificadas por la sobreexpresión de los biomarcadores MCM2 y Topo2A, excluye la necesidad de comparar con una muestra corporal correspondiente que se origina de una persona sana.

Los métodos para detectar biomarcadores comprenden cualquiera de los métodos que determinen la cantidad o la presencia de los biomarcadores bien a nivel de ácido nucleico o bien a nivel de proteína. Tales métodos se conocen bien en la materia e incluyen, pero sin limitación, transferencias de western, transferencias de Northern, transferencias de Southern, ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunocitoquímica, técnicas de hibridación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa de ácido nucleico y métodos de amplificación de ácido nucleico. De acuerdo con la invención, la sobreexpresión de los biomarcadores MCM2 y Topo2A se detecta a nivel de proteína usando anticuerpos que se dirigen contra estas proteínas biomarcadoras específicas. Estos anticuerpos pueden usarse en diversos métodos tales como transferencia de Western, ELISA, inmunoprecipitación o técnicas de inmunocitoquímica. Del mismo modo, la inmunotinción de frotis de cuello uterino puede combinarse con métodos de tinción Pap convencionales de manera que pueda obtenerse

información morfológica e información inmunocitoquímica. De esta manera, la detección de los biomarcadores puede reducir el elevado índice de negativos falsos del ensayo del frotis Pap y puede facilitar la exploración masiva automatizada.

De acuerdo con la invención, los al menos tres anticuerpos específicos para las proteínas biomarcadoras MCM2 y Topo2A se utilizan para detectar la sobreexpresión de dichas proteínas biomarcadoras en una muestra corporal. El método comprende poner en contacto una muestra corporal de una paciente al menos con tres anticuerpos, en el que un primer y segundo anticuerpo se unen específicamente a MCM2 y un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A, que son biomarcadores sobreexpresados selectivamente en enfermedades de cuello uterino de alto grado y detectar la unión de los anticuerpos para determinar si los biomarcadores se sobreexpresan en la muestra del paciente. Un aspecto preferido de la invención proporciona una técnica inmunocitoquímica para el diagnóstico de enfermedades de cuello uterino de alto grado. Un experto en la materia reconocerá que el método inmunocitoquímico descrito a continuación en el presente documento puede realizarse manualmente o de una manera automatizada usando, por ejemplo, el Sistema de Tinción Universal Autostainer (Dako) o el Biocare Nemesys Autostainer (Biocare). En el Ejemplo 1 se proporciona un protocolo para la tinción de anticuerpos (es decir, inmunocitoquímica) de muestras de cuello uterino.

En un método inmunocitoquímico, en un medio líquido, tal como, por ejemplo, en un vial de recogida SurePath™ (TriPath Imaging, Inc.) se recoge una muestra de cuello uterino de una paciente. Para recoger células procedentes del medio líquido y para depositarlas en una capa fina sobre un portaobjetos de vidrio para análisis posterior se usa un procesador automatizado, tal como el sistema PrepStain™ (TriPath Imaging, Inc.). Los especímenes del portaobjetos pueden fijarse o no y pueden analizarse inmediatamente después de la preparación o pueden conservarse para análisis posterior. Los portaobjetos preparados pueden conservarse en etanol al 95% durante un mínimo de 24 horas. Como alternativa, los portaobjetos pueden conservarse en un tampón de tratamiento previo tal y como se describe más adelante.

Puede ser necesario modificar las muestras para hacer que los antígenos biomarcadores sean accesibles a la unión del anticuerpo. En un aspecto particular de los métodos inmunocitoquímicos, los portaobjetos se transfieren a un tampón de tratamiento previo, por ejemplo el Tampón de Preparación SureSlide® (TriPath Imaging, Inc.) y opcionalmente se calientan para aumentar la accesibilidad del antígeno. El calentamiento de la muestra en el tampón de tratamiento previo altera rápidamente la bicapa lipídica de las células y hace que los antígenos (es decir las proteínas biomarcadoras) sean más accesibles para la unión del anticuerpo. El tampón de tratamiento previo puede comprender un polímero, un detergente, o un tensioactivo no iónico o aniónico, tal como, por ejemplo, un tensioactivo aniónico o no aniónico etoxilado, un alcanoato o un alcoxilato o incluso mezclas de estos tensioactivos incluso el uso de una sal biliar. El tampón de tratamiento previo puede comprender un detergente no iónico o aniónico, tal como alcanoato sódico con un peso molecular aproximado de 183 kD mezclado con un alcoxilato con un peso molecular aproximado de 370 kD (en lo sucesivo el presente documento denominado RAM). El tampón de tratamiento previo puede comprender RAM al 1%. El tampón de tratamiento previo también puede usarse como un tampón de conservación de portaobjetos, como se ha indicado anteriormente. Puede usarse una solución del 0,1% al 1% de ácido desoxicólico, sal de sodio, monohidrato tanto para un tampón de conservación así como para un tampón de tratamiento previo. Para los tampones de conservación y de tratamiento previo, puede usarse una solución de laurth-13-carboxilato sódico (por ejemplo Sandopan LS) o un complejo aniónico etoxilado o incluso un ácido carboxílico alquilaril etoxilado. El tampón de tratamiento previo para portaobjetos puede comprender del 0,05% al 5% de laurth-13-carboxilato sódico, particularmente del 0,1% al 1% de laurth-13-carboxilato sódico, más particularmente el 0,5% de laurth-13-carboxilato sódico. Los portaobjetos pueden conservarse en el tampón durante un tiempo de hasta 72 horas antes del proceso de tratamiento previo y de tinción. En un inmunoensayo, tal como, por ejemplo, un método inmunocitoquímico o inmunohistoquímico, los tampones de tratamiento previo pueden usarse en métodos para hacer que los antígenos sean más accesibles para la unión del anticuerpo. Véase el Ejemplo 14. Las expresiones “tampón de tratamiento previo” y “tampón de preparación” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un tampón que se usa para preparar muestras citológicas o histológicas para inmunotinción, particularmente aumentando la accesibilidad del antígeno para la unión del anticuerpo.

En la realización práctica de la invención puede usarse cualquier método para hacer que los antígenos sean más accesibles para la unión del anticuerpo, incluyendo los métodos de recuperación de antígenos conocidos en la materia. Véanse, por ejemplo, Bibbo et al. (2002) Acta. Cytol. 46: 25-29; Saqi et al. (2003) Diagn. Cytopathol. 27: 365-370; Bibbo et al. (2003) Anal. Quant. Cytol. Histol. 25: 8-11. En algunas realizaciones, la recuperación de antígenos comprende conservar los portaobjetos en etanol al 95% durante al menos 24 horas, sumergir los portaobjetos en un baño de Solución de Recuperación Diana 1X, pH 6,0, (DAKO S1699)/dH₂O precalentado a 95 °C y colocar los portaobjetos en un vaporizador durante 25 minutos. Véase el Ejemplo 2 más adelante.

Después del tratamiento previo o de la recuperación del antígeno para aumentar la accesibilidad del antígeno, las muestras se bloquean usando un agente bloqueador apropiado, por ejemplo, un reactivo bloqueador de peroxidasa tal como peróxido de hidrógeno. En algunas realizaciones, para impedir la unión no específica del anticuerpo, las muestras se bloquean usando un reactivo bloqueador de proteína. El reactivo bloqueador de proteína puede comprender, por ejemplo, caseína purificada. Después, un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal, dirigido contra un biomarcador de interés, se incuba con la muestra. Como se ha indicado anteriormente, un experto en la materia apreciará que, en algunos casos, puede obtenerse un diagnóstico más preciso de una enfermedad de

cuello uterino de alto grado, detectando más de un biomarcador en una muestra de una paciente. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, para detectar una enfermedad de cuello uterino de alto grado se usa al menos tres anticuerpos, en el que un primer y segundo anticuerpo se unen específicamente a MCM2 y un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A. Cuando se usa más de un anticuerpo, estos anticuerpos pueden añadirse a una sola muestra secuencialmente como reactivos de anticuerpos individuales o de manera simultánea como un cóctel de anticuerpos. Véase el Ejemplo 3 más adelante. Como alternativa, cada anticuerpo individual puede añadirse a una muestra específica del mismo paciente y agruparse los datos resultantes. En realizaciones particulares, un cóctel de anticuerpos comprende al menos los tres anticuerpos, en el que dos anticuerpos se unen específicamente a MCM2 y un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A.

En la materia se conocen bien técnicas para detectar la unión de anticuerpos. La unión de anticuerpos a un biomarcador de interés puede detectarse usando reactivos químicos que generan una señal detectable que corresponde al nivel de unión del anticuerpo y, por consiguiente, al nivel de expresión de proteína biomarcadora. En uno de los métodos inmunocitoquímicos de la invención, la unión al anticuerpo se detecta usando un anticuerpo secundario que se conjuga con un polímero marcado. Los ejemplos de polímeros marcados incluyen, pero sin limitación, conjugados de polímero-enzima. Las enzimas, en estos complejos, se usan típicamente para catalizar la deposición de un cromógeno en el sitio de unión del antígeno al anticuerpo, por lo que da como resultado una tinción celular que corresponde al nivel de expresión del biomarcador de interés. Las enzimas de interés particular incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Para la realización práctica de la presente invención pueden usarse sistemas de detección de anticuerpos comerciales, tales como, por ejemplo, el sistema Envision+ de Dako y el sistema Mach 3 de Biocare Medical.

En un método inmunocitoquímico particular de la invención, la unión de anticuerpos a un biomarcador se detecta usando un polímero marcado con HRP que está conjugado a un anticuerpo secundario. La unión al anticuerpo también puede detectarse usando un reactivo sonda de ratón, que se une a anticuerpos monoclonales de ratón y un polímero conjugado a HRP, que se une al reactivo sonda de ratón. Los portaobjetos se tiñen para la unión del anticuerpo usando el cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) y después se tiñen con un colorante de contraste con hematoxilina y, opcionalmente, con un agente colorante azul tal como hidróxido de amonio o TBS/Tween-20. En algunos aspectos de la invención, un citólogo y/o un patólogo observa los portaobjetos al microscopio para evaluar la tinción celular (es decir, la sobreexpresión del biomarcador) y para determinar si existe una enfermedad de cuello uterino de alto grado. Como alternativa, las muestras pueden observarse por microscopía automatizada o por personal con la ayuda de un programa informático por ordenador que facilita la identificación de células con tinción positiva.

Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen ampliamente formas de origen natural de anticuerpos y anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos así como fragmentos y derivados de todo lo anterior, cuyos fragmentos y derivados poseen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpo pueden comprender una proteína o un resto químico conjugado al anticuerpo.

Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” (Igs) son glucoproteínas que poseen las mismas características estructurales. Si bien los anticuerpos muestran una especificidad de unión hacia un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad hacia un antígeno. Los polipéptidos de esta última clase se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a altos niveles por los mielomas.

El término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio e abarca anticuerpos totalmente ensamblados, fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a un antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos) y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades mínimas.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062); moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que posee dos sitios de combinación con el antígeno y todavía es capaz de presentar reacción cruzada con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. En una especie Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en íntima asociación no covalente. En una especie Fv monocatenaria, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible de manera que las cadenas pesada y ligera pueden asociarse en una estructura dimérica “análoga” a la de una especie Fv bicatenaria. Es en esta configuración en la que tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. En su conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene una capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una menor afinidad a la del sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio C_{H1} de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. En la presente memoria, Fab'-SH es la denominación para Fab' en el que el resto (o los restos) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que poseían entre ellos cisteínas de la región bisagra.

Los anticuerpos policlonales pueden prepararse inmunizando un sujeto adecuado (por ejemplo, un conejo, cabra, ratón u otro mamífero) con un inmunógeno de proteína biomarcadora. La titulación del anticuerpo en el sujeto inmunizado puede monitorizarse con el paso del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando una proteína biomarcadora inmovilizada. A un tiempo apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando las titulaciones del anticuerpo son más elevadas, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse a partir del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales por técnicas convencionales, tales como la técnica del hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4: 72), la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al. (1985) in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld y Sell (Alan R. Liss, Inc., Nueva York, NY), págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas se conoce bien (véase, en líneas generales, Coligan et al., eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY); Galfre et al. (1977) *Nature* 266: 550-52; Kenneth (1980) in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses* (Plenum Publishing Corp., NY); y Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54: 387-402).

Como alternativa a la preparación de hibridomas secretores de anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal puede identificarse y aislarse explorando una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos) con una proteína biomarcadora para aislar así miembros de la biblioteca de inmunoglobulina aislados que se unen a la proteína biomarcadora. En el mercado se encuentran disponibles kits para generar y explorar bibliotecas de presentación de fagos (por ejemplo, the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; y the Stratagene *SurfZAP9 Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). Adicionalmente, ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para usar en la generación y exploración de bibliotecas de presentación de anticuerpos pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; en las Publicaciones PCT N° WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; 93/01288; WO 92/01047; 92/09690; y 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12: 725-734.

La detección de la unión de anticuerpos puede facilitarse acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina, ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriacilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales luminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de materiales radioactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, o ³H.

Con respecto a la detección de la tinción de anticuerpos en los métodos inmunocitoquímicos de la invención, también existen en la materia, métodos vídeo microscópicos e informáticos para la determinación cuantitativa de una cantidad de especies moleculares múltiples (por ejemplo, proteínas biomarcadoras) en una muestra biológica en la que cada especie molecular presente se indica por un marcador colorante representativo que posee un color específico. Tales métodos también se conocen en la materia como métodos de análisis colorimétrico. En estos métodos, para proporcionar una imagen de la muestra biológica después de que se ha teñido, se usa la vídeo microscopía para indicar visualmente la presencia de un biomarcador de interés particular. Algunos de estos métodos, tales como los descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 09/957.446 de Marcelpoil et al. y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 10/057.729 de Marcelpoil et al., describen el uso de un sistema de formación de imágenes y un programa informático asociado para determinar las cantidades relativas de cada

especie molecular presente basándose en la presencia de marcadores de tinte de color representativos como se indica por los valores de densidad óptica o transmitancia de los marcadores de tinte de color, respectivamente, determinado por un sistema de formación de imágenes y programas informáticos asociados. Estas técnicas proporcionan determinaciones cuantitativas de las cantidades relativas de cada especie molecular en una muestra biológica teñida usando una sola imagen de vídeo que se “deconstruye” en sus partes de componente de color.

Los anticuerpos usados para la realización práctica de la invención se seleccionan por tener alta especificidad por las proteínas biomarcadoras de interés. En la materia se conocen métodos para preparar anticuerpos y para seleccionar anticuerpos apropiados. Véase, por ejemplo, Celis, ed. (publicado) Cell Biology & Laboratory Handbook, 3ª edición (Academic Press, Nueva York). En algunas realizaciones, para la realización práctica de la invención pueden usarse anticuerpos comerciales dirigidos contra proteínas biomarcadoras específicas. Los anticuerpos de la invención pueden seleccionarse basándose en la tinción deseable de muestras citológicas, en lugar de histológicas. Esto es, en realizaciones particulares los anticuerpos se seleccionan teniendo en cuenta el tipo de muestra final (es decir, preparaciones citológicas) y la especificidad de unión.

Los anticuerpos dirigidos contra biomarcadores específicos de interés pueden seleccionarse y purificarse mediante un proceso de exploración multietapa. Pueden explorarse polidomas para identificar anticuerpos específicos de biomarcadores que posean los rasgos de especificidad y sensibilidad deseados. Como se usa en el presente documento, "polidoma" se refiere a hibridomas múltiples. Los polidomas se proporcionan típicamente en placas de cultivo tisular multipocillo. En la etapa inicial de exploración de anticuerpos, se genera una micromatriz tisular tumoral que comprende muestras múltiples, normales (es decir, no CIN), CINIII, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma. En la materia se conocen bien métodos y equipos, tales como Chemicon® Advanced Tissue Arrayer, para generar matrices de tejidos múltiples en un solo portaobjetos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.820.504. Los sobrenadantes no diluidos de cada pocillo que contienen un polidoma se someten a ensayo para detectar la tinción positiva usando técnicas inmunohistoquímicas convencionales. En esta etapa de exploración inicial, la unión no específica, fondo, básicamente se ignora. Los polidomas que producen resultados positivos se seleccionan y se usan en la segunda fase de exploración de anticuerpos.

En la segunda etapa de exploración, los polidomas positivos se someten a un proceso de dilución limitante. Los anticuerpos no explorados resultantes se someten a ensayo para detectar la tinción positiva de muestras de CINIII o carcinoma de cuello uterino usando técnicas inmunohistoquímicas convencionales. En esta fase, la tinción de fondo es relevante y solo se seleccionan los polidomas candidatos con tinción positiva para células anómalas (es decir, células CINIII y cancerosas) para análisis posterior.

Para identificar anticuerpos que puedan distinguir muestras normales y CINI de las que son indicativas de enfermedad de cuello uterino del alto grado (es decir, CINII y anteriores), se genera un micromatriz tisular de tipo panel de enfermedades. Esta micromatriz tisular comprende típicamente muestras múltiples no CIN, CINI, CINII, CINIII, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma. Las técnicas inmunohistoquímicas convencionales se emplean para someter a ensayo polidomas candidatos para detectar tinción positiva específica solo de muestras indicativas de enfermedades de cuello uterino de alto grado (es decir, muestras CINII y anteriores). Los polidomas que producen resultados positivos y tinción de fondo mínima se seleccionan para análisis posterior.

Los cultivos de tinción positiva se preparan como clones individuales para seleccionar anticuerpos monoclonales candidatos individuales. En la materia se conocen bien métodos para aislar clones individuales. El sobrenadante de cada clon que comprende anticuerpos no purificados se somete a ensayo para detectar tinción específica de muestras CINII, CINIII, carcinoma de célula escamosa y adenocarcinoma usando las micromatrices tisulares de tipo panel tumorales y de enfermedades descritas anteriormente en el presente documento. Los anticuerpos candidatos que muestran tinción positiva de muestras de enfermedad de cuello uterino de alto grado (es decir, CINII y anteriores), tinción mínima de otros tipos de células (es decir muestras normales y CINI) y escaso fondo se seleccionan para purificación y análisis posterior. En la materia se conocen bien métodos para purificar anticuerpos mediante cromatografía de adsorción por afinidad.

Para identificar anticuerpos que presenten tinción específica máxima de muestras de enfermedad de cuello uterino de alto grado y tinción no específica, de escaso fondo, en muestras citológicas de tinción no específica, los anticuerpos candidatos aislados y purificados en los procesos de exploración anteriores, basados en inmunohistoquímica, se someten a ensayo usando técnicas inmunocitoquímicas. En los Ejemplos 1 y 2 se proporcionan protocolos ejemplares para realizar inmunocitoquímica.

Específicamente, los anticuerpos de interés purificados se usan para someter a ensayo un número estadísticamente significativo de muestras NIL (es decir, lesión no invasiva), ASCUS, LSIL, HSIL o de pacientes con citología de cuello uterino cancerosa. Las muestras se analizan por inmunocitoquímica, como se describe en el presente documento, y se clasifican como positivas, negativas o indeterminadas para una enfermedad de cuello uterino de alto grado basándose en la tinción de anticuerpo positiva para un biomarcador particular. Los valores de sensibilidad, especificidad, predictivos positivos y predictivos negativos para cada anticuerpo se calculan. Se seleccionan los anticuerpos que muestran una tinción específica máxima de enfermedad de cuello uterino de alto grado en muestras citológicas de cuello uterino con fondo mínimo (es decir, proporción de señal con respecto a

interferencia máxima).

La identificación de anticuerpos apropiados da como resultado un aumento en la proporción de señal con respecto a interferencia y un aumento en la utilidad clínica del ensayo. El formato de ensayo y el tipo de muestra a usar son factores críticos en la selección de anticuerpos apropiados. Muchos anticuerpos dirigidos contra biomarcadores no producen una proporción de señal con respecto a interferencia deseable en un formato inmunocitoquímico con preparaciones citológicas o en un formato inmunohistoquímico con muestras incluidas en parafina fijadas con formalina. Además, los anticuerpos biomarcadores que producen una proporción de señal con respecto a interferencia máxima en un formato inmunohistoquímico no pueden funcionar tan bien en ensayos inmunocitoquímicos. Por ejemplo, un anticuerpo que produce el nivel de tinción deseado en un formato inmunocitoquímico puede no producir el nivel de tinción apropiado en un ensayo inmunohistoquímico (datos no mostrados). Del mismo modo, un anticuerpo que produce una proporción aceptable de señal con respecto a interferencia, cuando se usa en el ensayo inmunohistoquímico, puede dar como resultado una sobretinción de las muestras inmunocitoquímicas (datos no mostrados). Por tanto, la selección del anticuerpo requiere una primera consideración del formato de ensayo y del tipo de muestra final a usar.

Los análisis basados en citología (es decir, inmunocitoquímica) se diferencian de los ensayos basados en tejidos (es decir, inmunohistoquímica) en la medida en que la arquitectura tisular no esté disponible para ayudar en la interpretación de la tinción en el formato inmunocitoquímico. Por ejemplo, en un ensayo inmunohistoquímico realizado en muestras procedentes de pacientes con displasia leve o carcinoma de células escamosas con un anticuerpo dirigido contra Claudina 1, el resultado indicó que la Claudina 1 se expresaba en la lesión de la muestra de displasia leve (es decir, tinción de color marrón claro) pero se sobreexpresó significativamente (es decir, tinción de color marrón oscuro) en la lesión cancerosa (Figura 12). Los resultados obtenidos con el mismo anticuerpo dirigido contra Claudina 1 en un formato de ensayo inmunocitoquímico fueron indeterminados (Figura 13). Aunque las células anómalas se detectan fácilmente usando un anticuerpo dirigido contra Claudina 1 en un ensayo inmunohistoquímico, el resultado obtenido por la tinción de Claudina 1 en el ensayo inmunocitoquímico es más difícil de interpretar. Por lo tanto, los biomarcadores que son apropiados en un formato inmunohistoquímico pueden no ser adecuados en un ensayo inmunocitoquímico y, por tanto, no se incluyen en la realización preferida de la presente invención.

Adicionalmente, la localización de los biomarcadores en la célula también es una consideración importante en ensayos inmunocitoquímicos. Los biomarcadores que presentan patrones de tinción nuclear, citoplásmica o de membrana pueden confirmarse morfológicamente y son apropiados para métodos inmunohistoquímicos. La tinción citoplásmica y de membrana, sin embargo, hace difícil identificar características morfológicas críticas de la enfermedad de cuello uterino (por ejemplo, proporción de tinción nuclear respecto a citoplásmica) en ensayos inmunocitoquímicos. Véase la Figura 15. En cambio, los biomarcadores que se expresan en el núcleo y que presentan un modelo de tinción nuclear facilitan la detección de la tinción del anticuerpo y también permiten realizar análisis morfológicos. Véase la Figura 15. Por tanto, en un ensayo inmunocitoquímico de la presente invención, solo se usan biomarcadores que se expresan selectivamente en el núcleo.

Un experto en la materia reconocerá que, para maximizar la proporción de señal con respecto a interferencia para un anticuerpo particular, es necesario maximizar la optimización de la titulación y la detección química del anticuerpo. Las concentraciones de anticuerpo que maximizan la unión específica a los biomarcadores y minimizan la unión no específica (o "fondo") se determinarán. En realizaciones particulares, las titulaciones de anticuerpos apropiadas para su uso en preparaciones citológicas de cuello uterino se determinan inicialmente sometiendo a ensayo diversas diluciones de anticuerpo en muestras tisulares normales y de enfermedad de cuello uterino de alto grado, incluidas en parafina fijadas en formalina. Las concentraciones óptimas de anticuerpo y las condiciones químicas de detección se determinan en primer lugar para las muestras tisulares de cuello uterino incluidas en parafina fijadas en formalina. El diseño de ensayos para optimizar la titulación de anticuerpos y las condiciones de detección es convencional y se encuentra bien dentro de las habilidades rutinarias de los expertos habituales en la materia. Después de determinar las condiciones óptimas para las muestras tisulares fijadas, cada anticuerpo se usa después en preparaciones citológicas de cuello uterino en las mismas condiciones. Algunos anticuerpos requieren optimización adicional para reducir la tinción de fondo y/o para aumentar la especificidad y sensibilidad de la tinción en las muestras citológicas.

Adicionalmente, un experto en la materia reconocerá que la concentración de un anticuerpo particular usado para la realización práctica de los métodos de la invención variará dependiendo de factores tales como el tiempo para la unión, el nivel de especificidad del anticuerpo por la proteína biomarcadora y el método de la preparación de la muestra corporal. Además, cuando se usan anticuerpos múltiples, la concentración necesaria puede estar afectada por el orden en el que se aplican los anticuerpos a la muestra, es decir, simultáneamente como un cóctel o secuencialmente como reactivos de anticuerpos individuales. Además, la detección química usada para visualizar la unión del anticuerpo a un biomarcador de interés también debe optimizarse para producir la proporción de señal con respecto a interferencia deseada.

La expresión de un biomarcador de interés puede detectarse a nivel de ácido nucleico. Las técnicas basadas en ácido nucleico para evaluar la expresión se conocen bien en la materia e incluyen, por ejemplo, determinar el nivel

de ARNm biomarcador en una muestra corporal. Muchos métodos de detección de expresión usan ARN aislado. Para la purificación de ARN procedente de células de cuello uterino puede utilizarse cualquier técnica de aislamiento de ARN que no se seleccione contra el aislamiento del ARNm (véase, por ejemplo, Ausubel et al., ed., (1987-1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York). Adicionalmente, gran cantidad de muestras tisulares pueden procesarse fácilmente usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN de una sola etapa de Chomczynski (1989, Patente de Estados Unidos N° 4.843.155).

El término "sonda" se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse selectivamente a una biomolécula diana específicamente deseada, por ejemplo, un transcrito nucleotídico o una proteína codificada por, o que corresponde a, un biomarcador. Un experto en la materia puede sintetizar sondas o estas pueden derivar de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas pueden diseñarse específicamente para marcarse. Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, pero sin limitación, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos, y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero sin limitación, análisis de Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. Un método para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen a detectar. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas con un ARNm o ADN genómico que codifica un biomarcador. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el biomarcador en cuestión va a expresarse.

El ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo procesando el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm desde el gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. Como alternativa la sonda (o sondas) se inmoviliza en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la sonda (o sondas) por ejemplo, en una matriz de placa génica Affymetrix. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la detección del nivel de ARNm codificado por los biomarcadores.

Un método alternativo para determinar el nivel de ARNm codificado por el biomarcador en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, por RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, Pat. de Estados Unidos No. 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6: 1197), replicación de enrollamiento circular (Lizardi et al., Patente de Estados Unidos No. 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en muy pequeñas cantidades. La expresión del biomarcador puede evaluarse por RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, el Sistema TaqMan®). Tales métodos utilizan típicamente pares de cebadores oligonucleotídicos que son específicos para el biomarcador de interés. En la materia se conocen bien métodos para diseñar cebadores oligonucleotídicos específicos para una secuencia conocida.

Los niveles de expresión del ARN del biomarcador pueden controlarse usando una transferencia de membrana (tal y como se usa en análisis de hibridación tales como de Northern, Southern, puntual y similares) o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934. La detección de la expresión del biomarcador también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

Para detectar expresión de biomarcadores pueden usarse micromatrices. Las micromatrices son particularmente muy adecuadas para este fin debido a su reproducibilidad entre diferentes experimentos. Las micromatrices de ADN proporcionan un método para la medición simultánea de los niveles de expresión de grandes cantidades de genes. Cada matriz consiste en un patrón reproducible de sondas de captura unidas a un soporte sólido. El ARN o ADN marcado se hibrida con sondas complementarias sobre la matriz y después se detecta por escáner láser. Las intensidades de hibridación para cada sonda en la matriz se determinan y se convierten en un valor cuantitativo que representa niveles de expresión de genes relativos. Véanse, las Patentes de Estados Unidos N° 6.040.138, 5.800.992 y 6.020.135, 6.033.860, y 6.344.316. Las matrices de oligonucleótidos de alta densidad son particularmente útiles para determinar el perfil de expresión génico de una gran cantidad de los ARN existentes en una muestra.

Las técnicas para la síntesis de estas matrices usando métodos de síntesis mecánicos se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.384.261. Aunque se prefiere una superficie matricial plana, la matriz puede fabricarse prácticamente sobre una superficie de cualquier forma o incluso sobre una multiplicidad de superficies. Las matrices pueden ser péptidos o ácidos nucleicos en perlas, geles, superficies poliméricas, fibras, tales como,

fibras ópticas, vidrio o cualquier otro sustrato apropiado, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.770.358, 5.789.162, 5.708.153, 6.040.193 y 5.800.992. Las matrices pueden envasarse de tal manera que se permita realizar el diagnóstico u otra manipulación de un dispositivo todo incluido.. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.856.174 y 5.922.591.

5 En una estrategia, el ARNm total aislado de la muestra se convierte en ARNc marcado y después se hibrida con una matriz de oligonucleótidos. Cada muestra se hibrida con una matriz individual. Los niveles de transcripción relativos pueden calcularse por referencia a controles apropiados presentes en la matriz y en la muestra.

10 También se proporcionan kits para la realización práctica de los métodos de la invención. Por "kit" se entiende cualquier fabricación (por ejemplo un envase o un recipiente) que comprenda al menos un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo, una sonda de ácido nucleico, etc. para detectar específicamente la expresión de los biomarcadores MCM2 y Topo2A de la invención. El kit puede facilitarse, distribuirse o comercializarse como una unidad para realizar los métodos de la presente invención. Adicionalmente, los kits pueden contener un prospecto de envase que describa el kit y los métodos para su uso.

En una realización particular, se proporcionan kits para la realización práctica de los métodos inmunocitoquímicos de la invención. Tales kits son compatibles tanto con técnicas inmunocitoquímicas manuales como automatizadas (por ejemplo, tinción celular) como se describe más adelante en el Ejemplo 1. Estos kits comprenden al menos tres anticuerpos, en los que un primer y un segundo anticuerpo, incluidos en el kit, se unen específicamente a MCM2 y en los que un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A, productos químicos para la detección de la unión de los anticuerpos a los biomarcadores, un colorante de contraste y, opcionalmente, un agente colorante azul para facilitar la identificación de las células con tinción positiva. En la realización práctica de la invención puede usarse cualquier producto químico que detecte la unión del antígeno al anticuerpo. En algunas realizaciones, los productos químicos para la detección comprenden un polímero marcado conjugado con un anticuerpo secundario. Por ejemplo, puede proporcionarse un anticuerpo secundario que esté conjugado con una enzima que cataliza la deposición de un cromógeno en el sitio de unión del antígeno-anticuerpo. Tales enzimas y técnicas para usarlas en la detección de la unión de anticuerpos se conocen bien en la técnica. En una realización, el kit comprende un anticuerpo secundario que está conjugado con un polímero marcado con HRP. Adicionalmente pueden proporcionarse cromógenos compatibles con la enzima conjugada (es decir, DAB en el caso de un anticuerpo secundario marcado con HRP) y soluciones, tales como peróxido de hidrógeno, para bloquear la tinción no específica. En otras realizaciones, la unión de anticuerpos a una proteína biomarcadora se detecta mediante el uso de un reactivo sonda de ratón que se une a anticuerpos monoclonales de ratón, seguido por la adición de un polímero de dextrano conjugado con HRP que se une al reactivo sonda de ratón. Dichos reactivos de detección son asequibles, por ejemplo, en el mercado de Biocare Medical.

Los kits de la presente invención pueden comprender adicionalmente un reactivo bloqueador de peroxidasa (es decir, peróxido de hidrógeno), un reactivo bloqueador de proteínas (por ejemplo, caseína purificada) y un colorante de contraste (por ejemplo, hematoxilina). Adicionalmente, en el kit puede proporcionarse un agente colorante azul (por ejemplo hidróxido de amonio o TBS, pH 7,4, con Tween 20 y azida sódica) para facilitar la detección de las células con tinción positiva.

Los kits inmunocitoquímicos de la invención comprenden al menos tres anticuerpos en el que un primer y un segundo anticuerpo, incluidos en el kit, se unen específicamente a MCM2 y en el que un tercer anticuerpo se une a Topo2A, para detectar específicamente la expresión de al menos dos biomarcadores MCM2 y Topo2A. Cada anticuerpo puede proporcionarse en el kit como un reactivo individual o, como alternativa, como un cóctel de anticuerpos que comprende todos los anticuerpos dirigidos contra los diferentes biomarcadores de interés. Adicionalmente, cualquiera o todos los reactivos del kit pueden proporcionarse en envases que los protegen del medio externo, tal como envases herméticos. En el Ejemplo 8, más adelante, se describe un kit ejemplar para la realización práctica de los métodos de la invención.

En los kits pueden incluirse controles positivos y/o negativos para validar la actividad y el correcto uso de los reactivos empleados de acuerdo con la invención. Los controles pueden incluir muestras, tales como cortes tisulares, células fijadas en portaobjetos, etc., que se sabe que son positivas o negativas para la presencia del biomarcador de interés. En una realización particular, el control positivo comprende células SiHa. Esta es una línea celular humana de cáncer de células escamosas de cuello uterino que es hipertriploide y positiva para infección por VPH-16 y, por lo tanto, sirve como un control positivo para la sobreexpresión de biomarcadores en patologías de cuello uterino de alto grado. Las células de control SiHa pueden proporcionarse en los kits de la invención como portaobjetos preparados o como una suspensión celular que es compatible con la preparación del portaobjetos. El diseño y uso de los controles es convencional y se encuentra bien dentro de la habilidad rutinaria de los expertos habituales en la materia.

También se describen kits para identificar una enfermedad de cuello uterino de alto grado que comprende detectar la sobreexpresión de biomarcadores a nivel de ácido nucleico. Tales kits comprenden, por ejemplo, al menos una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico biomarcador o a un fragmento del mismo. En un aspecto particular, los kits comprenden al menos dos sondas de ácido nucleico que se hibridan con distintos

ácidos nucleicos biomarcadores.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden usarse en combinación con técnicas de citología tradicionales que analizan características morfológicas. Por ejemplo, las técnicas inmunocitoquímicas de la presente invención pueden combinarse con la tinción Pap convencional de manera que se conserva toda la información morfológica procedente del método convencional. De esta manera, la detección de biomarcadores puede reducir el alto índice de negativos falsos del ensayo del frotis de Pap y puede facilitar la exploración masiva automatizada. En una realización particular, los métodos inmunocitoquímicos descritos anteriormente en el presente documento se combinan con la tinción Pap convencional en un solo método, como se describe más adelante en los Ejemplos 6-7. Un método inmunocitoquímico y de tinción Pap combinado permite visualizar, en una sola muestra, los biomarcadores que se sobreexpresan selectivamente en una enfermedad de cuello uterino de alto grado y la morfología celular (por ejemplo, un portaobjetos para visualizar al microscopio que comprenda una monocapa de células de cuello uterino). El método inmunocitoquímico y de tinción Pap combinado puede permitir una identificación y un diagnóstico más preciso de una enfermedad de cuello uterino de alto grado, particularmente en casos erróneamente clasificados como normales, LSIL o ASCUS por ensayo Pap convencional. El análisis de sobreexpresión de biomarcadores y de morfología celular en un solo método podría reemplazar al frotis de Pap como el método de exploración principal para el cáncer de cuello uterino.

Un experto en la materia reconocerá que, para esta metodología combinada, los parámetros de tinción (por ejemplo, tiempos de incubación, condiciones de lavado, concentraciones de cromógeno/colorante, etc..) deberán optimizarse de tal manera que se obtenga un contraste suficiente entre el resultado inmunocitoquímico (por ejemplo tinción con cromógeno) y la tinción de Pap. El diseño de ensayos para optimizar parámetros de tinción es convencional y se encuentra bien dentro de las habilidades rutinarias de los expertos habituales en la materia. Los kits, como se indica en las reivindicaciones, para realizar el método inmunohistoquímico de tinción Pap combinado se incluyen también en la presente invención. Dichos kits comprenden los reactivos necesarios para realizar la inmunocitoquímica, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y los reactivos para realizar la tinción Pap convencional, particularmente EA50 y Orange G.

Adicionalmente, un experto en la materia apreciará que, en los métodos de la invención, puede implementarse cualquiera o todas las etapas, manualmente por personal, o como alternativa, de manera automática. Por tanto, las etapas de preparación de la muestra, tinción de la muestra y detección de la expresión del biomarcador pueden automatizarse.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1 (EJEMPLO BASE): Detección de la Sobreexpresión de Biomarcadores Usando Inmunocitoquímica

Preparación y Tratamiento Previo del Portaobjetos

Se recogieron muestras de células de cuello uterino procedentes de pacientes y se colocaron en un vial de recogida SurePath™ (TriPath Imaging, Inc.). Las células de cuello uterino se recogieron del medio líquido y se depositaron en una capa fina sobre un portaobjetos de vidrio usando el sistema procesador de portaobjetos PrepStain™ (TriPath Imaging, Inc.). Los portaobjetos preparados se transfirieron inmediatamente a un tampón de tratamiento previo (RAM al 1%) y se calentaron durante 45 minutos a 95 °C. Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente y se aclararon tres veces (2 minutos por aclarado) en TBS (solución salina tamponada con tris).

Inmunocitoquímica manual

Para impedir la tinción no específica de fondo, no se permitió que los portaobjetos se secasen durante el proceso de tinción. Adicionalmente, para bloquear la tinción no específica, se aplicó peróxido de hidrógeno a los portaobjetos durante 5 minutos, seguido de un aclarado con TBS. Un anticuerpo dirigido contra MCM6 se aplicó al portaobjetos durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo dirigido contra MCM6, el portaobjetos se lavó tres veces con TBS durante 2 minutos por lavado. Al portaobjetos se aplicó un anticuerpo secundario polimérico marcado con HRP de Dako Envision+ durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de un aclarado con TBS. Se aplicó cromógeno DAB al sustrato con HRP durante 10 minutos y después los portaobjetos se aclararon durante 5 minutos con agua. Cada portaobjetos se tiñó con una tinción de contraste de hematoxilina y después se aclararon con agua hasta quedar limpios. Después de la tinción de contraste, los portaobjetos se sumergieron en hidróxido de amonio durante 10 segundos y después se aclararon con agua durante 1 minuto.

Las muestras se deshidrataron sumergiendo los portaobjetos en etanol al 95% durante 1 minuto y después en etanol absoluto durante 1 minuto más. Los portaobjetos se limpiaron aclarando 3 veces en xileno durante 1 minuto por aclarado. Después los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos con un medio de montaje permanente y se incubaron a 35 °C hasta secarse. Las células con tinción positiva se visualizaron usando un microscopio de campo

claro.

Inmunocitoquímica automatizada

5 El sistema de Tinción Universal Dako Autostainer se programó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los reactivos de tinción y de tinción de contraste necesarios descritos anteriormente para la inmunocitoquímica manual se cargaron en el aparato. Los portaobjetos preparados y previamente tratados se cargaron en el Autostainer y se activó el programa. Al final del procesamiento, los portaobjetos se retiraron y se aclararon en agua durante 5 minutos. Los portaobjetos se deshidrataron, se limpiaron, se cubrieron con un cubreobjetos y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 2 (EJEMPLO BASE): Detección de Biomarcadores en Muestras Químicas

15 Se recogieron aproximadamente 180 muestras citológicas de cuello uterino de pacientes que representaban diversos diagnósticos. La presencia o ausencia de células o lesiones cancerosas, indicativas de enfermedad de alto grado en estos pacientes, se confirmó previamente por colposcopia. La tabla siguiente indica la cantidad de muestras dentro de cada grupo de diagnóstico analizado en este estudio, así como una descripción de los hallazgos colposcópicos (por ejemplo, presencia o ausencia de lesiones de alto grado).

20

Tabla 1: Especímenes analizados

Diagnóstico	Recuento	Descripción
NIL	72	Negativo a VPH
ASC-US	26	26 sin lesión 0 con lesión o con VPH de alto riesgo
LSIL	48	42 negativos para lesión de alto grado 6 positivos para lesión de alto grado
HSIL	25	
Cáncer	10	Carcinoma de Células Escamosas y Adenocarcinoma

25 Las muestras se analizaron mediante métodos inmunocitoquímicos para identificar enfermedad de cuello uterino de alto grado. Se usaron anticuerpos para detectar la sobreexpresión de seis biomarcadores de interés: MCM2, MCM6, MCM 7, p21^{waf1}, Ciclina E y Topo2A. Los controles de ensayo incluyeron MCM2, MCM6, MCM7, p21^{waf1}, Ciclina E, Topo2A y un proceso negativo de IgG de ratón en la línea celular SiHa. Las muestras también se analizaron por técnicas de tinción Pap tradicionales.

Preparación de Portaobjetos

30 Cada muestra se retiró del almacenamiento y se dejó llegar a temperatura ambiente. A cada vial se añadieron 6 ml de conservante TriPath CytoRich[®] y los viales se sometieron a agitación vorticial. Las muestras se procesaron en el procesador automatizado TriPath PrepMate[®] y cualquier líquido restante en el vial se transfirió a un tubo de centrifuga. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 200xg y se aspiró el sobrenadante. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 800xg y se decantó el sobrenadante. Los tubos de muestra se cargaron en el sistema TriPath PrepStain[®] y se activó el programa informático del sistema (versión 1.1; Sólo Transferencia). Se prepararon ocho portaobjetos por cada muestra procedente del paciente y se conservaron en etanol al 95% durante al menos 24 horas, pero no más de 2 semanas, antes de usar en los métodos de tinción Pap y e inmunocitoquímicos.

40 *Método de Tinción Pap*

45 Los portaobjetos preparados se incubaron en etanol al 95% durante 30 segundos y después se aclararon con agua durante 30 segundos más. Se aplicó hematoxilina a los portaobjetos durante 6 minutos. Los portaobjetos se aclararon en agua durante 1 minuto, agua ácida durante 2 segundos y agua durante 30 segundos. Durante 30 segundos se aplicó un agente colorante azul (hidróxido de amonio) y los portaobjetos se aclararon primero en agua y después en etanol al 95% durante 30 segundos cada vez. Se aplicó con EA 50 y Orange G (Autocyte[®]) durante 6 minutos. Los portaobjetos se aclararon 2 veces en etanol al 95%, 3 veces en etanol al 100% y 3 veces en xileno durante 30 segundo por aclarado.

50 Posteriormente los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos usando un medio de montaje Acrytol y se incubaron a 35 °C hasta secarse. Un patólogo observó las muestras usando un microscopio de campo claro.

Método Inmunocitoquímico

Los portaobjetos preparados se retiraron del etanol al 95% y se aclararon con agua desionizada durante aproximadamente 1 minuto. Los portaobjetos se colocaron en un baño de Solución de Recuperación Diana 1X pH 6,0 (DAKO S1699)/dH₂O precalentado a 95 °C y se colocaron en un vaporizador durante 25 minutos. Las muestras se dejaron enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se aclararon bien en agua desionizada y se pusieron en TBS. Los portaobjetos previamente tratados se tiñeron para detectar la expresión del biomarcador, esencialmente como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, "Inmunocitoquímica Automatizada". Se diluyeron anticuerpos convencionales dirigidos contra MCM2 (1:200), MCM7 (1: 25), p21waf1 (1:100), y ciclina E (1:100), como se indica y se usaron para detectar la expresión del biomarcador. El anticuerpo contra MCM6 purificado, identificado por exploración de polidoma, como se describe en el Ejemplo 4, se usó a una dilución 1:6000.

Interpretación de los Portaobjetos

Cada portaobjetos se exploró y analizó por un citólogo y un patólogo. Las muestras se clasificaron como positivas, negativas o indeterminadas para enfermedad de cuello uterino de alto grado de acuerdo con los siguientes parámetros:

- No se tuvieron en cuenta artefactos no celulares ni las células inflamatorias de tinción marrón (DAB).
- No se contaron como positivas las células escamosas de aspecto normal, maduras ni las células glandulares de aspecto normal cuando se tiñeron con DAB.
- Se consideraron positivas las células metaplásicas escamosas junto con las células anómalas.
- Se consideró negativa una intensidad de tinción de menos de 1,5.
- Los resultados discrepantes se resolvieron analizando conjuntamente los portaobjetos..

Los resultados inmunocitoquímicos se compararon con los resultados previamente obtenidos por colposcopia. Después, cada portaobjetos proporcionó un resultado final de positivo verdadero (PV), negativo verdadero (NV), positivo falso (PF), negativo falso (NF) o indeterminado. Para cada biomarcador, se calculó la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos.

Resultados

A continuación se resumen los resultados para cada biomarcador.

Tabla 2: MCM2

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	71	1	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	0	0	25	1	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	7	0	31	4	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	7	0	1	0	2	10
	34	7	5	127	8	181

Sensibilidad 0,8718

Especificidad 0,9478

VPP 0,8293

VPN 0,9621

Tabla 3: MCM6

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	22	1	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	24	4	42
LSIL(HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	22	0	0	0	3	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	35	17	2	114	13	181

Sensibilidad 0,9459

Especificidad 0,8702

VPP 0,6731

VPN 0,9828

Tabla 4: MCM7

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	28	2	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	37	14	3	116	11	181

Sensibilidad 0,9250

Especificidad 0,8923

VPP 0,7255

VPN 0,9748

Tabla 5: Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	72	0	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	0	0	26	0	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	3	0	35	4	42
LSIL(HSIL)	2	0	4	0	0	6

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
HSIL	15	0	4	0	6	25
Cáncer	7	0	2	0	1	10
	24	3	10	133	11	181

Sensibilidad 0,7059

Especificidad 0,9779

VPP 0,8889

VPN 0,9301

Tabla 6: p21^{waf1}

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	22	3	26
ASC-US (Con Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
Cáncer	7	0	2	0	1	10
	31	15	6	106	23	181

Sensibilidad 0,8378

Especificidad 0,8760

VPP 0,6739

VPN 0,9464

Tabla 7: TOP02A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	24	1	26
ASC-US (Con Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	4	0	27	11	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	33	5	4	119	20	181

Sensibilidad 0,8919

Especificidad 0,9597

VPP 0,8684

VPN 0,9675

Usando los métodos inmunocitoquímicos de la invención, se analizaron aproximadamente 180 casos para detectar la presencia de una enfermedad de cuello uterino de alto grado. De este número, los biomarcadores MCM produjeron un índice indeterminado que variaba de 4% al 7%. Adicionalmente, MCM2 mostró una especificidad del 95% con una sensibilidad del 87%. Los biomarcadores MCM6 y MCM7 produjeron resultados de sensibilidad comparables del 95% y 93%, respectivamente. La especificidad para estos dos biomarcadores varió del 87% al 89%.

La ciclina E produjo el valor de especificidad más alto del 98%. Aunque el índice indeterminado fue del 6%, la sensibilidad fue sólo del 71%. El índice indeterminado para p21^{waf1} fue el más alto de todos los marcadores sometidos a ensayo al 13%. p21^{waf1} produjo una sensibilidad del 84% y una especificidad del 88%. Se observó una especificidad del 96% con el biomarcador Topo2A. El índice indeterminado para Topo2A fue del 11% con una sensibilidad del 89%.

Ejemplo 3 (EJEMPLO BASE): Detección de Biomarcadores en Muestras Clínicas Usando Cócteles de Anticuerpos

Para identificar una enfermedad de cuello uterino de alto grado se analizaron aproximadamente 180 muestras citológicas de cuello uterino confirmadas por colposcopia mediante métodos inmunocitoquímicos. Cada muestra se analizó para detectar la expresión de biomarcadores múltiples de interés. Específicamente, se analizaron diversas combinaciones de anticuerpos dirigidos contra MCM2, MCM6, MCM 7, p21 waf1, Ciclina E y Topo2A para determinar su capacidad para detectar una enfermedad de cuello uterino de alto grado. Estas muestras se evaluaron para la expresión de biomarcadores múltiples de interés usando los métodos inmunocitoquímicos y las pautas de interpretación de portaobjetos descritas en el Ejemplo 2.

Los resultados inmunocitoquímicos se compararon con los resultados previamente obtenidos por colposcopia. Después, cada portaobjetos proporcionó un resultado final de positivo verdadero (PV), negativo verdadero (NV), positivo falso (PF), negativo falso (NF) o indeterminado. Para cada biomarcador, se calculó la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos positivos y los valores predictivos negativos.

Resultados

A continuación se resumen los resultados para cada biomarcador.

Tabla 8: MCM2 y MCM7

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	25	4	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

Sensibilidad 0,9268

Especificidad 0,8810

VPP 0,7170

VPN 0,9737

Tabla 9: MCM6 y MCM7

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	16	0	23	3	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

Sensibilidad 0,9500

Especificidad 0,8516

VPP 0,6667

VPN 0,9820

Tabla 10: MCM7 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	29	1	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	20	0	2	0	3	25
Cáncer	8	0	0	0	2	10
	32	14	4	114	17	181

Sensibilidad 0,8889

Especificidad 0,8906

VPP 0,6957

VPN 0,9661

Tabla 11: MCM7 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	28	2	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	14	3	116	10	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8923
 VPP 0,7308
 VPN 0,9748

Tabla 12: MCM7 y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	20	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	21	7	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	37	19	3	98	24	181

Sensibilidad 0,9250
 Especificidad 0,8376
 VPP 0,6607
 VPN 0,9703

Tabla 13: MCM2 y MCM6

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	17	0	21	4	42
LSIL(HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	37	20	2	109	13	181

Sensibilidad 0,9487
 Especificidad 0,8450
 VPP 0,6491
 VPN 0,9820

Tabla 14: MCM2 y TOPOIIA

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	23	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	8	4	18	12	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	37	9	7	108	20	181

Sensibilidad 0,8409
 Especificidad 0,9231
 VPP 0,8043
 VPN 0,9391

Tabla 15: MCM2 y Cyclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	0	0	71	1	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	25	1	0
LSIL(Sin HSIL)	0	9	0	27	6	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	8	0	2	0	0	10
	35	9	6	123	8	181

Sensibilidad 0,8537
 Especificidad 0,9318
 VPP 0,7955
 VPN 0,9535

Tabla 16: MCM2 y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	0	0	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

Sensibilidad 0,8780
 Especificidad 0,8644
 VPP 0,6923
 VPN 0,9533

Tabla 17: TOPO2A y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	24	1	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	5	0	27	10	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	34	6	4	119	18	181

Sensibilidad 0,8947
 Especificidad 0,9520
 VPP 0,8500
 VPN 0,9675

Tabla 18: TOPO2A y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	58	12	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	19	10	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	98	25	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8522
 VPP 0,6909
 VPN 0,9703

Tabla 19: p21waf1 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	22	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
Cáncer	8	0	1	0	1	10
	33	15	5	106	22	181

Sensibilidad 0,8684
 Especificidad 0,8760
 VPP 0,6875
 VPN 0,9550

Tabla 20: MCM2, MCM6 y MCM7

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	20	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	17	0	21	4	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	20	2	105	16	181

Sensibilidad 0,9500
 Especificidad 0,8400
 VPP 0,6552
 VPN 0,9813

Tabla 21: MCM2, MCM7 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8739
 VPP 0,7222
 VPN 0,9811

Tabla 22: MCM6, MCM7 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	16	0	20	6	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	104	17	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8455
 VPP 0,6724
 VPN 0,9811

Tabla 23: MCM6, MCM7 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	16	0	23	3	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

Sensibilidad 0,9500
 Especificidad 0,8516
 VPP 0,6667
 VPN 0,9820

Tabla 24: MCM2, MCM7 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	25	4	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

Sensibilidad 0,9268

Especificidad 0,8810

VPP 0,7170

VPN 0,9737

Tabla 25: MCM2, MCM7 y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	20	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

Sensibilidad 0,9268

Especificidad 0,8319

VPP 0,6667

VPN 0,9691

Tabla 26: MCM2, TOPOIIA y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	23	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	9	0	22	11	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	37	10	3	112	19	181

Sensibilidad 0,9250
 Especificidad 0,9180
 VPP 0,7872
 VPN 0,9739

Tabla 27: MCM2, Ciclina E y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	21	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

Sensibilidad 0,878
 Especificidad 0,8644
 VPP 0,6923
 VPN 0,9533

Tabla 28: MCM2, TOPOIIA y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	18	11	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	95	28	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8482
 VPP 0,6909
 VPN 0,9694

Tabla 29: MCM7, TOPO2A y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	14	2	108	18	181

Sensibilidad 0,9512

Especificidad 0,8852

VPP 0,7358

VPN 0,9818

Tabla 30: MCM7, p21waf1 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	19	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	21	7	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	97	24	181

Sensibilidad 0,9268

Especificidad 0,8362

VPP 0,6667

VPN 0,9700

Tabla 31: MCM7, p21waf1 y TOP02A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	54	16	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	19	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	18	10	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	91	30	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8273
 VPP 0,6724
 VPN 0,9785

Tabla 32: MCM2, MCM7, Ciclina E y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	20	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8319
 VPP 0,6667
 VPN 0,9691

Tabla 33: MCM2, MCM7, Ciclina E y TOPOIIA

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8739
 VPP 0,7222
 VPN 0,9811

Tabla 34: MCM2, MCM7, Ciclina E, p21waf1 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	53	17	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	18	10	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	89	32	181

Sensibilidad 0,9512

Especificidad 0,8241

VPP 0,6724

VPN 0,9780

Tabla 35: MCM2, MCM6, MCM7, TOPO2A, Ciclina E y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	52	18	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	4	0	18	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	18	0	16	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	24	2	86	30	181

Sensibilidad 0,9512

Especificidad 0,7818

VPP 0,6190

VPN 0,9773

Los datos se recopilaban 28 cócteles de anticuerpos, como se ha descrito anteriormente. La expresión del biomarcador se analizó usando cócteles que comprendían anticuerpos dirigidos contra 2, 3, 4, 5 o incluso los 6 biomarcadores de interés. Veintiuno de los 28 cócteles de anticuerpos mostraron sensibilidades superiores al 92%. Cuatro de los 28 cócteles produjeron especificidades por encima del 90% con el valor más bajo al 78%. Los mayores valores se consiguieron con una combinación de MCM2, TOPOIIA y Ciclina E. Este cóctel produjo una sensibilidad del 93% junto con una especificidad del 92%. Parece que una combinación de al menos 3 biomarcadores debe producir una sensibilidad mayor del 90%. Se admite que los ajustes con respecto al ensayo podrían aumentar adicionalmente la sensibilidad y especificidad del mismo.

Ejemplo 4 (EJEMPLO BASE): Detección de la Expresión de Biomarcadores Usando Cócteles de Anticuerpos

Se prepararon cócteles de anticuerpos usando diversas combinaciones de anticuerpos dirigidos contra Ciclina E, MCM2, MCM6, MCM7, p21waf1 y TOPO2a. La composición de cada cóctel se enumera en la siguiente tabla a continuación.

Tabla 24: MCM2, MCM7 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	25	4	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8810
 VPP 0,7170
 VPN 0,9737

Tabla 25: MCM2, MCM7 y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	14	0	20	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8319
 VPP 0,6667
 VPN 0,9691

Tabla 26: MCM2, TOPOIIA y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	23	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	9	0	22	11	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8739
 VPP 0,7222
 VPN 0,9811

Tabla 22: MCM6, MCM7 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	16	0	20	6	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	104	17	181

Sensibilidad 0,9512
 Especificidad 0,8455
 VPP 0,6724
 VPN 0,9811

Tabla 23: MCM6, MCM7 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	16	0	23	3	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

Sensibilidad 0,9500
 Especificidad 0,8516
 VPP 0,6667
 VPN 0,9820

Tabla 19: p21waf1 y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	22	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
Cáncer	8	0	1	0	1	10
	33	15	5	106	22	181

Sensibilidad 0,8684
 Especificidad 0,8760
 VPP 0,6875
 VPN 0,9550

Tabla 20: MCM2, MCM6 y MCM7

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	3	0	20	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	17	0	21	4	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	20	2	105	16	181

Sensibilidad 0,9500
 Especificidad 0,8400
 VPP 0,6552
 VPN 0,9813

Tabla 21: MCM2, MCM7 y TOPO2A

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL(HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25

ES 2 381 644 T3

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
Cáncer	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

Sensibilidad 0,8780
 Especificidad 0,8644
 VPP 0,6923
 VPN 0,9533

Tabla 17: TOPO2A y Ciclina E

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	1	0	24	1	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	5	0	27	10	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
Cáncer	9	0	0	0	1	10
	34	6	4	119	18	181

Sensibilidad 0,8947
 Especificidad 0,9520
 VPP 0,8500
 VPN 0,9675

Tabla 18: TOPO2A y p21waf1

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Totales
NIL	0	2	0	58	12	72
ASC-US (Sin Lesión)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (Lesión)	0	0	0	0	0	0
LSIL(Sin HSIL)	0	13	0	19	10	42
LSIL(HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
Cáncer	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	98	25	181

Sensibilidad 0,9268
 Especificidad 0,8522
 VPP 0,6909
 VPN 0,9703

Vial N°	Cantidad	Descripción
4a	1 x 18 ml	Tampón Sustrato DAB: tampón sustrato usado en la preparación del Cromógeno DAB
4b	1 x 1 ml	Cromógeno DAB: solución de cromógeno 3,3'-diaminobencidina
5	1 x 18 ml	Tinción de Contraste de Hematoxilina: Hematoxilina de Mayers con base acuosa
6	1 x 18 ml	Agente colorante Azul: Solución salina tamponada con Tris, pH 7,4 con Tween 20 y NaN ₃ al 0,09%

Se necesitarán los siguientes materiales y reactivos para realizar los métodos inmunocitoquímicos que no venían incluidos en el kit:

- 5
- Toallitas Absorbentes
 - Línea Celular SiHa (TriPath Imaging, Inc.)
 - Agua Desionizada o Destilada
 - Etanol (95% y 100%)
- 10
- Cubreobjetos de Vidrio
 - Guantes
 - Cámara con humedad
 - Microscopio óptico (objetivos 10x, 20x, 40x)
 - Medio de Montaje
- 15
- Pipetas y Puntas de Pipeta (capaces de administrar volúmenes de 20 µl, 200 µl y 1000 µl)
 - Tampón de Preparación SureSlide (TriPath Imaging, Inc.)- Tampón de Tratamiento Previo (laureth-13-carboxilato sódico al 0,5% (Sandopan LS) en H₂O desionizada)
 - Frascos o Baños para Tinción
 - Temporizador (capaz de medir intervalos de 1-60 minutos)
- 20
- Solución Salina Tamponada con Tris (TBS)
 - Tween 20
 - Control Negativo de IgG de Ratón Universal
 - Un Agitador Vortical
 - Sustitutos de Xileno o Xileno
- 25
- Vaporizador/baño de agua

III. Instrucciones de Uso

Preparación de Especímenes

30 Para la preparación de muestras de cuello uterino se siguieron las siguientes etapas:

- Para la preparación de Portaobjetos de especímenes residuales consultar el Manual del Operador para el System™ PrepStain SurePath.
- 35
- Añadir 8 ml de líquido conservante SurePath™ a la muestra residual en el vial con SurePath™ (aprox. 2 ml). La muestra diluida se procesa en el PepMate™ usando la técnica convencional y en el PrepStain™ usando la versión 1.1 de GYN, Preparación de Portaobjetos.
 - Colocar inmediatamente los portaobjetos preparados en el tampón de tratamiento previo durante un mínimo de 1 hora con un máximo de 72 horas antes de realizar la inmunotinción.
- 40
- Para un rendimiento óptimo del kit, debe usarse la recuperación del epítipo. Este procedimiento implica sumergir los portaobjetos preparados en el tampón de tratamiento previo durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente seguido del calentamiento de los portaobjetos en el tampón de tratamiento previo a 95 °C. Los portaobjetos se dejan a 95 °C durante 15 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se recomienda el uso de un baño de agua o de un vaporizador de vegetales calibrado capaz de

50 Preparación de Reactivos

Antes de la tinción se prepararon los siguientes reactivos:

Solución Salina Tamponada con Tris con Tween 20 al 0,05% (TBST)

- 55
- Preparar TBS de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
 - Añadir Tween 20 a una concentración final del 0,05%.

- Conservar a temperatura ambiente si se usa a la semana.
- La solución no utilizada puede conservarse a 2-8 °C durante 3 meses.
- La solución es transparente e incolora. Desechar la solución diluida si se observa turbidez.

5 Solución Sustrato-Cromógeno (DAB) (volumen suficiente para 5 portaobjetos)

- Transferir 1 ml de Sustrato Tamponado con DAB al tubo de ensayo.
- Añadir una gota (20 – 30 ul) Cromógeno de DAB+. Mezclar cuidadosamente y aplicar a los portaobjetos con una pipeta.
- 10 • Preparar diariamente la solución de Sustrato-Cromógeno reciente.
- Cualquier precipitado que se produzca en la solución no afecta a la calidad de la tinción.

IV. Protocolo de Tinción (Realizado a Temperatura Ambiente, 20-25 °C)

- 15 Para realizar la inmunotinción de las muestras citológicas de cuello uterino se realizaron las siguientes etapas:

Indicaciones del Procedimiento de Tinción

- El usuario debe leer atentamente estas instrucciones y familiarizarse con todos los componentes antes de su uso.
- 20 • Todos los reactivos se equilibran a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de realizar la inmunotinción. Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente.
- No dejar que los portaobjetos se sequen durante el procedimiento de tinción. Las preparaciones celulares que se secan pueden presentar tinción no específica aumentada. Exponer los cubreobjetos a corrientes de aire. Los portaobjetos deben colocarse en una cámara con humedad durante incubaciones prolongadas.

25

Recuperación del Epítipo

- Colocar los portaobjetos preparados en el tampón de tratamiento previo durante un mínimo de 1 hora a un máximo de 72 horas.
- 30 • Incubar durante 15 minutos a 95 °C.
- Retirar todo el frasco Coplin con los portaobjetos del baño de agua o vaporizador y dejar que los portaobjetos se enfríen en el tampón durante 20 minutos.
- Aclarar los portaobjetos con diH₂O y transferirlos a un baño con TBST.

35 *Bloqueo con Peroxidasa*

- Eliminar el tampón sobrante
- Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- 40 • Aplicar 200 µl de reactivo Bloqueador de Peroxidasa para cubrir el área de deposición celular.
- Incubar durante 5 minutos (± 1 minuto).
- Aclarar los portaobjetos en TBST, 3 cambios, 2 minutos cada uno.

Bloqueo con Proteína

- 45 • Eliminar el tampón sobrante.
- Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- Aplicar 200 µl de Bloqueador de Proteína para cubrir completamente el área de deposición celular.
- 50 • Incubar durante 5 minutos (± 1 minuto).
- No aclarar los portaobjetos.

Cóctel de Anticuerpos Primarios

- 55 • Eliminar el bloqueador de proteína sobrante
- Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- Aplicar 200 µl de cóctel de anticuerpos primarios (para cubrir completamente el área de deposición celular).
- Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 60 • Aclarar cada portaobjetos individualmente con TBST usando un frasco de lavado (no dirigir directamente el chorro sobre el área de deposición celular). Introducir los portaobjetos en una rejilla para portaobjetos.
- Aclarar los portaobjetos en TBST, 3 cambios, 2 minutos cada uno.

Detección Química

- Eliminar el tampón sobrante
- 5 • Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- Aplicar 200 µl de Sonda de Ratón para cubrir completamente el área de deposición celular.
- Incubar durante 20 minutos (\pm 1 minuto).
- Aclarar los portaobjetos en TBST, 3 cambios, 2 minutos cada uno.
- Eliminar el tampón sobrante.
- 10 • Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua)
- Aplicar 200 µl de Polímero para cubrir el área de deposición celular.
- Incubar durante 20 minutos (\pm 1 minuto).
- Aclarar los portaobjetos en un baño con TBST, 3 cambios, 2 minutos cada uno.
- 15 • Eliminar el tampón sobrante.
- Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- Aplicar 200 µl de solución de trabajo DAB para cubrir completamente el área de deposición celular.
- Incubar durante 5 minutos (\pm 1 minuto).
- 20 • Aclarar los portaobjetos durante 5 minutos en diH₂O durante 5 minutos.

Tinción de Contraste

- Aclarar los portaobjetos en TBST, 1 cambio durante 2 minutos.
- 25 • Introducir los portaobjetos en la cámara con humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua)
- Aplicar 200 µl de hematoxilina para cubrir completamente el área de deposición celular.
- Incubar durante 1 minuto (\pm 10 segundos).
- Aclarar los portaobjetos durante 3 minutos en H₂O corriente.
- 30 • Cargar los portaobjetos en la cámara de humedad preparada (cargada con toallitas o gasas de papel humedecidas con agua).
- Teñir de color azul los portaobjetos aplicando durante 1 minuto (\pm 10 segundos) 200 µl de agente colorante azul.
- Repetir el aclarado con agua corriente durante 1 minuto.

35 *Montaje*

- Sumergir los portaobjetos en etanol al 95%, 1 minuto o realizar 25 inmersiones.
- Sumergir los portaobjetos en alcohol absoluto, 4 cambios, 1 minuto cada uno o realizar 25 inmersiones.
- Limpiar con xileno, 3 cambios, 1 minuto cada uno o realizar 25 inmersiones.
- 40 • Cubrir los portaobjetos con cubreobjetos de vidrio, usando un medio de montaje permanente, no acuoso.

V. Control de Calidad

45 Cuando se usa el kit de ensayo inmunocitoquímico descrito en este ejemplo, se consideran las siguientes cuestiones en cuanto al control de calidad:

50 La variabilidad en cuanto a los resultados frecuentemente procede de diferencias en la manipulación de los especímenes y cambios en los procedimientos de ensayo. Para obtener información adicional, consultar las directrices del control de calidad propuestas del NCCLS Quality Assurance para Inmunocitoquímica.

55 La línea celular de control se encuentra disponible en TriPath Imaging, Inc. Cada vial contiene una línea celular de cáncer de cuello uterino, que se procesa de manera similar a la de los especímenes clínicos. Deben teñirse dos portaobjetos en cada procedimiento de tinción. La evaluación de la línea celular del portaobjetos de control indica la validez del desarrollo de la tinción.

VI. Interpretación de la Tinción

Portaobjetos de control:

60 Los portaobjetos de control teñidos con el kit de ensayo inmunocitoquímico se examinaron en primer lugar para verificar que todos los reactivos funcionaban correctamente. La presencia de un producto de reacción de color marrón (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina, DAB) en el núcleo de las células fue indicativa de reactividad positiva.

Especímenes de Pacientes:

La evaluación de los portaobjetos la realizó un citólogo o un patólogo usando un microscopio óptico. Las células se revisaron manualmente o se guardaron electrónicamente en una galería de imágenes derivada de un microscopio óptico.

Se recogieron aproximadamente 1610 muestras de cuello uterino que representaban diversos diagnósticos. La siguiente tabla indica la cantidad de muestras analizadas usando el kit inmunocitoquímico en cada grupo de diagnóstico, determinado por tinción Pap o biopsia convencional.

Tabla 41: Especímenes de Pacientes en Cada Grupo de Diagnóstico (Tinción Pap)

Resultados Citológicos	Cantidad	%
NIL	671	41,7%
LSIL	395	24,53%
ASCUS	349	21,68%
HSIL	150	9,32%
ASC-H	38	2,36%
AGUS	6	0,37%
SCC	1	0,06%
Total	1610	

Tabla 42: Especímenes de Pacientes en Cada Grupo de Diagnóstico (Biopsia)

Resultados de la biopsia	Cantidad	%
NIL	968	60,20%
CIN1	369	22,95%
CIN2	140	8,71%
CIN3	131	8,15%
Ausente	2	
Total	1610	

Ruta de Puntuación de Portaobjetos

Para la puntuación de todos los portaobjetos analizados por los métodos inmunocitoquímicos descritos en este ejemplo se siguió el siguiente procedimiento:

Etapa 1: ¿Es este un espécimen adecuado?

El Sistema Bethesda para describir citologías de cuello uterino (segunda edición) indica, "Una preparación basada en líquido adecuada debe poseer un mínimo calculado de al menos 5000 células escamosas bien conservadas/bien visualizadas". Este mismo criterio se aplicó cuando se evaluaron todos los portaobjetos. Sin embargo, como en el caso de una preparación Pap rutinaria, cualquier espécimen con células anómalas, que muestran una reacción molecular positiva, fue, por definición, satisfactorio para evaluación. Si la respuesta en esta etapa ha sido "sí", el citólogo pasa a la siguiente etapa; si la respuesta ha sido "no", el resultado ha sido *No satisfactorio para Evaluación*.

Etapa 2: ¿Se observa tinción nuclear de color marrón de moderado a intenso en las células epiteliales?

Los productos químicos de detección usados en el kit de ensayo inmunocitoquímico de este ejemplo (por ejemplo el Kit SureDetect Detection Chemistry) tiñen núcleos displásicos asociados con \geq CIN 2 con un cromógeno marrón, DAB. Para responder "sí" en esta etapa, las muestras se analizaron para detectar tinción marrón que se visualizó fácilmente. Si sólo se observó una leve cantidad o "rubor" de color marrón, esto no es suficiente para garantizar una interpretación de resultado positivo. Si no se observó tinción nuclear de color marrón, se considera que es un resultado de ensayo negativo. Si hubo una tinción de color marrón adecuada, el análisis pasa a la siguiente etapa.

Etapa 3: ¿Se trata de una célula escamosa (o glandular) con tinción nuclear marrón y es la célula \geq ASC (AGC)?

Usando el mismo criterio morfológico indicado en el Sistema Bethesda para describir citologías de cuello uterino (2ª Ed.) ("TBS"), se determinó si la células escamosas que contenían el núcleo de color marrón eran \geq ASC (células escamosas atípicas). Esto incluiría ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL y cáncer. Si la célula tenía un aspecto glandular, se aplicaba el criterio TBS para determinar si una célula es \geq AGC (células glandulares atípicas). Esto incluiría AGC endocervical, AGC endometrial, AIS y adenocarcinoma. Si se consideraba que la célula era \geq ASC (o \geq AGC) esto daría como resultado un resultado de ensayo positivo. Si las células en cuestión concuerdan con NILM (negativo

para lesión o malignidad intraepitelial) esta sería un resultado de ensayo negativo.

VII Resultados

5 27 casos que originalmente se clasificaron como NIL por métodos de tinción Pap convencionales se tiñeron positivos en el ensayo inmunocitoquímico. De estos 27 casos, 7 se clasificaron como HSIL, 10 como ASC-H, 3 como ASC-US y 3 como indeterminados después de revisión por el patólogo certificado. Los 7 casos HSIL se consideraron como enfermedad de cuello uterino de alto grado. Estos 27 casos se identificaron por inmunotinción positiva en el ensayo
10 inmunocitoquímico, lo que indican por tanto el valor de los métodos descritos en el presente documento para identificar pacientes erróneamente clasificados como NIL por tinción Pap.

No se obtuvieron resultados bióticos de todos los especímenes NIL. Los cálculos de sensibilidad y valor predictivo positivo (VPP) para el método inmunocitoquímico descrito en este ejemplo se calcularon basándose en la comparación con los resultados bióticos de "norma de oro". La biopsia sencilla tiene limitaciones como una norma de
15 oro. El VPP para el ensayo ICC mejorará mediante control en serie del paciente o utilizando un criterio de valoración quirúrgico más agresivo tal como el procedimiento de escisión electro quirúrgica con asa o biopsia cónica. Se sabe que la biopsia sencilla posee un resultado negativo falso para enfermedades de al menos un 31%. Véase Elit et al. (2004) J Lower Genital Tract Disease 8(3): 181 -187.

20 **Tabla 43: Sensibilidad y valores predictivos positivos calculados del ensayo ICC basados en resultados bióticos**

	ASC-H	ASCUS	LSIL	HSIL	³ASCUS
Sensibilidad	76,5% (52,7%, 90,4%)*	92,6% (76,6%, 97,9%)	97,7% (92,1%, 99,4%)	98,5% (94,6%, 99,6%)	96,2% (93,1%, 97,9%)
VPP	59,1% (38,7%, 76,7%)	26,0% (18,3%, 35,6%)	31,0% (25,9%, 36,7%)	90,1% (84,1 %, 94,0%)	46,9% (42,8%, 51,2%)

*(intervalo de confianza del 95%)

La sensibilidad y VPP del método inmunocitoquímico también se comparó con los resultados obtenidos con tinción Pap convencional. Se usaron dos criterios de valoración clínicos para tinción Pap (es decir ≥LSIL y ≥HSIL). De
25 nuevo, el patrón para todos los cálculos fue el resultado biótico.

Tabla 44: Comparativa del Ensayo Pap y Método inmunocitoquímico

	³LSIL (con ensayo Pap)	³HSIL (con ensayo Pap)	³ASCUS (con ICC)
Sensibilidad	76,5% (52,7%, 90,4%)*	92,6% (76,6%, 97,9%)	97,7% (92,1%, 99,4%)
VPP	59,1% (38,7%, 76,7%)	26,0% (18,3%, 35,6%)	31,0% (25,9%, 36,7%)

*(intervalo de confianza del 95%)

30 Los resultados presentados en la Tabla 42 indican que el método inmunocitoquímico detecta más muestras de enfermedad de cuello uterino de alto grado manteniendo al mismo tiempo un alto VPP.

En este estudio se obtuvieron 14 negativos falsos usando el kit de ensayo inmunocitoquímico. El ensayo del VPH se realizó en 13 de las 14 muestras de los pacientes. Ninguna muestra restante estaba disponible para uno de los
35 pacientes con negativos falsos.

Se aisló ADN genómico de las muestras citológicas de cuello uterino usando el Kit de ADN Tisular NucleoSpin® (BD Clontech, Cat N° 635967). Para propósitos de control de calidad, se realizó análisis por PCR de betaglobina, un gen constitutivo.

40 Se realizó la amplificación del gen L1 del VPH como se describe en la técnica mediante PCR de L1 convencional con el conjunto de cebadores MY09/11 y por PCR anidada con el conjunto de cebadores MY09/11 y G P5+/6+ para mejorar la sensibilidad de detección. Adicionalmente se realizó secuenciación de ADN del amplicón L1 para identificar el tipo (o tipos) del VPH (o de los VPH) presente.

45 Se aisló ADN genómico de buena calidad de 10 de las 13 muestras citológicas clínicas. 3 muestras tuvieron un ADN genómico de mala calidad, indicado por análisis PCR de betaglobina. El ADN del VPH fue indetectable o negativo en 10 de las 13 muestras usando PCR de L1 convencional (con los cebadores MY09/11) y PCR de L1 anidada (con los cebadores MY09/11 y GP5+/6+). Estos datos indican que se produce un error de muestreo en gran parte de las
50 muestras negativas falsas, dado que el VPH es positivo para enfermedad de cuello uterino de alto grado (sensibilidad de >92%).

Ejemplo 9 (Ejemplo base): Selección de Anticuerpos contra MCM6*Exploración de Polidomas*

5 Para identificar anticuerpos específicos contra el biomarcador MCM6, se exploraron polidomas proporcionados en placas de cultivo tisular multipocillo que poseían los rasgos de sensibilidad y especificidad deseados. Se generó una micromatriz tisular que comprendía muestras múltiples, normales (es decir, no CIN), CINIII, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma en un solo portaobjetos. Los sobrenadantes no diluidos de cada pocillo que contenían un polidoma se sometieron a ensayo para detectar tinción positiva de la micromatriz tisular. El fondo, es decir la
10 unión no específica, se ignoró básicamente en esta fase. Once de los 35 polidomas sometidos a ensayo produjeron resultados de tinción positiva y se seleccionaron para análisis posterior.

Para determinar la especificidad de los polidomas seleccionados, se compararon los patrones de tinción obtenidos con los sobrenadantes de los polidomas con los obtenidos con un anticuerpo contra MCM6 disponible en el mercado (BD Transduction Laboratories). Los patrones de tinción obtenidos con los sobrenadantes de los polidomas
15 parecieron ser más específicos que los observados con el anticuerpo contra MCM 6 disponible en el mercado (Figura 9).

Después, los 11 polidomas seleccionados se sometieron a un proceso de dilución limitante. Treinta diluciones limitantes, resultantes de los sobrenadantes de los polidomas seleccionados, se sometieron a ensayo para detectar tinción positiva de una micromatriz tisular que comprendía muestras múltiples, normales (es decir, no CIN), CINIII, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma. Se seleccionaron dos clones de la dilución limitante, 9D4.3 y 9D4.4, como los mejores sobrenadantes basándose en la tinción positiva de muestras tisulares de cuello uterino anómalas y cancerosas. Después se sometieron a ensayo diversas diluciones de estos clones para determinar su reactividad contra tejido NIL, LSIL, HSIL y se agruparon las muestras citológicas basadas en líquido. El clon 9D4.3, a una dilución 1:100 produjo la máxima proporción de señal con respecto a interferencia y se seleccionó para
20 caracterización posterior.

Caracterización del clon 9D4.3, MCM6

30 Para caracterizar el clon 9D4.3, el clon se sometió a ensayo para detectar tinción positiva de 40 muestras citológicas basadas en líquido seleccionadas de las siguientes categorías de diagnóstico: NIL (7), LSIL (10), HSIL (18), y carcinoma de cuello uterino (5). Los portaobjetos se prepararon usando el procesador de portaobjetos PrepStain™ (TriPath Imaging, Inc.) para cada una de las 40 muestras. Dos portaobjetos por muestra se tiñeron cada uno con un anticuerpo contra MCM 2 (Dako) y el clon 9D4.3. Los restantes portaobjetos se usaron para tinción PAP o como un control negativo.

Para preparar los portaobjetos, cada muestra se centrifugó durante 2 minutos a 200 xg para formar un sedimento y el sobrenadante se decantó. Se añadieron 2 ml de agua desionizada a cada muestra y las muestras se sometieron a agitación vorticial y después se centrifugaron durante 5 minutos a 600 xg. Después de decantar el sobrenadante, se añadieron 700 µl de agua tamponada con Tris. Finalmente las muestras se introdujeron en procesador de portaobjetos PrepStain™ (Tripath Imaging, Inc.), versión 1.1 y se puso en marcha el programa en modo Sólo Transferencia.

45 Después de la preparación, todos los portaobjetos se conservaron en ETOH al 95% durante al menos 24 horas y no más de 3 días. La recuperación del antígeno para MCM2 se consiguió colocando los portaobjetos en una Solución de Recuperación Diana 1X pH 6,0, baño (DAKO 51699)/dH₂O, precalentado a 95 °C, durante 25 minutos en un vaporizador. Para MCM6, la accesibilidad del antígeno se consiguió colocando los portaobjetos en un baño de tampón Tris, pH 9,5 (Biocare)/dH₂O, precalentado a 95 °C, durante 25 minutos en un vaporizador. Después de
50 vaporizar, todos los portaobjetos se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Los portaobjetos se tiñeron por inmunocitoquímica usando el Autostainer Universal DAKO como se ha descrito en el Ejemplo 1, "Inmunocitoquímica Automatizada". Un citólogo experimentado evaluó y exploró los portaobjetos para la determinación morfológica de la categoría de diagnóstico. Las muestras se evaluaron por intensidad de tinción marcadora (0-3), porcentaje de células con tinción positiva y la localización de la tinción marcadora (nuclear, citoplásmica, membrana o una combinación). A la intensidad de tinción celular se le asignó una puntuación de 0-3. Se contó la puntuación de las células ≥1,5. Las células escamosas de aspecto normal, maduras y las células glandulares de aspecto normal no se contaron como positivas cuando se tiñeron de color marrón. Sin embargo, las células metaplásicas escamosas se contaron como positivas juntos con las células anómalas. Después, a los portaobjetos sometidos a inmunocitoquímica se les proporcionó una designación de NV (negativo verdadero), NF (negativo falso), PV (positivo verdadero), o PF (positivo falso).

Tabla 45: Clon 9D4.3 (MCM6)

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Total		
NIL	0	0	0	1	0	1	Sensibilidad	0,9655
LSIL	0	1	0	9	0	10	Especificidad	0,9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0,9655
Cáncer	5	0	0	0	0	5	PPN	0,9091
	28	1	1	10	0	40		

Tabla 46: MCM2

	PV	PF	NF	NV	Indeterminado	Total		
NIL	0	0	0	1	0	1	Sensibilidad	0,9310
LSIL	0	1	0	9	0	10	Especificidad	0,9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0,9643
Cáncer	4	0	1	0	0	5	PPN	0,8333
	27	1	2	10	0	40		

Cálculos Usados

Sensibilidad = $PV / (PV + NF)$

Especificidad = $NV / (PF + NV)$

Poder Predictivo Positivo (PPP) = $PV / (PV + PF)$

Poder Predictivo Negativo (PPN) = $NV / (NF + NV)$

5

10

15

La sensibilidad y la especificidad para el clon 9D4.3 fueron comparables con las obtenidas con el anticuerpo contra MCM2 disponible en el mercado. Un caso NIL fue negativo para ambos anticuerpos. De los 10 casos LSIL, 9 fueron negativos con el clon 9D4.3 y con el anticuerpo contra MCM2 disponible en el mercado. De los 24 casos HSIL, 23 fueron positivos con el clon 9D4.3 y con el anticuerpo contra MCM2 disponible en el mercado. Con las muestras de cáncer de cuello uterino, 5 de las 5 fueron positivas con el clon 9D4.3 y 4 de las 5 fueron positivas con el anticuerpo contra MCM 2.

Purificación del clon 9D4.3, MCM 6

Debido a su sensibilidad, especificidad y a la presentación de un modelo de tinción nuclear, el clon 9D4.3 se purificó para análisis posterior. El anticuerpo purificado se obtuvo usando cromatografía de adsorción por afinidad Streamline rProteinA (Amersham Biosciences) de acuerdo con métodos convencionales. La solución de anticuerpo resultante se sometió después a ensayo para determinar la reactividad contra grupos de citología de cuello uterino basados en líquido SHIL a diversas diluciones entre 1:500 y 1:6000. La señal fue clara a una titulación de 1:6000.

Ejemplo10 (Ejemplo base): Detección por PCR en tiempo real de Biomarcadores en Muestras Tisulares Clínicas

25

Se realizó PCR en tiempo real TaqMan® con el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). En este estudio, los cebadores y las sondas se diseñaron utilizando el programa Primer Express™, versión 1.5 (Applied Biosystems), para la ampliación específica de los biomarcadores de cuello uterino diana (es decir, MCM7, p21^{waf1}, p14^{ARF}/p16, ciclina E1, y ciclina E2). La información de secuencias para cebadores y sondas se muestra a continuación:

30

MCM7:

Nombre del Cebador: MCM7_T1T3-F
 Secuencia: CTCTGAGCCCGCCAAGC (SEC ID N°: 25)

35

Nombre del Cebador: MCM7_T1T3-R
 Secuencia: TGTAAGAACTTCTTAACCTTTTCCTTCTCTA (SEC ID N°: 26)

Nombre de la Sonda: MCM7_T1T3-Sonda

- Secuencia: CCCTCGGCAGCGATGGCACT (SEC ID N°: 27)
- Nombre del Cebador: MCM7_T2T4-F
 Secuencia: GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (SEC ID N°: 28)
- 5 Nombre del Cebador: MCM7_T2T4-R
 Secuencia: CCCGCTCCCGCCAT (SEC ID N°: 29)
- 10 Nombre de la Sonda: MCM7_T2T4-Sonda
 Secuencia: CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (SEC ID N°: 30)
 Nombre del Cebador: MCM7_T2-F
 Secuencia: GTCCGAAGCCCCAGAA (SEC ID N°: 31)
- 15 Nombre del Cebador: MCM7_T2-R
 Secuencia: CCCGACAGAGACCACTCACA (SEC ID N°: 32)
- Nombre de la Sonda: MCM7_T2-Sonda
 Secuencia: CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (SEC ID N°: 33)
- 20 Nombre del Cebador: MCM7_T3T4-F
 Secuencia: CGCTACGCGAAGCTCTTTG (SEC ID N°: 34)
- Nombre del Cebador: MCM7_T3T4-R
 Secuencia: CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (SEC ID N°: 35)
- 25 Nombre de la Sonda: MCM7_T3T4-Sonda
 Secuencia: TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (SEC ID N°: 36)
- P21^{waf1}** :
- 30 Nombre del Cebador: p21T1T2-F
 Secuencia: CAAACGCCGCTGATCTT (SEC ID N°: 37)
- Nombre del Cebador: p21T1T2-R
 35 Secuencia: CCAGGACTGCAGGCTTCT (SEC ID N°: 38)
- Nombre de la Sonda: p21T1T2-Sonda
 Secuencia: CAAGAGGAAGCCCTAATCCGCCCA (SEC ID N°: 39)
- 40 Nombre del Cebador: p21 T2-F
 Secuencia: GAGCGGCGGCAGACAA (SEC ID N°: 40)
- Nombre del Cebador: p21 T2-R
 Secuencia: CCGCGAACACGCATCCT (SEC ID N°: 41)
- 45 Nombre de la Sonda: p21T2-Sonda
 Secuencia: CCCAGAGCCGAGCCAAGCGTG (SEC ID N°: 42)
- Nombre del Cebador: p21T3-F
 50 Secuencia: TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA (SEC ID N°: 43)
- Nombre del Cebador: p21T3-R
 Secuencia: TCCAGTCTGGCCAACAGAGTT (SEC ID N°: 44)
- 55 Nombre de la Sonda: p21T3-Sonda
 Secuencia: CGGCGGCAGACCAGCATGAC (SEC ID N°: 45)
- p14^{ARF}/p16:**
- 60 Nombre del Cebador: p16T4-F
 Secuencia: GCC CTC GTG CTG ATG CTA CT (SEC ID N°: 46)
- Nombre del Cebador: p16T4-R
 Secuencia: TCA TCA TGA CCT GGT CTT CTA GGA (SEC ID N°: 47)
- 65 Nombre de la Sonda: p16T4-Sonda

Secuencia: AGC GTC TAG GGC AGC AGC CGC (SEC ID N°: 48)

Nombre del Cebador: p16T1 -F
 Secuencia: TGCCCAACGCACCGA (SEC ID N°: 49)

5 Nombre del Cebador: p16T1-R
 Secuencia: GGGCGCTGCCCATCA (SEC ID N°: 50)

10 Nombre de la Sonda: p16T1-Sonda
 Secuencia: TCGGAGCCGATCCAGGTCATG (SEC ID N°: 51)

Nombre del Cebador: p 1 6T2-F
 Secuencia: AAGCTTCCTTTCCGTCATGC (SEC ID N°: 52)

15 Nombre del Cebador: p16T2-R
 Secuencia: CATGACCTGCCAGAGAGAACAG (SEC ID N°: 53)

20 Nombre de la Sonda: p16T2-Sonda
 Secuencia: CCCCCACCCTGGCTCTGACCA (SEC ID N°: 54)

Nombre del Cebador: p16T3-F
 Secuencia: GGAAACCAAGGAAGAGGAATGAG (SEC ID N°: 55)

25 Nombre del Cebador: p16T3-R
 Secuencia: TGTTCCCCCTTCAGATCTTCT (SEC ID N°: 56)

Nombre de la Sonda: p16T3-Sonda
 Secuencia: ACGCGCGTACAGATCTCTCGAATGCT (SEC ID N°: 57)

30 Nombre del Cebador: p16 Universal-F
 Secuencia: CACGCCCTAAGCGCACAT (SEC ID N°: 58)

Nombre del Cebador: p16 Universal-R
 Secuencia: CCTAGTTCACAAAATGCTTGTCATG (SEC ID N°: 59)

35 Nombre de la Sonda: p16 Universal-Sonda
 Secuencia: TTTCTTGCGAGCCTCGCAGCCTC (SEC ID N°: 60)

Ciclina E1:

40 Nombre del Cebador: CCNE1T1T2-F
 Secuencia: AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC (SEC ID N°: 61)

45 Nombre del Cebador: CCNE1T1T2-R
 Secuencia: GAGCCTCTGGATGGTGCAA (SEC ID N°: 62)

Nombre de la Sonda: CCNE1T1T2-P
 Secuencia: CAAACTCAACGTGCAAGCCTCGGA (SEC ID N°: 63)

50 Nombre del Cebador: CCNE1T1-F
 Secuencia: TCCGCCGCGGACAA (SEC ID N°: 64)

Nombre del Cebador: CCNE1T1-R
 Secuencia: CATGGTGTCCCGCTCCTT (SEC ID N°: 65)

55 Nombre de la Sonda: CCNE1T1-Sonda
 Secuencia: ACCCTGGCCTCAGGCCGGAG (SEC ID N°: 66)

Ciclina E2

60 Nombre del Cebador: CCNE2T1T2-F
 Secuencia: GGAATTGTTGGCCACCTGTATT (SEC ID N°: 67)

65 Nombre del Cebador: CCNE2T1T2-R
 Secuencia: CTGGAGAAATCACTTGTTCTATTCT (SEC ID N°: 68)

ES 2 381 644 T3

Nombre de la Sonda TaqMan: CCNE2T1T2-P
 Secuencia: CAGTCCTTGCATTATCATTGAAACACCTCACA (SEC ID N°: 69)

5 Nombre del Cebador: CCNE2T1T3-F
 Secuencia: TCAACTCATTGGAATTACCTCATTATTC (SEC ID N°: 70)

Nombre del Cebador: CCNE2T1T3-R
 Secuencia: ACCATCAGTGACGTAAGCAAAGCTC (SEC ID N°: 71)

10 Nombre de la Sonda TaqMan: CCNE2T1T3-P
 Secuencia: CCAAACCTTGAGGAAATCTATGCTCCTAAACTCCA (SEC ID N°: 72)

15 Nombre del Cebador: CCNE2T2-F
 Secuencia: TTTTGAAGTTCTGCATTCTGACTTG (SEC ID N°: 73)

Nombre del Cebador: CCNE2T2-R
 Secuencia: ACCATCAGTGACGTAAGCAAGATAA (SEC ID N°: 74)

20 Nombre de la Sonda TaqMan: CCNE2T2-P
 Secuencia: AACACAGATGAGGTCCATACTTCTAGACTGGCT (SEC ID N°: 75)

25 Las sondas se marcaron con un colorante fluorescente FAM (6-carboxifluoresceína) en la base 5' y un colorante inactivador TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) en la base 3'. Los tamaños de los amplicones eran de aproximadamente 100 pb. Como control endógeno se utilizó ARN Ribosómico 18S. Se marcó una sonda de ARNr 18S con un colorante fluorescente VIC™. La mezcla cebador/sonda ARNr 18S pre-desarrollada se adquirió en Applied Biosystems. 5 µg de ARN total extraído de tejidos de cuello uterino normal (N) o canceroso (T) se convirtieron cuantitativamente a la forma de ADNc monocatenario con hexámeros aleatorios usando el Kit de Alta Capacidad de ADNc Archive (Applied Biosystems). Se prepararon los siguientes reactivos de reacción:

30 Mezcla Maestra 20X de Cebadores/Sonda (en 200 µl)

Cebador directo 180 µM	20 µl
Cebador inverso 180 µM	20 µl
Sonda TaqMan 100 µM	10 µl
H ₂ O	150 µl

Mezcla de Reacción Final (25 µl / pocillo)

Mezcla maestra 20X de cebadores/sonda	1,25 µl
Mezcla maestra de PCR Universal TaqMan 2X (P/N:4304437)	12,5 µl
Molde de ADNc	5,0 µl
H ₂ O	6,25 µl

35 La Mezcla Maestra de PCR Universal TaqMan 20X se adquirió en Applied Biosystems. Las concentraciones finales de cebador y sonda, en un volumen total de 25 µl, fueron 0,9 µM y 0,25 µM, respectivamente. A cada pocillo se aplicaron 10 ng de ARN total. Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y un ciclo bietapa de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos durante un total de 40 ciclos. En cada proceso se incluyeron al menos tres mezclas de reacción de control sin molde. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

45 Al final de cada reacción, se usó la intensidad de fluorescencia registrada para los siguientes cálculos: Rn^+ es el valor Rn de una reacción que contenía todos los componentes. Rn^- es el valor de Rn de una mezcla que no ha reaccionado (valor inicial o el valor detectado en NTC). ΔRn es la diferencia entre Rn^+ y Rn^- y es un indicador de la magnitud de la señal generada por la PCR. En este estudio, se usó el método comparativo C_T , que se usa cantidades de patrón desconocidas pero compara la cantidad relativa de la secuencia diana con cualquier valor de referencia seleccionado (por ejemplo, ARNr 18S). Se usó el protocolo de Placa de Control Endógeno Humano TaqMan® para convertir datos sin procesar para análisis de datos de PCR en tiempo real.

50

Resultados

A continuación se indican, en forma de tabla, los resultados obtenidos con cada biomarcador y con los cebadores específicos. Los resultados obtenidos con muestras de tejido de cuello uterino normal (es decir, NIL) se indican con la letra N; los obtenidos con tejidos de cáncer de cuello uterino se indican con la letra T.

Tabla 47: Resultados Taqman® con MCM7

Muestra	T2	T5	T1T3	T2T4	T3T4
CV01-T	4	0,04	29,9	4,5	1,4
CV03-T	5,7	0,02	36,8	6,1	2,6
CV05-T	4,13	0,08	17,3	1,35	3,68
CV07-T	2,6	0,06	18,77	0,88	3,27
CV09-T	4,96	0,08	15,01	3,69	3,22
CV11-T	5,9	0,01	7,37	3,08	1,75
CV13-T	6,74	0,04	19,74	4,55	4,11
CV15-T	3,04	0,05	3,65	3,43	1,25
CV17-T	5,21	0,02	20,07	2,74	1,56
CV19-T	3,34	0,09	21,17	2,88	6
CV21-T	6,7	0,08	10,64	4,75	4,59
CV23-T	7,08	0,33	32,17	5,6	4,25
CV25-T	4,87	0,03	18,11	4,58	4,51
CV27-T	4,24	0,03	36,25	4,6	2,82
MEDIA	4,89	0,07	20,50	3,77	3,22
MEDIANA	4,89	0,05	19,74	3,77	3,22
DT	1,32	0,07	9,46	1,39	1,32
CV02-N	2,5	0,02	10,6	2,6	1,1
CV04-N	4,6	0,02	7,1	4,8	2,4
CV06-N	1,75	0,01	2,14	1,36	2,63
CV08-N	1,35	0,01	4,8	1,71	1,54
CV10-N	5,6	0,03	5,07	5,12	1,85
CV12-N	5,68	0,02	7,34	3,19	2,29
CV16-N	4,35	0,08	3,72	2,75	1,78
CV18-N	3,98	0,01	4,74	3,63	1,7
CV20-N	2,03	0,03	5,42	1,4	2,78
CV22-N	2,66	0,02	4,33	2,26	2,42
CV24-N	4,88	0,09	9,03	1,53	2,77
CV28-N	2,71	0,01	10,38	1,36	1,7
MEDIA	3,51	0,03	6,22	2,64	2,08
MEDIANA	3,51	0,02	5,42	2,60	2,08
DT	1,40	0,03	2,48	1,21	0,50

Tabla 48: Resultados TaqMan® con P21^{waf1}

Pacientes	T1T2	T2	T3
Pt01-T	23,33	0,06	0,00
Pt02-T	14,66	0,01	0,00
Pt03-T	11,86	0,00	0,00
Pt04-T	27,04	0,01	0,00
Pt05-T	14,72	0,00	0,00
Pt06-T	22,84	0,01	0,00
Pt07-T	14,04	0,00	0,00
Pt08-T	31,93	0,01	0,01
Pt09-T	35,02	0,00	0,00
Pt10-T	13,2	0,00	0,00
Pt11-T	24,87	0,01	0,00
Pt12-T	10,85	0,00	0,00
Pt13-T	36,51	0,02	0,01
Pt14-T	12,72	0,00	0,00
Pt15-T	10,64	0,00	0,00
Pt16-T	22,58	0,04	0,00
Pt17-T	39,64	0,14	0,04
Pt01-N	4,57	0,03	0,00
Pt02-N	5,57	0,00	0,00
Pt03-N	3,54	0,00	0,00
Pt04-N	8,18	0,00	0,00
Pt05-N	5,4	0,10	0,00
Pt06-N	11,01	0,00	0,00
Pt08-N	10,39	0,00	0,00
Pt09-N	9,11	0,00	0,00
Pt10-N	4,41	0,00	0,00
Pt11-N	8,64	0,00	0,00
Pt12-N	3,03	0,00	0,00
Pt14-N	3,55	0,00	0,00
Pt15-N	2,42	0,01	0,00
Pt17-N	11,46	0,05	0,01
T-media	21,5559		
N-media	6,52		
Ensayo T Conv =	7,3E-06		

Tabla 49: Resultados TaqMan® con p14^{ARF/p16}

Paciente	T1	T2	T3	T4	UNIVERSAL
Pt01-T	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
Pt02-T	16,3	11,2	5,1	21,7	36,5
Pt03-T	16,5	6,2	3,1	15,1	29,6
Pt04-T	10,1	2,8	2,6	13,2	27,7
Pt05-T	12,7	3,6	2,1	11,3	23,1
Pt01-N	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Pt02-N	2,5	2,6	1,6	2,7	6,8
Pt04-N	2,6	0,6	0,8	2,4	5,8
Pt05-N	2,1	0,8	0,7	4,1	4,6
T-Media	11,2	4,8	2,6	12,3	23,4
N-Media	1,8	1,0	0,8	2,3	4,3

Tabla 50: Resultados TaqMan® de Ciclina E1

Paciente	T1T2 Cáncer M.	Cáncer DT	T1T2 Normal M.	Normal DT	T1 Cáncer M.	Cáncer DT	T1 Normal M.	Normal DT
Pt 01	12,19	0,12	4,11	0,13	1,34	0,04	0,5	0,03
Pt02	16,72	0,21	4,44	0,34	1,35	0,02	0,47	0,05
Pt03	11,45	0,41	2,81	0,13	1,17	0,01	0,06	0,02
Pt04	21,33	0,45	5,33	0,09	0,76	0,1	0,23	0,01
Pt05	11,17	0,25	3,68	0,15	0,95	0,05	0,15	0,03
Pt06	21,65	0,24	3,11	0,22	0,89	0,03	0,13	0,02
Pt07	23,26	0,54	0	0	0,75	0,06	0	0,01
Pt08	8,37	0,24	3,1	0,01	0,12	0,01	0,13	0,02
Pt09	17,74	0,43	2,17	0,08	0,73	0,02	0,09	0,01
Pt 10	18,51	0,29	4,56	0,17	1,37	0,03	0,41	0,04
Pt 11	10,58	0,52	3,92	0,12	0,57	0,01	0,23	0,03
Pt 12	33,67	0,58	7,87	0,1	0,78	0,01	0,28	0,05
Pt 13	36,9	0,41	0	0	1,05	0,04	0	0
Pt 14	31,01	0,29	6,01	0,26	1,68	0,05	0,24	0,03
Pt 15	7,35	0,23	1,24	0,09	0,34	0,08	0,08	0,02
Pt 16	12,71	0,61	3,72	0	1,1	0,06	0,07	0,01
Pt 17	12,13	0,21	11,46	0,15	0,34	0,07	0,05	0,01
Pt 18	14,22	0,14	5,94	0,06	0,73	0,08	0,26	0,04
Pt 19	12,69	0,81	3,52	0,02	0,41	0,04	0,24	0,02

ES 2 381 644 T3

Paciente	T1T2 Cáncer M.	Cáncer DT	T1T2 Normal M.	Normal DT	T1 Cáncer M.	Cáncer DT	T1 Normal M.	Normal DT
Pt20	16,56	0,16	6,1	0,12	0,17	0,02	0,06	0
Pt 21	11,63	0,23	3,01	0,06	0,54	0,04	0,23	0,01
Pt22	17,39	0,34	2,36	0,02	0,47	0,02	0,24	0,05
Pt23	16,56	0,16	2,1	0,02	0,18	0,03	0,09	0,01
Pt24	22,23	0,33	4,06	0,28	1,9	0,17	0,52	0,01
Pt25	13,98	0,48	3,72	0,05	0,54	0,04	0,23	0,01
Pt26	22,71	0,76	4,48	0,07	0,47	0,02	0,24	0,05
Pt27	16,17	0,4	5,64	0,3	0,18	0	0,12	0,01
Pt28	12,6	0,56	3,8	0,06	0,29	0,03	0,05	0
Pt29	13,69	0,34	3,1	0,18	0,29	0,03	0,11	0
Pt30	17,69	0,61	4,3	0,11	0,36	0,01	0,03	0
Pt31	20,46	0,3	3,91	0,21	0,47	0,03	0,08	0
Pt32	18,38	0,18	3,16	0,06	0,42	0,02	0,17	0,01
Pt33	21,1	0,62	4,52	0,33	1,07	0,05	0,24	0,01
Pt34	21,5	1,37	4,56	0,13	0,24	0,01	0,11	0,01
Promedio	17,54		4,26		0,68		0,20	
T/N	4,1							
ensayo t P=	7,80E-14							

Tabla 51: Resultados TaqMan® con Ciclina E2

Pacientes	T1T2	T1T2 Desv. Tip.	T1T3	T1T3 Desv. Tip.	T2	T2 Desv. Tip.
Pt01-T	13,17	1,02	16,11	0,39	0,01	0,00
Pt02-T	13,42	0,3	18,12	2,21	0,15	0,02
Pt03-T	13,64	0,50	17,40	2,16	0,05	0,01
Pt04-T	19,37	1,41	24,26	1,01	0,01	0,00
Pt05-T	10,59	1,1	14,71	1,58	0,17	0,02
Pt06-T	7,96	0,91	9,32	0,51	0,06	0,01
Pt07-T	14,1	1,73	16,92	0,84	0,54	0,06
Pt08-T	8,11	0,67	9,50	0,66	0,34	0,07
Pt09-T	13,04	0,72	18,27	0,99	0,02	0,00
Pt10-T	19,56	2,29	23,42	0,00	0,02	0,01
Pt11 -T	16,8	1,57	18,71	2,15	0,08	0,01
Pt12-T	16,05	0,85	18,81	0,74	0,91	0,01
Pt13-T	14,91	0,87	18,51	1,59	0,61	0,16
Pt14-T	14,89	0,32	20,49	0,86	0,42	0,03
Pt15-T	12,44	0,47	15,26	1,00	0,68	0,18

Pacientes	T1T2	T1T2 Desv. Tip.	T1T3	T1T3 Desv. Tip.	T2	T2 Desv. Tip
Pt16-T	11,54	1,58	13,13	0,75	1,02	0,14
Pt17-T	6,78	0,47	7,91	0,45	0,85	0,10
Pt01-N	4,89	0,21	5,94	0,53	0,00	0,00
Pt02-N	6,32	0,47	8,91	0,61	0,13	0,00
Pt03-N	4,8	0,31	5,89	0,30	0,04	0,00
Pt04-N	13,28	0,74	15,28	1,37	0,01	0,00
Pt05-N	6,51	1,2	9,04	0,82	0,16	0,02
Pt06-N	4,96	0,83	6,41	0,84	0,05	0,01
Pt08-N	6,48	0,73	6,82	0,60	0,07	0,02
Pt09-N	3,74	0,48	4,63	0,66	0,03	0,01
Pt10-N	10,32	0,93	11,31	0,89	0,02	0,00
Pt11-N	10,34	0,26	13,90	0,53	0,04	0,04
Pt12-N	13,81	1,69	16,60	1,45	0,24	0,07
Pt14-N	6,92	0,63	9,07	0,95	0,14	0,03
Pt15-N	4,8	0,73	8,55	1,40	0,10	0,03
Pt17-N	5,33	0,2	5,78	0,27	0,23	0,07
T-media	13,32		16,52		0,35	
N-media	7,32		9,15		0,09	
Ensayo T Conv.	4,16E-05		3,31742E-05		0,008813	

Ejemplo 11 (Ejemplo base): Detección por PCR en Tiempo Real de Biomarcadores en Muestras Tissulares Clínicas

Se realizó PCR en tiempo real TaqMan® como se describe en el Ejemplo 9 usando muestras tisulares de cáncer de cuello uterino (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas) y muestras tisulares de cuello uterino normal. En este estudio, para la amplificación específica de los biomarcadores de cuello uterino diana (es decir, MCM2, MCM6, MCM7 y Topo2A), los cebadores y las sondas se diseñaron utilizando el programa Primer Express™, versión 1.5 (Applied Biosystems). A continuación se indica la información de las secuencias para los cebadores y sondas:

Cebadores TaqMan

MCM2:

Nombre del Cebador: MCM2-D
Secuencia: 5'-GGAGGTGGTACTGGCCATGTA-3' (SEC ID N°: 80)

Nombre del Cebador: MCM2-I
Secuencia: 5'-GGGAGATGCGGACATGGAT-3' (SEC ID N°: 81)

Nombre de la Sonda TaqMan: MCM2-S
Secuencia: 5'-CCAAGTACGACCGCATCACCAACCA-3' (SEC ID N°: 82)

MCM6:

Nombre del Cebador: MCM6-D
Secuencia: 5'-CATTCCAAGACCTGCCTACCA-3' (SEC ID N°: 83)

Nombre del Cebador: MCM6-I
Secuencia: 5'-ATGCGAGTGAGCAAACCAATT-3' (SEC ID N°: 84)

Nombre de la Sonda TaqMan: MCM6-S
Secuencia: 5'-ACACAAGATTCGAGAGCTCACCTCATCCA-3' (SEC ID N°: 85)

5 **MCM7:**

Nombre del Cebador: MCM7_T1T3-D
Secuencia: CTCTGAGCCCGCCAAGC (SEC ID N°: 25)

10 Nombre del Cebador: MCM7_T1T3-I
Secuencia: TGTAAGAACTTCTTAACCTTTTCCTTCTCTA (SEC ID N°: 26)

Nombre de la Sonda: MCM7_T1T3-Sonda
Secuencia: CCCTCGGCAGCGATGGCACT (SEC ID N°: 27)

15 Nombre del Cebador: MCM7_T2T4-D
Secuencia: GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (SEC ID N°: 28)

20 Nombre del Cebador: MCM7_T2T4-I
Secuencia: CCCGCTCCCGCCAT (SEC ID N°: 29)

Nombre de la Sonda: MCM7_T2T4-Sonda
Secuencia: CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (SEC ID N°: 30)

25 Nombre del Cebador: MCM7_T2-D
Secuencia: GTCCGAAGCCCCAGAA (SEC ID N°: 31)

Nombre del Cebador: MCM7_T2-I
Secuencia: CCCGACAGAGACCACTCACA (SEC ID N°: 32)

30 Nombre de la Sonda: MCM7_T2-Sonda
Secuencia: CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (SEC ID N°: 33)

35 Nombre del Cebador: MCM7_T3T4-F
Secuencia: CGCTACGCGAAGCTCTTTG (SEC ID N°: 34)

Nombre del Cebador: MCM7_T3T4-R
Secuencia: CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (SEC ID N°: 35)

40 Nombre de la Sonda: MCM7_T3T4-Sonda
Secuencia: TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (SEC ID N°: 36)

TOPO2A:

45 Nombre del Cebador: TOP2A_D
Secuencia: 5'- GGCTACATGGTGGCAAGGA -3' (SEC ID N°: 86)

Nombre del Cebador: TOP2A_I
Secuencia: 5'- TGGAAATAACAATCGAGCCAAAG -3' (SEC ID N°: 87)

50 Nombre de la Sonda TaqMan: TOP2A_S
Secuencia: 5'- TGCTAGTCCACGATACATCTTTACAATGCTCAGC -3' (SEC ID N°: 88)

Resultados

55 Los resultados obtenidos para cada biomarcador se indican a continuación en forma de tabla. Los datos también se resumen a continuación.

Tabla 52: Muestras Tisulares de Cáncer de Cuello Uterino sometidas a congelación instantánea

Paciente	TPO ID	Diag. Patológ.	Tipo de VPH	TaqM MCM2	TaqMan MCM6	TaqM MCM7	TaqM T0P2A
Pt 01	CV-001	CA de Cél. Esc.	VPH16	8,93	11,31	29,9	23,76
Pt02	CV-003	Adeno CA	VPH18	10,94	14,29	36,8	25,28
Pt03	CV-005	Adeno CA	VPH18	17,67	13,84	17,3	23,18
Pt04	CV-007	CA de Cél. Esc.	VPH16	23,61	13,3	18,77	23,26
Pt05	CV-009	CA de Cél. Esc.	VPH16	9,3	11,26	15,01	20,33
Pt06	CV-011	CA de Cél. Esc.	VPH16	13,86	11,58	7,37	8,37
Pt07	CV-013	Adeno CA	VPH18	27,03	16,32	19,74	34,29
Pt08	CV-015	CA de Cél. Esc.	VPH16, VPH18,+	8,28	8,16	3,65	8,57
Pt09	CV-017	CA de Cél. Esc.	VPH18	12,61	13,56	20,07	11,31
Pt 10	CV-019	CA de Cél. Esc.	VPH18	31,88	23,38	21,17	27,48
Pt 11	CV-021	CA de Cél. Esc.	VPH16	11,27	14,76	10,64	12,73
Pt 12	CV-023	CA de Cél. Esc.	VPH16	11,39	11,29	32,17	21,11
Pt 13	CV-025	CA de Cél. Esc.	VPH16	23,88	18,98	18,11	27,96
Pt 14	CV-027	CA de Cél. Esc.	VPH18, VPH16,+	12,26	15,53	36,25	26,63
Pt 15	CV-029	Carcinoma Célula Esc.	VPH16	6,56	7,92	9,64	7,81
Pt 16	CV-031	Carcinoma Célula Esc.	VPH73	28,12	12,21	27,3	21,4
Pt 17	CV-033	Carcinoma Célula Esc.	VPH16	8,76	7,59	14,37	12,42
Pt 18	CV-035	Carcinoma Célula Esc.	VPH16	21,4	12,65	23,63	27,57
Pt 19	CV-037	Carcinoma Célula Esc.	VPH18	12,59	13,06	14,37	9,24
Pt20	CV-039	CA de Cél. Esc.	VPH16, VPH18,+	7,24	8,17	16,97	15,13
Pt 21	CV-041	CA de Cél. Esc.	VPH16	9,61	11,84	13,88	11,92
Pt22	CV-043	CA de Cél. Esc.	VPH16	21,57	13,21	18,31	24,19
Pt23	CV-045	CA de Cél. Esc.	VPH16	21,19	13,18	18,76	19,97
Pt24	CV-047	CA de Cél. Esc.	VPH18	24,61	19,09	20,19	28,14
Pt25	CV-049	CA de Cél. Esc.	VPH18	11,43	10,2	13,70	10,55
Pt26	CV-051	CA de Cél. Esc.	VPH16	24,25	20,54	23,26	33,26
Pt27	CV-053	CA de Cél. Esc.	VPH45	26,74	21,34	20,96	20,34
Pt28	CV-055	CA de Cél. Esc.	VPH16, VPH18,+	12,65	12	14,42	12,17
Pt29	CV-057	CA de Cél. Esc.	VPH16	16	14,72	25,46	22,16
Pt30	CV-059	CA de Cél. Esc.	VPH16, VPH18,+	22,55	17,87	15,30	25,54

ES 2 381 644 T3

Pt 31	CV-061	CA de Cél. Esc.	VPH16	24,08	21,88	23,11	25,28
Pt32	CV-063	CA de Cél. Esc.	VPH18, VPH16,+	24,16	12,55	21,63	22,39
Pt33	CV-065	CA de Cél. Esc.	VPH16	26,63	16,05	27,56	28,84
Pt34	CV-067	CA de Cél. Esc.	VPH16	19,61	23,28	19,03	25,57

Tabla 53: Muestras Tissulares Normales Adyacentes

Paciente	TPO ID	Tipo VPH	TaqM MCM2	TaqMan MCM6	TaqM MCM7	TaqM TOP2A
Pt 01	CV-002	Negativo	3,04	4,4	10,6	10,52
Pt02	CV-004	Negativo	6,26	6,28	7,1	9,06
Pt03	CV-006	VPH18	2,06	2,53	2,14	3,86
Pt04	CV-008	Negativo	3,14	4,15	4,8	8,03
Pt05	CV-010	Negativo	2,2	3,45	5,07	6,91
Pt06	CV-012	Negativo	2,06	2,29	7,34	6,82
Pt07	CV-014	Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt08	CV-016	Negativo	2,55	3,13	3,72	2,02
Pt09	CV-018	Negativo	2,09	3,09	4,74	1,24
Pt 10	CV-020	Negativo	8,15	6,76	5,42	10,41
Pt 11	CV-022	Negativo	4,53	5,34	4,33	6,64
Pt 12	CV-024	Negativo	1,94	2,45	9,03	6,13
Pt 13	CV-026	Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt 14	CV-028	Negativo	2,62	2,95	10,38	5,3
Pt 15	CV-030	Negativo	1,14	1,28	2,06	1,54
Pt 16	CV-032	Negativo	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt 17	CV-034	Negativo	1,24	1,91	1,32	0,42
Pt 18	CV-036	Negativo	3,4	1,89	4,01	4,32
Pt 19	CV-038	Negativo	3,48	4,98	5,60	7,92
Pt20	CV-040	Negativo	1,84	3,28	3,73	1,38
Pt 21	CV-042	Negativo	1,53	3,3	4,77	1,01
Pt22	CV-044	Negativo	2,65	4,03	2,74	2,59
Pt23	CV-046	Negativo	3,09	3,53	5,90	3,42
Pt24	CV-048	VPH18	2,57	5,19	3,82	5,32
Pt25	CV-050	Negativo	5,84	4,64	7,78	9,14
Pt26	CV-052	Negativo	5,11	5,22	5,37	5,13
Pt27	CV-054	Negativo	2,91	3,29	5,10	0,76
Pt28	CV-056	Negativo	4,14	3,74	5,54	4,15
Pt29	CV-058	VPH16	2,83	4,98	10,13	7,57
Pt30	CV-060	Negativo	6,41	5	5,39	10,05
Pt31	CV-062	Negativo	5,72	4,93	9,29	9,95
Pt32	CV-064	Negativo	8,06	5,41	7,64	9
Pt33	CV-066	Negativo	9,93	7,94	10,78	9,95
Pt34	CV-068	Negativo	2,36	6,39	5,73	1,81

Resumen de Resultados

Tabla 54: Tumor frente a normal adyacente

Marcador	Tumor (M ± DT)	Normal (M ± DT)	R	P
MCM2	17,43 ± 7,34	3,71 ± 2,21	4,70	<0,0001
MCM6	14,32 ± 4,32	4,12 ± 1,56	3,48	<0,0001
MCM7	19,38 ± 6,94	5,85 ± 2,59	3,31	<0,0001
TOP2A	20,53 ± 7,54	5,56 ± 3,33	3,69	<0,0001

M: Media; DT: Desviación Típica; R: Proporción de las medias de tumores frente a normal; P: valor P del ensayo t.

5

Tabla 55: VPH-16 frente a VPH-18

Marcador	Tipo de Tumor VPH	Casos	Tumor (M ± DT)	Normal (M ± DT)
MCM2	16	18	16,77 ± 6,78	3,29 ± 2,13
	18	8	17,23 ± 8,16	3,99 ± 2,40
	16+18	6	14,52 ± 7,18	4,27 ± 2,47
MCM6	16	18	14,19 ± 4,44	3,97 ± 1,75
	18	8	14,24 ± 4,10	4,35 ± 1,54
	16+18	6	12,38 ± 3,89	3,92 ± 1,04
MCM7	16	18	19,39 ± 6,94	6,07 ± 2,98
	18	8	17,23 ± 4,16	5,07 ± 1,91
	16+18	6	18,04 ± 7,71	6,07 ± 2,56
TOP2A	16	18	20,92 ± 7,38	5,46 ± 3,26
	18	8	19,78 ± 9,52	6,19 ± 3,33
	16+18	6	18,41 ± 7,49	5,32 ± 3,57

Tabla 56: Carcinoma de Células Escamosas frente a Adenocarcinoma

Marcador	Histopatología	Casos	Tumor (M ± DT)	Normal (M ± DT)
MCM2	CCE	30	17,66 ± 7,28	3,74 ± 2,23
	AC	4	15,72 ± 8,69	3,39 ± 2,49
MCM6	CCE	30	14,48 ± 4,44	4,13 ± 1,55
	AC	4	13,16 ± 3,49	4,03 ± 1,98
MCM7	CCE	30	19,27 ± 7,25	6,01 ± 2,58
	AC	4	20,20 ± 4,57	4,32 ± 2,53
TOP2A	CCE	30	20,01 ± 7,47	5,65 ± 3,34
	AC	4	21,47 ± 7,87	4,77 ± 3,92

CCE: Carcinoma de Células Escamosas; AC: Adenocarcinoma

Ejemplo 12 (Ejemplo base): Detección por PCR de Biomarcadores en Líneas Celulares de Cáncer de Cuello uterino y de Mama

15 Se realizó PCR en tiempo real TaqMan® para detectar niveles de expresión de MCM2, MCM6 y MCM7 en líneas celulares de cáncer de cuello uterino y de mama.

Diseño Experimental y Protocolos

20 Se adquirieron tres líneas celulares de cuello uterino humano de SiHa, Caski y HeLa y tres líneas celulares de cáncer de mama humano de MCF-7, SK-BR3 y CAMA procedentes de la ATCC y se usaron en este experimento. Se extrajo ARN celular total de células recién cultivadas mediante el kit RNeasy® Protect Mini (Qiagen, Valencia, CA) y se convirtió en la forma de ADNc monocatenario con hexámeros al azar usando el Kit de Alta Capacidad de ADNc Archive (Applied Biosystems, P/N: 4322171). Se realizó PCR en tiempo real en el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism® 7700 usando la Mezcla Maestra PCR Universal TaqMan® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

25

Se diseñaron cebadores y las sondas para amplificación específica de MCM2, MCM6 y MCM7 con el programa ABI Primer Express™, v1.5. MCM7 contenía cuatro variantes transcripcionales: la variante transcripcional 1 (T1, refsec NM_005916) y la variante transcripcional 2 (T2, refsec NM_182776) se identificaron en la base de datos de nucleótidos NCBI Entrez. La variante T3 y la T4 tenían exones alternos cerca del extremo 5', analizado por ensamblaje EST a través del Model Maker de NCBI. Los cebadores y sondas se diseñaron como T1T3, T2T4, T2 y T3T4 para detectar específicamente las variantes T1 y T3, T2 y T4, T2 y T3 y T4, respectivamente. Las secuencias de cebadores y sondas se han mostrado anteriormente en los Ejemplos 10 y 11.

Las sondas se marcaron con un colorante fluorescente FAM (6-carboxifluoresceína) en la base 5' y un colorante inactivador TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) en la base 3'. Como control endógeno se utilizó ARN Ribosómico 18S. La sonda de ARNr 18S se marcó con un colorante fluorescente VIC. La mezcla cebador/sonda ARNr 18S pre-desarrollada se adquirió en Applied Biosystems. Se aplicaron 10 ng de ADNc a la mezcla de reacción que contenía 0,9 µM y 0,25 µM de los cebadores y sondas, respectivamente, en un volumen total de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y un ciclo bietapa de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos durante un total de 40 ciclos. En cada procesamiento se incluyeron al menos tres mezclas de reacción de control sin molde. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Se empleó el método de cuantificación relativa para calcular los niveles de expresión de los genes diana con respecto al control endógeno 18S, basándose en sus valores CT siguiendo el manual del usuario de ABI (P/N 4303859).

20 Resultados

Los resultados obtenidos para cada biomarcador se indican a continuación en un formato de tabla.

Tabla 57: Expresión de Biomarcadores en Líneas Celulares de Cáncer de Cuello Uterino y Mama

25

	SiHa	Caski	HeLa	MCF7	SK-BR3	CAMA
MCM2	21,4	5,01	8,79	18,84	7,65	17,32
MCM6	12,34	5,77	6,46	12,6	5,44	13,14
MCM7	20,53	17,27	8,31	26,91	30,38	25,36

Conclusiones

La línea celular HeLa de cuello uterino mostró tener niveles de expresión bajos de los biomarcadores MCM2, MCM6 y MCM7. Las líneas celulares de cuello uterino SiHa, MCM7 de mama y CAMA mostraron sobreexpresión de los biomarcadores MCM2, MCM6 y MCM7. Las líneas celulares Caski de cuello uterino y SK-BR3 de mama mostraron sobreexpresión de MCM7 pero baja expresión para MCM2 y MCM6.

35 Ejemplo 13 (Ejemplo base): Inducción de la Expresión de Biomarcadores de Cuello Uterino en Células 293 por Transfección Transitoria de Genes E6/E7 del VPH16

Para investigar la interrelación de la expresión de biomarcadores de cuello uterino con la transcripción de oncogenes del VPH de alto riesgo se usó el ensayo de PCR en tiempo real TaqMan® en un sistema de la línea celular HEK 293.

40 Diseño Experimental y Protocolos

En este experimento se adaptó un sistema de expresión regulado por tetraciclina (sistema T-Rex, Invitrogen, Inc). Se construyeron vectores T-Rex que expresaban la proteína de E2, E6 o E7 del VPH. Como controles negativos se utilizaron vectores que contenían los genes mutantes E2, E6 o E7. Las células T-Rex 293 se transfectaron después con plásmidos del VPH y la expresión de los genes del VPH se activó por tetraciclina durante 4 horas, 24 horas y 72 horas. Se extrajo ARN celular total procedente de las células transfectadas mediante un kit RNeasy® Protect Mini (Qiagen, Valencia, CA) y se convirtieron en la forma ADNc monocatenario con hexámeros aleatorios usando el Kit de Alta Capacidad de ADNc Archive (Applied Biosystems, P/N: 4322171). Se realizó PCR en tiempo real en el Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism® 7700 usando la Mezcla Maestra PCR Universal TaqMan® (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA).

Se diseñaron cebadores y sondas para amplificación específica de MCM2, MCM6 y MCM7 TOP2A, Ciclina E1, p21, p14, E2, E6 y E7 del VPH16 con el programa ABI Primer Express™, v1.5. MCM7 contenía cuatro variantes transcripcionales: la variante transcripcional 1 (T1, refsec NM_005916) y la variante transcripcional 2 (T2, refsec NM_182776) se identificaron en la base de datos de nucleótidos NCBI Entrez. La variante T3 y T4 tenían exones alternos cerca del extremo 5', analizado por ensamblaje EST a través del Model Maker de NCBI. Los cebadores y las sondas se diseñaron como T1T3, T2T4, T2 y T3T4 para detectar específicamente las variantes T1 y T3, T2 y T4, T2 y T3 y T4, respectivamente. Las secuencias de cebadores y sondas son como se muestra en los Ejemplos 10 y 11.

Las sondas se marcaron con un colorante fluorescente FAM (6-carboxifluoresceína) en la base 5' y un colorante inactivador TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina) en la base 3'. Como control endógeno se utilizó ARN Ribosómico 18S. La sonda de ARNr 18S se marcó con un colorante fluorescente VIC. La mezcla cebador/sonda ARNr 18S pre-desarrollada se adquirió en Applied Biosystems. Se aplicaron 10 ng de ADNc a la mezcla de reacción que contenía 0,9 μ M y 0,25 μ M de los cebadores y sondas, respectivamente, en un volumen total de 25 μ l. Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y un ciclo bietapa de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 60 segundos durante un total de 40 ciclos. En cada procesamiento se incluyeron al menos tres mezclas de reacción de control sin molde. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Se empleó el método de cuantificación relativa para calcular los niveles de expresión de los genes diana con respecto al control endógeno 18S, basándose en sus valores CT siguiendo el manual del usuario de ABI (P/N 4303859).

Resultados

Se observó que la expresión de los genes E2, E6 y E7 del VPH16 en células 293 T-Rex aumentaba durante el transcurso de la transfección. La expresión del ARNm de Topo2A, MCM2, MCM6, MCM7 y ciclina E en células 293 T-Rex se indujo significativamente por los genes E6 o E7 del VPH16, después de la transfección de 4 horas hasta 72 horas. Sin embargo, no se detectaron niveles de expresión elevados para p21 y p14 después de la transfección génica del VPH. La expresión de E6 o E7 no pareció reprimirse por la co-transfección del gel E2. Esto es porque la expresión de E6 o E7 la condujo íntegramente el promotor de CMV externo en lugar de los promotores naturales del VPH. Lo último no está presente en este sistema modelo.

Tabla 58: Topo2A

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	6,91	0,07	5,22	0,13	5,68	0,14	6,61	0,36
293-H16E6	6,91	0,07	11,31	0,22	18,13	0,89	17,39	0,85
293-H16E7	6,91	0,07	20,33	0,9	28,94	0,71	35,02	1,03
293-H16dE7	6,91	0,07	6,43	0,35	8,18	0,64	7,39	0,18
293-LacZ	6,91	0,07	7,4	0,07	7,36	0,22	7,25	0,67

Tabla 59: MCM2

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	4,79	0,23	5,25	0,36	5,24	0,31	4,44	0,3
293-H16E6	4,79	0,23	6,04	0,21	9,38	0,37	12,08	0,18
293-H16E7	4,79	0,23	10,81	0,16	12,29	0,36	16,34	0,8
293-H16dE7	4,79	0,23	5,72	0,36	4,98	0,27	5,03	0,39
293-LacZ	4,79	0,23	5,67	0,61	5,68	0,47	5,98	0,79

Tabla 60: MCM6

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	3,62	0,2	3,5	0,22	4,72	0	4,44	0,26
293-H16E6	3,62	0,2	4,74	0,07	9,03	0,04	9,68	0,43
293-H16E7	3,62	0,2	7,7	0,04	13,5	0,33	14,03	0,41
293-H16dE7	3,62	0,2	5,23	0,28	4,6	0,32	4,73	0,37
293-LacZ	3,62	0,2	4,77	0,12	4,66	0,14	5,34	0,39

4Tabla 61: MCM7

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	4,2	0,04	6,3	0,28	5,3	0,18	5,8	0,31
293-H16E6	4,2	0,04	4,99	0,05	9,55	0,23	15,24	0,3
293-H16E7	4,2	0,04	10,11	0,84	14,23	0,84	21,18	0,31
293-H16dE7	4,2	0,04	3,65	0,3	6,06	0,3	4,64	0,07
293-LacZ	4,2	0,04	5,74	0,45	5,31	0,55	5,66	0,17

Tabla 62: Ciclina E1

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	6,02	0,00	5,06	0,10	5,03	0,35	5,72	0,31
293-H16E6	6,02	0,00	9,19	0,18	8,95	0,79	9,38	0,18
293-H16E7	6,02	0,00	12,91	0,38	17,63	0,17	17,32	0,25
293-H16dE7	6,02	0,00	5,45	0,24	6,87	0,20	5,11	0,08
293-LacZ	6,02	0,00	5,72	0,31	6,28	0,37	5,65	0,64

Tabla 63: p21

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	4,76	0,19	4,05	0,30	5,19	0,61	4,92	0,60
293-H16E6	4,76	0,19	5,56	0,19	5,60	0,08	7,21	0,07
293-H16E7	4,76	0,19	7,52	0,29	5,22	0,13	6,45	0,13
293-H16dE7	4,76	0,19	4,38	0,26	5,60	0,66	5,10	0,05
293-LacZ	4,76	0,19	3,86	0,00	4,53	0,27	5,37	0,29

Tabla 64: p14

Transfección	0 h	0 h DT	4 h	4 h DT	24 h	24 h DT	72 h	72 h DT
293-H16E2	4,78	0,30	4,44	0,09	5,04	0,44	5,04	0,07
293-H16E6	4,78	0,30	4,77	0,12	5,48	0,13	4,52	0,11
293-H16E7	4,78	0,30	6,38	0,62	5,60	0,25	6,43	0,35
293-H16dE7	4,78	0,30	5,08	0,12	5,53	0,35	5,10	0,15
293-LacZ	4,78	0,30	4,54	0,40	4,68	0,16	5,76	0,25

Tabla 65: E2 del VPH16

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Simulado
4 h	130,22	0	0	110,7	0	0	95,34	36,6	3,94	12,86	0	0
24 h		0	0	111,41	0	0	118,17	90,19	19,77	7,7	0	0
72 h		0	0	141,57	0	0	162,54	128,41	32,94	9,89	0	0

Tabla 66: E6 del VPH16

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Simulado
4 h	0	205	0	0	219,87	0	128,41	0	199,65	0	0	0
24 h	0	329,67	0	0	225,96	0	158,31	0	188,03	0	0	0
72 h	0	757,26	0	0	315,22	0	392	0	271,55	0	0	0

Tabla 67: E7 del VPH16

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Simulado
4 h	0	0	330,76	0	0	165,48	0	120,65	0	201,19	0	0
24 h	0	0	1514,6	0	0	239,63	0	857,89	0	600,57	0	0
72 h	0	0	2806,8	0	0	355,9	0	1444,25	0	809,11	0	0

5 Ejemplo 14: La Accesibilidad del Antígeno Aumenta en los Métodos Inmunocitoquímicos e Inmunohistoquímicos Usando un Tampón de Tratamiento Previo para Portaobjetos

Selección de Especímenes y Descripción de Reactivos

- 10 Especímenes citológicos e histológicos relacionados, procedentes del mismo paciente, se sometieron a inmunoensayo para detectar la sobreexpresión de biomarcadores. Se analizaron muestras de tejido bloqueadas en parafina y especímenes citológicos SurePath[®] de pacientes clasificados como ASCUS (3), LSIL (6) y HSIL (5). Los reactivos usados fueron el Cóctel de Anticuerpos (para citología) el Cóctel de Anticuerpos Modificado (para histología), Reactivos de Detección, Tinciones de Contraste y el Tampón de Preparación SureSlide[®] 10X (tampón de tratamiento previo).

Preparación de Portaobjetos para citología e Inmunocitoquímica Automatizada

- 20 Para la inmunocitoquímica, la preparación y el tratamiento previo de los portaobjetos se realizó como se indica en el Ejemplo 5. Después se realizó la inmunocitoquímica automatizada sobre cada espécimen citológico como se describe en el Ejemplo 5 con una excepción. La incubación del cóctel de anticuerpos primarios (Clon MCM2 26H6.19 1:10.000, Clon MCM2 27C5.6 1:800, Clon TOPOILA SWT3D1 1:1000) se redujo a 30 minutos para este experimento.

25 *Preparación de Portaobjetos para histología e Inmunocitoquímica automatizada*

- 30 Para cada caso, se cortaron secciones de 4 micrómetros y se secaron durante una noche o durante 20 minutos en un horno de ventilación forzada a 70 °C. Las secciones se desparafinaron en tres cambios de xileno durante 5 minutos cada uno. Después los portaobjetos se limpiaron en alcohol absoluto durante 5 minutos cada uno. Los portaobjetos se redujeron de agua y se aclararon cuidadosamente. Los portaobjetos se transfirieron a una solución previamente calentada de Tampón de Preparación SureSlide 1X y se incubaron en el vaporizador durante 25 minutos. Los portaobjetos se retiraron del vaporizador y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los portaobjetos se aclararon lentamente en agua hasta que el tampón estuvo completamente cambiado. Se aplicó un aclarado con TBST durante 2 cambios a 2 minutos cada uno.

- 35 La inmunohistoquímica automatizada se realizó como se describe en el Ejemplo 5 para la inmunocitoquímica, con dos excepciones. La incubación del cóctel de anticuerpos primarios se redujo a 30 minutos para este experimento. Adicionalmente, el cóctel de anticuerpos primarios se modificó con las siguientes diluciones (Clon MCM2 26H6.19 1:4.000, Clon MCM2 27C5.6 1:200, Clon TOPOILA SWT3D1 1:400).

40 *Resultados*

- 45 Se observaron los modelos de tinción previstos tanto en los especímenes histológicos como en los citológicos con el uso de los reactivos RUO. Específicamente, la capacidad de inmunotinción tanto de especímenes histológicos como citológicos con el Tampón de Preparación SureSlide[®], Reactivos de Detección y Reactivos de Tinción de Contraste se demostró de manera satisfactoria.

Tabla 68: Información de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los Biomarcadores

Nombre del Biomarcador	Secuencia de Nucleótidos		Secuencia de Aminoácidos	
	Nº de Acceso	Identificador de Secuencia	Nº de Acceso	Identificador de Secuencia
Ciclina E1 (Isoforma 1)	NM_001238	SEC ID Nº: 1	NP 001229	SEC ID Nº: 2
Ciclina E1 (Isoforma 2)	NM_057182	SEC ID Nº: 3	NP 476530	SEC ID Nº: 4
Ciclina E2 (Isoforma 1)	NM_057749)	SEC ID Nº: 5	NP 477097	SEC ID Nº: 6
Ciclina E2 (Isoforma 2)	NM_057735	SEC ID Nº: 7	NP 477083	SEC ID Nº: 8
Ciclina E2 (Isoforma 3)	NM_004702	SEC ID Nº: 9	NP 004693	SEC ID Nº: 10
MCM2	NM_004526	SEC ID Nº: 11	NP 0045417	SEC ID Nº: 12
MCM6	NM_005915	SEC ID Nº: 89	NP 005906	SEC ID Nº: 90
MCM7 (Isoforma 1)	NM_005916	SEC ID Nº: 13	NP 005907	SEC ID Nº: 14
MCM7 (Isoforma 2)	NM_182776	SEC ID Nº: 15	NP 877577	SEC ID Nº: 16
p21/waf1 (Variante 1)	NM_000389	SEC ID Nº: 17	NP 000380	SEC ID Nº: 18
p21/waf1 (Variante 2)	NM_078467	SEC ID Nº: 19	NP 510867	SEC ID Nº: 20
p14ARF	NM_058195	SEC ID Nº: 21	NP 478102	SEC ID Nº: 22
Topo2a	NM_001067	SEC ID Nº: 23	NP 0010568	SEC ID Nº: 24

5 A la luz de la descripción y de los ejemplos anteriores, un experto en la materia apreciará que los métodos de la invención permiten mejorar la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado, independientemente de la edad, en comparación con la realización práctica convencional. Los métodos de la invención pueden encontrar un uso particular como se describe a continuación:

- 10 • Para mujeres mayores de treinta años, el ensayo puede ser un reflejo de un resultado positivo para VPH o un reflejo de un resultado citológico ASCUS+.
- Para mujeres menores de 30 años, el ensayo puede usarse en combinación con citología para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado.
- Para mujeres mayores de 30 años, el ensayo puede usarse en combinación con citología para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado.
- 15 • Para mujeres menores de 30 años, el ensayo puede usarse como una exploración primaria para detectar enfermedades de cuello uterino de alto grado.
- Para mujeres mayores de 30 años, el ensayo puede usarse como una exploración primaria para detectar enfermedades de cuello uterino de alto grado.
- El ensayo puede ser un sustituto del frotis Pap en mujeres menores de treinta años.
- 20 • Finalmente, el ensayo puede ser un sustituto del frotis Pap, independientemente de la edad.

Otras posibles ventajas que surgen a raíz de la realización práctica de la presente invención incluyen:

- 25 • Detección de anomalías histológicas de alto grado en mujeres de 30 años y mayores con resultados NIL/VPH positivos
- Especificidad superior para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado en mujeres mayores de 30 años que son positivas para el ensayo Pap + ADN.
- Detección superior para enfermedades de cuello uterino de alto grado en mujeres con las categorías ASCUS, ASC-H y LSIL, independientemente de la edad.
- 30 • Especificidad superior para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado en la categoría HSIL.
- Detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado junto con diagnóstico basado en citología en mujeres menores de 30 años.
- Detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado junto con diagnóstico basado en citología, independientemente de la edad.
- 35 • Especificidad mejorada para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado como una exploración primaria en mujeres menores de 30 años.
- Especificidad mejorada para la detección de enfermedades de cuello uterino de alto grado como una exploración primaria, independientemente de la edad.
- Identificación de enfermedades de cuello uterino y diferenciación de infección por VPH y de enfermedad de cuello
- 40 • Pueden establecerse rendimientos de ensayo aceptables usando interpretación manual o interpretación asistida mediante microscopía automatizada.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la que pertenece esta invención.

5 Aunque la anterior invención se ha descrito con detalle a modo de ilustración y se han proporcionado ejemplos con objeto de claridad de entendimiento, será evidente que en la realización práctica de la invención puedan efectuarse determinados cambios y modificaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> Fischer, Timothy J.
Malinowski, Douglas P.
Taylor, Adriann J.
Parker, Margaret R.

15

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES DE CUELLO UTERINO

20

<130> 46143/290269

<150> 60/556.495

<151> 24-03-2004

25

<160> 90

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

30

<210> 1

<211> 1958

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 381 644 T3

```

agcagccggc gcggccgcca gcgcggtgta gggggcaggc gcggatcccg ccaccgccc 60
gcgctcggcc cgcgcactcc cggcgccgcc gccgccactg ccgtcgcccg cgcgcgctgc 120
egggactgga gcgcgcgctc cggcgccgcc aagaccctgg cctcaggccg gagcagcccc 180
atcatgccga gggagcgcag ggagcgggat gcgaaggagc gggacacccat gaaggaggac 240
ggcggcgcgg agttctcggc tgcctccagg aagaggaagg caaacgtgac cgtttttttg 300
caggatccag atgaagaaat ggccaaaatc gacaggacgg cgagggacca gtgtgggagc 360
cagccttggg acaataatgc agtctgtgca gacccctgct ccctgatccc cacacctgac 420
aaagaagatg atgaccgggt ttacccaaac tcaacgtgca agcctcggat tattgcacca 480
tccagaggct ccccgctgcc tgtactgagc tgggcaaata gagaggagt ctggaaaatc 540
atgttaaaca aggaaaagac atacttaagg gatcagcact ttcttgagca acaccctctt 600
ctgcagccaa aaatgcgagc aattcttctg gattggttaa tggagggtgtg tgaagtctat 660
aaacttcaca gggagacctt ttacttgcca caagatttct ttgaccggtg tatggcgaca 720
caagaaaatg ttgtaaaaac tctttacag cttattggga ttctatcttt atttattgca 780
gccaaacttg aggaaatcta tctccaaaag ttgcaccagt ttgcgatgtg gacagatgga 840
gctgttccag gagatgaaat tctcaccatg gaattaatga ttatgaaggc ccttaagtgg 900
cgtttaagtc cctgactat tgtgtcctgg ctgaatgtat acatgcaggt tgcatactca 960
aatgacttac atgaagtgtc actgcgcagc tatccccagc aaatctttat acagattgca 1020
gagctgttgg atctctgtgt cctggatggt gactgccttg aatttcctta tggatactct 1080
gctccttcgg ccttgatca tttctcgtca tctgaattga tgcaaaaggt ttcaggggat 1140
cagtgggtgc acatagagaa ctgtgtcaag tggatgggtc catttgccat ggttataagg 1200
gagacgggga gctcaaaact gaagcacttc aggggcgtcg ctgatgaaga tgcacacaac 1260
atacagaccc acagagacag cttggatthg ctggacaaaag cccgagcaaa gaaagccatg 1320
ttgtctgaac aaaatagggc ttctcctctc cccagtgggc tctcaccoc gccacagagc 1380
ggtaagaagc agagcagcgg gccggaaatg gcgtgaccac cccctccttc tccaccaaag 1440
acagttgcgc gcctgctcca cgttctcttc tgtctgttgc agcggaggcg tgcgtttgct 1500
tttacagata tctgaatgga agagtgttcc ttccacaaca gaagtatttc tgtggatggc 1560
atcaaacagg gcaaagtgtt ttttattgaa tgcttatagg ttttttttaa ataagtgggt 1620
caagtacacc agccacctcc agacaccagt gcgtgctccc gatgctgcta tggagggtgc 1680
tacttgacct aagggactcc cacacaaca aaagcttgaa gctgtggagg gccacgggtg 1740
cgtggctctc ctgcaggtg ttctgggctc cgttgtacca agtggagcag gtggttgccc 1800
gcaagcgttg tgcagagccc atagccagct gggcaggggg ctgcctctc cacattatca 1860
gttgacagtg tacaatgctt ttgatgaact gttttgtaag tgetgctata tctatccatt 1920
ttttaataaa gataatactg tttttgagac aaaaaaaaa 1958

```

- <210> 2
- <211> 410
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

5

ES 2 381 644 T3

Met Pro Arg Glu Arg Arg Glu Arg Asp Ala Lys Glu Arg Asp Thr Met
1 5 10 15
Lys Glu Asp Gly Gly Ala Glu Phe Ser Ala Arg Ser Arg Lys Arg Lys
20 25 30
Ala Asn Val Thr Val Phe Leu Gln Asp Pro Asp Glu Glu Met Ala Lys
35 40 45
Ile Asp Arg Thr Ala Arg Asp Gln Cys Gly Ser Gln Pro Trp Asp Asn
50 55 60
Asn Ala Val Cys Ala Asp Pro Cys Ser Leu Ile Pro Thr Pro Asp Lys
65 70 75 80
Glu Asp Asp Asp Arg Val Tyr Pro Asn Ser Thr Cys Lys Pro Arg Ile
85 90 95
Ile Ala Pro Ser Arg Gly Ser Pro Leu Pro Val Leu Ser Trp Ala Asn
100 105 110
Arg Glu Glu Val Trp Lys Ile Met Leu Asn Lys Glu Lys Thr Tyr Leu
115 120 125
Arg Asp Gln His Phe Leu Glu Gln His Pro Leu Leu Gln Pro Lys Met
130 135 140
Arg Ala Ile Leu Leu Asp Trp Leu Met Glu Val Cys Glu Val Tyr Lys
145 150 155 160
Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg Tyr
165 170 175
Met Ala Thr Gln Glu Asn Val Val Lys Thr Leu Leu Gln Leu Ile Gly
180 185 190
Ile Ser Ser Leu Phe Ile Ala Ala Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Pro Pro
195 200 205
Lys Leu His Gln Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Gly Asp
210 215 220
Glu Ile Leu Thr Met Glu Leu Met Ile Met Lys Ala Leu Lys Trp Arg
225 230 235 240
Leu Ser Pro Leu Thr Ile Val Ser Trp Leu Asn Val Tyr Met Gln Val
245 250 255
Ala Tyr Leu Asn Asp Leu His Glu Val Leu Leu Pro Gln Tyr Pro Gln
260 265 270
Gln Ile Phe Ile Gln Ile Ala Glu Leu Leu Asp Leu Cys Val Leu Asp
275 280 285
Val Asp Cys Leu Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Ser Ala Leu
290 295 300
Tyr His Phe Ser Ser Ser Glu Leu Met Gln Lys Val Ser Gly Tyr Gln
305 310 315 320
Trp Cys Asp Ile Glu Asn Cys Val Lys Trp Met Val Pro Phe Ala Met
325 330 335
Val Ile Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Leu Lys His Phe Arg Gly Val
340 345 350
Ala Asp Glu Asp Ala His Asn Ile Gln Thr His Arg Asp Ser Leu Asp
355 360 365
Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ala Lys Lys Ala Met Leu Ser Glu Gln Asn
370 375 380
Arg Ala Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Pro Gln Ser Gly
385 390 395 400
Lys Lys Gln Ser Ser Gly Pro Glu Met Ala
405 410

<210> 3
<211> 1787
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

5

ES 2 381 644 T3

gtgctcacc ggcccgggtc caccogggtc cacagggatg cgaaggagcg ggacaccatg 60
aaggaggacg gcggcgcgga gttctcggtc cgctccagga agaggaaggg aaacgtgacc 120
gtttttttgc aggatccaga tgaagaaatg gccaaaatcg acaggaacggc gaggggaccag 180
tgtgggagcc agccttggga caataatgca gtctgtgcag acccctgctc cctgatcccc 240
acacctgaca aagaagatga tgaccgggtt tacccaaact caacgtgcaa gcctcggatt 300

attgcaccat ccagaggctc cccgctgctt gtactgagct gggcaaatag agaggaagtc 360
tggaaatca tgttaaacia ggaaaagaca tacttaaggg atcagcactt tcttgagcaa 420
caccctcttc tgacgcaaaa aatgcgagca attcttctgg attggttaat ggaggtgtgt 480
gaagtcata aacttcacag ggagaccttt tacttggcac aagatttctt tgaccgggat 540
atggcgacac aagaaaatgt tgtaaaaact cttttacagc ttattgggat ttcattctta 600
tttattgcag ccaaaactga ggaaatctat cctccaaagt tgcaccagt tgcgtatgtg 660
acagatggag ctgttccagg agatgaaatt ctaccatgg aattaatgat tatgaaggcc 720
cttaagtggc gttaagtcc cctgactatt gtgtcctggc tgaatgtata catgcagggt 780
gcatactcaa atgacttaca tgaagtgtca ctgcccagc atccccagca aatctttata 840
cagattgcag agctgttga tctctgtgtc ctggatgttg actgccttga atttccttat 900
ggataacttg ctgcttcggc cttgtatcat tctcgtcat ctgaattgat gcaaaagggt 960
tcagggtatc agtgggtgca catagagaac tgtgtcaagt ggatggttcc atttgccatg 1020
gttataaggg agacggggag ctcaaaactg aagcacttca ggggcgtcgc tgatgaagat 1080
gcacacaaca tacagacca cagagacagc ttggatttgc tggacaaagc ccgagcaaag 1140
aaagccatgt tgtctgaaca aatagggct tctcctctcc ccagtgggct cctcaccocg 1200
ccacagagcg gtaagaagca gagcagcggg ccggaaatgg cgtgaccacc ccacocctct 1260
ccaccaaaga cagtgcgcg cctgctccac gttctcttct gtctgttgc gggaggcgt 1320
gcgtttgctt ttacagatat ctgaatggaa gagtgttct tccacaacag aagtatttct 1380
gtggatggca tcaaacaggg caaagtgttt tttattgaat gcttataggt tttttttaa 1440
taagtgggtc aagtacacca gccacctcca gacaccagt cgtgctccc atgctgctat 1500
ggaaggtgct acttgaccta agggactccc acaacaacia aagcttgaag ctgtggaggg 1560
ccacgggtgc gtggctctcc tgcaggtgt tctgggctcc gttgtacca gtggagcagg 1620
tggttgcggg caagcgttgt gcagagccca tagccagctg ggcagggggc tgcctctcc 1680
acattatcag ttgacagtgt acaatgcctt tgatgaactg ttttgaagt gctgctatat 1740
ctatccattt ttaataaag ataactctgt ttttgagaca aaaaaa 1787

<210> 4
<211> 395
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 4

Met Lys Glu Asp Gly Gly Ala Glu Phe Ser Ala Arg Ser Arg Lys Arg
1 5 10 15
Lys Ala Asn Val Thr Val Phe Leu Gln Asp Pro Asp Glu Glu Met Ala
20 25 30
Lys Ile Asp Arg Thr Ala Arg Asp Gln Cys Gly Ser Gln Pro Trp Asp
35 40 45
Asn Asn Ala Val Cys Ala Asp Pro Cys Ser Leu Ile Pro Thr Pro Asp
50 55 60
Lys Glu Asp Asp Asp Arg Val Tyr Pro Asn Ser Thr Cys Lys Pro Arg
65 70 75 80
Ile Ile Ala Pro Ser Arg Gly Ser Pro Leu Pro Val Leu Ser Trp Ala
85 90 95
Asn Arg Glu Glu Val Trp Lys Ile Met Leu Asn Lys Glu Lys Thr Tyr
100 105 110
Leu Arg Asp Gln His Phe Leu Glu Gln His Pro Leu Leu Gln Pro Lys
115 120 125
Met Arg Ala Ile Leu Leu Asp Trp Leu Met Glu Val Cys Glu Val Tyr
130 135 140
Lys Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg
145 150 155 160
Tyr Met Ala Thr Gln Glu Asn Val Val Lys Thr Leu Leu Gln Leu Ile
165 170 175
Gly Ile Ser Ser Leu Phe Ile Ala Ala Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Pro
180 185 190
Pro Lys Leu His Gln Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Gly
195 200 205
Asp Glu Ile Leu Thr Met Glu Leu Met Ile Met Lys Ala Leu Lys Trp
210 215 220
Arg Leu Ser Pro Leu Thr Ile Val Ser Trp Leu Asn Val Tyr Met Gln
225 230 235 240
Val Ala Tyr Leu Asn Asp Leu His Glu Val Leu Leu Pro Gln Tyr Pro
245 250 255
Gln Gln Ile Phe Ile Gln Ile Ala Glu Leu Leu Asp Leu Cys Val Leu
260 265 270

Asp Val Asp Cys Leu Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Ser Ala
275 280 285
Leu Tyr His Phe Ser Ser Ser Glu Leu Met Gln Lys Val Ser Gly Tyr
290 295 300
Gln Trp Cys Asp Ile Glu Asn Cys Val Lys Trp Met Val Pro Phe Ala
305 310 315 320
Met Val Ile Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Leu Lys His Phe Arg Gly
325 330 335
Val Ala Asp Glu Asp Ala His Asn Ile Gln Thr His Arg Asp Ser Leu
340 345 350
Asp Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ala Lys Lys Ala Met Leu Ser Glu Gln
355 360 365
Asn Arg Ala Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Pro Gln Ser
370 375 380
Gly Lys Lys Gln Ser Ser Gly Pro Glu Met Ala
385 390 395

<210> 5
<211> 2748
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 5

ES 2 381 644 T3

```

agcgggtgcg gggcgggacc ggcccggcct atatatggg ttggcggcgg cggcagetga 60
gccgagcggg agctggctcg gcgaggtttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
aagtagcggg ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacgggat ccccccaaga 180
agcccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccagc gatgtcaaaa aaagaagaga 240
ggaggtcacc aagaacatc agtatgaaat taggaattgt tggccacctg tattatctgg 300
ggggatcagt ccttgcatca tcattgaaac acctcacaaa gaaataggaa caagtgattt 360
ctccagattt acaaattaca gatttaaaaa tctttttatt aatccttcac ctttgctcga 420
tttaagctgg ggatgttcaa aagaagtctg gctaaacatg ttaaaaaagg agagcagata 480
tgttcatgac aaacattttg aagttctgca ttctgacttg gaaccacaga tgaggtccat 540
acttctagac tggcttttag aggtatgtga agtatacaca cttcataggg aaacatttta 600
tcttgccaaa gacttttttg atagatttat gttgacacaa aaggatataa ataaaaatat 660
gcttcaactc attggaatta cctcattatt cattgcttcc aaacttgagg aatctatgct 720
tcctaaactc caagagtttg cttacgtcac tgatggtgct tgcagtgaaq aggatatcct 780
aaggatggaa ctcatatat taaaggcttt aaaaaggaaa ctttgctcctg taacaatcct 840
ctcctggcta aatctcttcc tccaagttga tgctcttaaa gatgctccta aagttctctc 900
acctcagtat tctcaggaaa cattcattca aatagctcag ctttttagatc tgtgtattct 960
agccattgat tcattagagt tccagtacag aatactgact gctgctgcct tgtgccattt 1020
tacctccatt gaagtgggta agaaagcctc aggtttggag tgggacagta tttcagaatg 1080
tgtagattgg atggtacctt ttgtcaatgt agtaaaaagt actagtccag tgaagctgaa 1140
gacttttaag aagatccta tggagacag acataatata cagacacata caaactattt 1200
ggctatgctg gaggaagtaa attacataaa caccttcaga aaagggggac agttgtcacc 1260
agtgtgcaat ggaggcatta tgacaccacc gaagagcact gaaaaaccac cagggaaaaca 1320
ctaaagaaga taactaagca aacaagttgg aattcaccaa gattgggtag aactgggatc 1380
actgaactac taaagtttta cagaaagtag tgctgtgatt gattgccccta gcccaattcac 1440
aagttacact gccattctga ttttaaaact tacaattggc actaaagaat acatttaatt 1500
atltcctatg tttagctgta aagaaacagc aggacttggt tacaagatg tcttcattcc 1560
caaggttact ggatagaagc caaccacagt ctataccata gcaatgtttt tcttttaate 1620
cagtgttact gtgtttatct tgataaacta ggaattttgt cactggagtt ttggactgga 1680
taagtgtctac cttaaagggg atactaagtg atacagtact ttgaatctag ttggttagatt 1740
ctcaaaatc ctacactctt gactagtgca atttggttct tgaaaattaa attttaaactt 1800
gtttacaaag gtttagtttt gtaataaggt gactaattta tctatagctg ctatagcaag 1860
ctattataaa acttgaattt ctacaaatgg tgaatttaa tgttttttaa actagtttat 1920
ttgccttgcc ataacacatt ttttaactaa taaggcttag atgaacatgg tgttcaacct 1980
gtgctctaaa cagtgggagt accaaagaaa ttataaacia gataaatgct gtggctcctt 2040
cctaactggg gctttcttga catgtagggt gcttggtaat aacctttttg tatatcacia 2100
tttgggtgaa aaacttaagt accctttcaa actatttata tgaggaagtc actttactac 2160
totaagatat cctaaggaa tttttttttt taatttagtg tgactaaggc tttatttatg 2220
tttgtgaaac tgttaaggtc ctttctaaat tctctcattg tgagataagg acagtgctcaa 2280
agtataaag cttaacactt gaacctaaact tctattttct taaggaagaa gagtattaaa 2340
tatatactga ctctagaaa tctatttatt aaaaaagac atgaaaactt gctgtacata 2400
ggctagctat ttctaatat tttaaattag cttttctaaa aaaaaaatcc agcctcataa 2460
agtagattag aaaactagat tgctagttta ttttgttatc agatattgta atctctctct 2520

cctttgaaga aactatacat ttattgttac ggtatgaagt cttctgtata gtttgttttt 2580
aaactaatat ttgtttcagt attttgtctg aaaagaaaa accactaatt gtgtacatat 2640
gtattatata aacttaacct ttaatactg tttattttta gccattgtt taaaaaataa 2700
aagttaaaaa aatttaactg cttaaaagta aaaaaaaaa aaaaaaaa 2748

```

<210> 6
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

5

ES 2 381 644 T3

Met Ser Arg Arg Ser Ser Arg Leu Gln Ala Lys Gln Gln Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Ser Gln Thr Glu Ser Pro Gln Glu Ala Gln Ile Ile Gln Ala Lys Lys
 20 25 30
 Arg Lys Thr Thr Gln Asp Val Lys Lys Arg Arg Glu Glu Val Thr Lys
 35 40 45
 Lys His Gln Tyr Glu Ile Arg Asn Cys Trp Pro Pro Val Leu Ser Gly
 50 55 60
 Gly Ile Ser Pro Cys Ile Ile Ile Glu Thr Pro His Lys Glu Ile Gly
 65 70 75 80
 Thr Ser Asp Phe Ser Arg Phe Thr Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Leu Phe
 85 90 95
 Ile Asn Pro Ser Pro Leu Pro Asp Leu Ser Trp Gly Cys Ser Lys Glu
 100 105 110
 Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr Val His Asp Lys
 115 120 125
 His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln Met Arg Ser Ile
 130 135 140
 Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr Thr Leu His Arg
 145 150 155 160
 Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg Phe Met Leu Thr
 165 170 175
 Gln Lys Asp Ile Asn Lys Asn Met Leu Gln Leu Ile Gly Ile Thr Ser
 180 185 190
 Leu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Ala Pro Lys Leu Gln
 195 200 205
 Glu Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu Glu Asp Ile Leu
 210 215 220
 Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp Glu Leu Cys Pro
 225 230 235 240
 Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln Val Asp Ala Leu
 245 250 255
 Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser Gln Glu Thr Phe
 260 265 270
 Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu Ala Ile Asp Ser
 275 280 285
 Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala Leu Cys His Phe
 290 295 300
 Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu Glu Trp Asp Ser
 305 310 315 320
 Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val Asn Val Val Lys
 325 330 335
 Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys Ile Pro Met Glu
 340 345 350
 Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu Ala Met Leu Glu
 355 360 365
 Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly Gln Leu Ser Pro
 370 375 380
 Val Cys Asn Gly Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser Thr Glu Lys Pro
 385 390 395 400
 Pro Gly Lys His

<210> 7
 <211> 2613
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 7

5

```

agcgggtgcg gggcgggacc ggcccggcct atatatggg ttggcgcgg cgccagctga 60
gccgagcgggt agctgggtctg gcgaggtttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
aagttagccgt ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacggaat cccccaaga 180
agcccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccag gatgtcaaaa aaagaagaga 240
ggaggtcacc aagaaacatc agtatgaaat taggaattgt tggccacctg tattatctgg 300
ggggatcagt ccttgcatca tcattgaaac acctcacaaa gaaataggaa caagtgattt 360
ctccagattt acaaattaca gatttaaaaa tctttttatt aatccttcac ctttgectga 420
tttaagctgg ggatgttcaa aagaagtctg gctaaacatg ttaaaaaagg agagcagata 480
tgttcatgac aaacattttg aagttctgca ttctgacttg gaaccacaga tgagggtccat 540
acttctagac tggcttttag aggtatgtga agtatacaca cttcataggg aaacatttta 600
tcttgcttac gtcactgatg gtgcttgca gtaagaggat atcttaagga tggaaactcat 660
tatattaaag gctttaaaat gggaaactttg tctgtaca atcatctcct ggctaaatct 720
ctttctccaa gttgatgctc ttaaagatgc tctaaagtt cttctacctc agtattctca 780
ggaaacattc attcaaatag ctcagctttt agatctgtgt attctagcca ttgattcatt 840
agagtccag tacagaatac tgactgctgc tgcttctgtc cattttacct ccattgaaat 900
ggtaagaaa gcctcaggtt tggagtggga cagtatttca gaatgtgtag attggatggg 960
accttttgtc aatgtagtaa aaagtactag tccagtgaag ctgaagactt ttaagaagat 1020
tcctatggaa gacagacata atatccagac acatacaaac tatttggcta tgctggagga 1080
agtaaattac ataaacacct tcagaaaagg gggacagttg tcaccagtg gcaatggagg 1140
cattatgaca ccaccgaaga gcactgaaaa accaccagga aaacactaaa gaagataaact 1200
aagcaaacaa gttggaattc accaagattg ggtagaactg gtatcactga actactaaag 1260
ttttacagaa agtagtgctg tgattgattg ccctagccaa ttcacaagtt acactggcat 1320
tctgatttta aaacttaca ttggcactaa agaatacatt taattatttc ctatgttagc 1380
tgtaaaagaa acagcaggac ttgtttacaa agatgtcttc attccaagg ttactggata 1440
gaagccaacc acagtctata ccatagcaat gtttttccct taatccagtg ttactgtgtt 1500
tatcttgata aactaggaat tttgtcactg gagttttgga ctggataagt gctaccttaa 1560
aggtatact aagtataca gtactttgaa tctagtgttt agattctcaa aattcctaca 1620
ctcttgacta gtgcaatttg gttcttgaaa attaaattta aactgtttta caaaggttta 1680
gttttgtaat aaggtgacta atttatctat agctgctata gcaagctatt ataaaacttg 1740
aatttctaca aatggtgaaa tttaatgttt tttaaactag tttatttgcc ttgccataac 1800
acatttttta actaataagg cttagatgaa catggtgttc aacctgtgct ctaaaccagtg 1860
ggagtaccaa agaaattata aacaagataa atgctgtggc tccttccctaa ctggggcttt 1920
cttgacatgt aggttgcttg gtaataacct ttttgtatat cacaaatttg gtgaaaaact 1980
taagtaccct ttcaaaactat ttatagagg aagtcacttt actactctaa gatattcccta 2040
aggaaatttt ttttttaatt tagtgtgact aaggctttat ttatgtttgt gaaactgtta 2100
aggtcctttc taaattcttc cattgtgaga taaggacagt gtcaaagtga taaagcttaa 2160
cacttgacct aaacttctat tttcttaagg aagaagagta ttaaataat actgactcct 2220
agaaatctat ttattaaaaa aagacatgaa aacttgctgt acataggcta gctatttcta 2280
aatattttta attagctttt ctaaaaaaaaa aatccagcct cataaagtag attagaaaaac 2340
tagattgcta gtttattttg ttatcagata tgtgaatctc ttctcccttt gaagaaacta 2400
tacatttatt gttacgggat gaagtcttct gtatagtttg tttttaaact aatattgttt 2460
tcagtatttt gtctgaaaag aaaacaccac taattgtgta catatgtatt atataaactt 2520
aaccttttaa tactgtttat ttttagccca ttgtttaaaa aataaaagtt aaaaaaattt 2580
aactgcttaa aagtaaaaaa aaaaaaaaaaa aaa 2613

```

<210> 8
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

5

```

Met Ser Arg Arg Ser Ser Arg Leu Gln Ala Lys Gln Gln Pro Gln Pro
 1          5          10          15
Ser Gln Thr Glu Ser Pro Gln Glu Ala Gln Ile Ile Gln Ala Lys Lys
          20          25          30
Arg Lys Thr Thr Gln Asp Val Lys Lys Arg Arg Glu Glu Val Thr Lys
          35          40          45
Lys His Gln Tyr Glu Ile Arg Asn Cys Trp Pro Pro Val Leu Ser Gly
          50          55          60
Gly Ile Ser Pro Cys Ile Ile Ile Glu Thr Pro His Lys Glu Ile Gly
          65          70          75          80

```

10

Thr Ser Asp Phe Ser Arg Phe Thr Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Leu Phe
 85 90 95
 Ile Asn Pro Ser Pro Leu Pro Asp Leu Ser Trp Gly Cys Ser Lys Glu
 100 105 110
 Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr Val His Asp Lys
 115 120 125
 His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln Met Arg Ser Ile
 130 135 140
 Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr Thr Leu His Arg
 145 150 155 160
 Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu Glu
 165 170 175
 Asp Ile Leu Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp Glu
 180 185 190
 Leu Cys Pro Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln Val
 195 200 205
 Asp Ala Leu Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser Gln
 210 215 220
 Glu Thr Phe Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu Ala
 225 230 235 240
 Ile Asp Ser Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala Leu
 245 250 255
 Cys His Phe Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu Glu
 260 265 270
 Trp Asp Ser Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val Asn
 275 280 285
 Val Val Lys Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys Ile
 290 295 300
 Pro Met Glu Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Glu Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly Gln
 325 330 335
 Leu Ser Pro Val Cys Asn Gly Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser Thr
 340 345 350
 Glu Lys Pro Pro Gly Lys His
 355

<210> 9
 <211> 2536
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

5

```

agcggggtgcg gggcgggacc ggcccggcct atatattggg ttggcgccgg cgccagctga 60
gccgagcggt agctgggtctg gcgagggttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
aagtagccgt ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacggaat ccccccaaga 180
agccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccag gatgtcaaaa gaagtctggc 240
taaacatggt aaaaaaggag agcagatatt ttcattgaca acattttgaa gttctgcatt 300
ctgacttgga accacagatg aggtccatac ttctagactg gcttttagag gtatgtgaag 360
tatacacact tcatagggaa acattttatc ttgcacaaga cttttttgat agatttatgt 420
tgacacaaaa ggatataaat aaaaatatgc ttcaactcat tggattacc tcattattca 480
ttgcttccaa acttgaggaa atctatgctc ctaaaactcca agagtttgct tacgtcactg 540
atgggtgctt cagtgaagag gatattctaa ggatggaact cattatatta aaggctttaa 600
aatgggaact ttgtcctgta acaatcatct cctggctaaa tctctttctc caagttgatg 660
ctcttaaaga tgctcctaaa gttcttctac ctcagtatcc tcaggaaaca ttcattcaaa 720

tagctcagct tttagatctg tgtattctag ccattgattc attagagttc cagtacagaa 780
tactgactgc tgetgccttg tgccatttta cctccattga agtggttaag aaagcctcag 840
gtttggagtg ggacagtatt tcagaatgtg tagattggat ggtacccttt gtcaatgtag 900
taaaaagtac tagtccagtg aagctgaaga cttttaagaa gattcctatg gaagacagac 960
ataatatcca gacacataca aactatttgg ctatgctgga ggagtaaat tacataaaca 1020
ccttcagaaa agggggacag ttgtcaccag tgtgcaatgg aggcattatg acaccaccga 1080
agagcactga aaaaccacca ggaaacact aaagaagata actaagcaaa caagttggaa 1140
ttaccaaga ttgggtagaa ctgggtatcac tgaactacta aagttttaca gaaagtagtg 1200
ctgtgattga ttgccttagc caattcaaaa gttacactgc cattctgatt ttaaaactta 1260

caattggcac taaagaatac atttaattat ttcctatggt agctgttaaa gaaacagcag 1320
gacttgttta caaagatgct ttcatccca aggttactgg atagaagcca accacagctc 1380
ataccatagc aatgtttttc ctttaatcca gtgttactgt gtttatcttg ataaactagg 1440
aattttgtca ctggagtttt ggactggata agtgtacct taaagggat actaagtgat 1500
acagtacttt gaatctagtt gttagattct caaaattcct acactcttga ctagtgcaat 1560
ttggttcttg aaaattaaat ttaaacttgt ttacaaaggt ttagttttgt aataaggtga 1620
ctaatttatc tatagctgct atagcaagct attataaaac ttgaatttct acaaattggtg 1680
aaatttaatg ttttttaaac tagtttattt gccttgccat aacacatttt ttaactaata 1740
aggcttagat gaacatgggtg ttcaacctgt gctcctaaaca gtgggagtac caaagaaatt 1800
ataaacaaga taaatgctgt ggctccttcc taactggggc tttcttgaca tgtaggttgc 1860
ttggttaata cctttttgta tatcaaat tgggtgaaaa acttaagtac cctttcaaac 1920
tatttatatg aggaagtcac ttactactc taagatatec ctaaggaatt ttttttttta 1980
atthagtggt actaaggctt tatttatggt tgtgaaactg ttaaggctct ttctaaattc 2040
ctccattgtg agataaggac agtgtcaaag tgataaagct taacacttga cctaaacttc 2100
tattttctta aggaagaaga gtattaaata tatactgact cctagaaatc tatttattaa 2160
aaaaagacat gaaaacttgc tgtacatagg cttagctattt ctaaattatt taaattagct 2220
ttctaaaaa aaaaatccag cctcataaag tagattagaa aactagattg ctagtttatt 2280
ttgttatcag atatgtgaat ctcttctccc tttgaagaaa ctatacattt attgttacgg 2340
tatgaagtct tctgtatagt ttgtttttaa actaatattt gtttcagtat tttgtctgaa 2400
aagaaaacac cactaattgt gtacatatgt attatataaa cttaaccttt taatactggt 2460
tatttttagc ccattgttta aaaaataaaa gttaaaaaaa ttttaactgct taaaagtaaa 2520
aaaaaaaaa aaaaaa 2536

```

- <210> 10
- <211> 296
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 10

ES 2 381 644 T3

```

Met Ser Lys Glu Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr
 1      5      10      15
Val His Asp Lys His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln
 20      25      30
Met Arg Ser Ile Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr
 35      40      45
Thr Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg
 50      55      60
Phe Met Leu Thr Gln Lys Asp Ile Asn Lys Asn Met Leu Gln Leu Ile
 65      70      75      80
Gly Ile Thr Ser Leu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Ala
 85      90      95
Pro Lys Leu Gln Glu Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu
 100     105     110
Glu Asp Ile Leu Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp
 115     120     125
Glu Leu Cys Pro Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln
 130     135     140
Val Asp Ala Leu Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser
 145     150     155     160
Gln Glu Thr Phe Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu
 165     170     175
Ala Ile Asp Ser Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala
 180     185     190
Leu Cys His Phe Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu
 195     200     205
Glu Trp Asp Ser Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val
 210     215     220
Asn Val Val Lys Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys
 225     230     235     240
Ile Pro Met Glu Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu
 245     250     255
Ala Met Leu Glu Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly
 260     265     270
Gln Leu Ser Pro Val Cys Asn Gly Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser
 275     280     285
Thr Glu Lys Pro Pro Gly Lys His

```

290

295

<210> 11
 <211> 3453
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

acttttcgcg cgaaacctgg ttggtgctgt agtggcggag aggatcgtgg tactgctatg 60
 gcggaatcat cgggaatcctt caccatggca tccagcccgg occagcgtcg gcgaggcaat 120
 gatcctctca cctccagccc tggccgaage tcccggcgta ctgatgcctt cacctccage 180
 cctggccgtg accttccacc atltgaggat gagtccgagg ggctcctagg cacagagggg 240
 cccctggagg aagaagagga tggagaggag ctcatctggag atggcatgga aagggactac 300
 cgcgccatcc cagagctgga cgcctatgag gccaggggac tggctctgga tgatgaggac 360
 gttagaggagc tgacggccag tcagagggag gcagcagagc gggccatgcy gcagcgtgac 420
 cgggaggctg gccggggcct gggccgcatg cgcctggtgg tcctgtatga cagcgtgag 480
 gaggacgagg agcgccttgc ccgcaagcgc cgcaggtgg agcgggccac ggaggaccgc 540
 gaggaggacg aggagatgat cgagagcatc gagaacctgg aggatctcaa aggccactct 600
 gtgcgcgagt ggggtgagcat ggcgggcccc cggctggaga tccaccaccg ctcaagaac 660
 ttcttgcgca ctacgctcga cagccacggc cacaacctct caaggagcg catcagcgac 720
 atgtgcaaaq agaacctgga gagcctgggt gtgaactatg aggacttggc agccagggag 780
 cactactcct cctacttccg cctgaggca cggcgggagc tgctgcagat ctttgatgag 840
 gctgccctgg aggtggtact ggccatgtac cccaagtag accgcatcac caaccacatc 900
 catgtccgca tctcccacct gccctcgggtg gaggagctgc gctcgtgag gcagctgcat 960
 ctgaaccagc tgatccgcac cagtgggggtg gtgaccagct gcactggcgt cctgccccag 1020
 ctacgcatgg tcaagtacaa ctgcaacaag tgeaatctcg tccctgggtcc tttctgcccag 1080
 tcccagaacc aggaggtgaa accaggctcc tgtcctgagt gccagtccgc cggccctctt 1140
 aaggtcaaca tggaggagac catctatcag aactaccagc gtatccgaat ccaggagagt 1200
 ccaggcaaaq tggcggctgg ccggctgccc cgtcccaagg acgccattct cctcgcagat 1260
 ctggtggaca gctgcaagcc agggagcag atagagctga ctggcatcta tcacaacaac 1320
 tatgatggct ccctcaacac tgccaatggc tccctgtct ttgcccactgt catcctagcc 1380
 aaccacgtgg ccaagaagga caacaaggtt gctgtagggg aactgaccga tgaagatgtg 1440
 aagatgatca ctagcctctc caaggatcag cagatcggag agaagatctt tgccagcatt 1500
 gctccttcca tctatggtca tgaagacatc aagagaggcc tggctctggc cctgttcgga 1560
 ggggagccca aaaaccagg tggcaagcac aaggtagctg gtgatataca cgtgctcttg 1620
 tgcggagacc ctggcacagc gaagtgcag tttctcaagt atattgagaa agtgtccagc 1680
 cgagccatct tcaccactgg ccagggggcg tccgctgtgg gcctcacggc gtatgtccag 1740
 cggcaccctg tcagcaggga gtggaccctg gaggctgggg ccctggttct gctgaccga 1800
 ggagtgtgtc tcattgatga atttgacaag atgaatgacc aggacagaac cagcatccat 1860
 gaggccatga agcaacagag catctccatc tgaaggctg gcctcgtcac cctcctgag 1920
 gctcgtgca cggctatgct tgccgccaac cccataggag ggcgctacga cctcctgctg 1980
 actttctctg agaactgga cctcacagag cccatcatct caegcttga catcctgtgt 2040
 gtggtgaggg acaccgtgga ccagtcacc gacgagatgc tggcccgtt cgtggtgggc 2100
 agccacgtca gacaccacc cagcaacaag gaggaggagg ggctggccaa tggcagcgt 2160
 gctgagcccg ccatgcccac caagtatggc gtggagcccc tgcccagga ggtcctgag 2220
 aagtacatca tctacgcca ggagagggct caccgaagc tcaaccagat ggaccaggac 2280
 aagtgcccca agatgtacag tgaactgagg aaagaatcta tggogacagg cagcaatccc 2340
 attacgggtc ggcacatcga gtccatgatc cgcctggcgg aggccacgc gcgcatccat 2400
 ctgcccggact atgtgatcga agacgacgtc aacatggcca tccgctgat gctggagagc 2460
 ttcatagaca cacagaagtt cagcgtcatg cgcagcatgc gcaagacttt tgcccgtac 2520
 ctttcaattcc ggcgtgacaa caatgagctg ttgctcttca tactgaagca gttagtggca 2580
 gagcaggtga catatcagcg caaccgcttt gggcccagc aggacactat tgaggctcct 2640
 gagaaggact tgggtgataa ggctcgtcag atcaacatcc acaacctctc tgcattttat 2700
 gacagtgagc tcttcaggat gaacaagttc agccacgacc tgaaaaggaa aatgatcctg 2760
 cagcagttct gaggccctat gccatccata aggatctctt gggattcttg tttggggtgg 2820
 tcagtgccct ctgtgcttta tggacacaaa accagagcac ttgatgaact cggggacta 2880
 gggtcagggc ttatagcagg atgtctggct gcacctggca tgactgtttg tttctccaag 2940
 cctgctttgt gcttctcacc ttgggtggg atgcccctgc agtgtgtctt acttggttgc 3000
 tgaacatctt gccacctccg agtgccttgc ctccactcag taccttggat cagagctgct 3060
 gaggtcagga tgcctcgtg tggcttaggt gttagccttc ttacatggat gtcaggagag 3120
 ctgctgccct cttggcgtga gttgcgtatt caggctgctt ttgctgctt tggccagaga 3180
 gctggttgaa gatgtttgta atcgttttca gtctcctgca ggtttctgtg cccctgtgg 3240
 ggaagagggc acgacagtgc cagcgcagcg ttctgggctc ctacgtcga ggggtgggat 3300
 gtgagtcatg cggatbatcc actcgcacaa gttatcagct gccattgctc cctgtctgtt 3360
 tccccactct cttatttgtg catcgggtt ggtttctgta gttttaattt ttaataaagt 3420

tgaataaaat ataaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa 3453

5
 <210> 12
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser
 20 25 30
 Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro
 35 40 45
 Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu
 50 55 60
 Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala
 85 90 95
 Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala
 100 105 110
 Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu
 115 120 125
 Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu
 130 135 140
 Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp
 165 170 175
 Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser Met Ala Gly Pro Arg
 180 185 190
 Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp
 195 200 205
 Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys
 210 215 220
 Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro
 260 265 270
 Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu
 275 280 285
 Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln
 290 295 300
 Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro
 305 310 315 320
 Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu
 325 330 335
 Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys
 340 345 350
 Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr
 355 360 365
 Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380
 Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly
 405 410 415
 Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe
 420 425 430
 Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp
 435 440 445
 Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile

```

      450              455              460
Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser
465              470              475              480
Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala
              485              490              495
Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys
              500              505              510
Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala
              515              520              525
Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile
              530              535              540
Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val
545              550              555              560
Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu
              565              570              575
Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met
              580              585              590
Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser
              595              600              605
Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys
610              615              620
Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser
625              630              635              640
Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg
              645              650              655
Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp
              660              665              670
Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro
              675              680              685
Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro
690              695              700
Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu
705              710              715              720
Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val His Pro Lys Leu Asn
              725              730              735
Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys

              740              745              750
Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu
              755              760              765
Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Ile His Leu Arg Asp
770              775              780
Tyr Val Ile Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Leu Glu
785              790              795              800
Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys
              805              810              815
Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu
              820              825              830
Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg
              835              840              845
Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp
850              855              860
Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe
865              870              875              880
Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys
              885              890              895
Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe
900

```

<210> 13
 <211> 2821
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

```

egccccttcc cagccccaag ggtctagat acagtctttg tagatgagcg ggtccccctt 60
ggaggacaga atgaagaatt gggaaatcat ggccgttctg gagagtagac aagaagacgg 120
cgaaagtcgg gcctgccccg ccctgcggcc ccggaacaaa agaacgcgtg tgcgctggcc 180
ctttaagagc gatttctctc cgcccgccgc agctcggacc gcgggaaacc cggcgccctg 240
actacccccg coggagattc ccttccgacg ccgcaccgcg ctccccgtca ctcatctctag 300
gcccgcacgg tgattggctt gccgctagcg ggagggtgaag aaggccgcct tctccgattg 360
gcccgcacgc agtggcgccg gtcacgtggg gggcgacgtt tcgcgccaat ttcggttggc 420
cggccacagt ccaccgcgcg gagattctca gcttccccag gagcaagacc tctgagcccc 480
ccaagcgcg cgcacggcc ctcggcagcg atggcactga aggactacg gctagagaag 540
gaaaaggtta agaagttctt acaagagttc taccaggatg atgaactcgg gaagaagcag 600
ttcaagtatg ggaaccagt ggttcggctg gctcatcggg aacaggtggc tctgtatgtg 660
gacctggacg acgtagcoga ggatgacccc gagttggtgg actcaatttg tgagaatgcc 720
aggcgctacg cgaagctctt tgctgatgcc gtacaagagc tgctgcctca gtacaaggag 780
agggagtg taaataaaga tgtcctggac gtttacattg agcatcggct aatgatggag 840
cagcggatcg gggaccctgg gatggtccga agccccaga accagtacc tctgaactc 900
atgcccagat ttgagctgta tttcaaggc cctagcagca acaagcctcg tgtgatccg 960
gaagtgcggg ctgactctgt ggggaagtgg gtaactgtgc gtggaatcgt cactcgtgtc 1020
tctgaagtca aacccaagat ggtggtggcc acttacactt gtgaccagtg tggggcagag 1080
acctaccagc cgatccagtc tcccactttc atgcctctga tcatgtgccc aagccaggag 1140
tgccaaacca accgctcagg agggcggtg tatctgcaga cacggggctc cagattcatc 1200
aaattccagg agatgaagat gcaagaacat agtcatcagg tgctctgagg aaatattccc 1260
cgtagtatca cgggtctggt agaaggagag aacacaagga ttgccagcc tggagaccac 1320
gtcagcgtca ctggtat ttt ctgccaatc ctgcgcactg ggttccgaca ggtggtacag 1380
ggtttactct cagaaaccta cctggaagcc catcggattg tgaagatgaa caagagttag 1440
gatgatgagt ctggggctgg agagctcacc agggaggagc tgaggcaaat tgcagaggag 1500
gatttctacg aaaagctggc agcttcaatc gcccagaaa tatacgggca tgaagatgtg 1560
aagaaggcac tctgctcctt gctagtggg ggtgtggacc agtctcctcg aggcattgaaa 1620
atccggggca acatcaacat ctgtctgatg ggggatcctg gtgtggccea gctcagctc 1680
ctgtcataca ttgatcgact ggcgctcgc agccagtaca caacaggccg gggtcctca 1740
ggagtggggc ttacggcagc tgtgctgaga gactccgtga gtggagaact gaccttagag 1800
ggtggggccc tgggtctggc tgaccagggt gtgtgctgca ttgatgagtt cgacaagatg 1860
gctgaggccg accgcacagc catccacgag gtcattggagc agcagaccat ctccattgce 1920
aaggccggca ttctcaccac actcaatgcc cgctgctcca tectggtgc cgccaacct 1980
gcctacgggc gctacaacce tcgccgcagc ctggagcaga acatacagct acctgctgca 2040
ctgctctccc ggtttgacct cctctggctg attcaggacc ggcccagacc agacaatgac 2100
ctacggttgg cccagcacat cacctatgtg caccagcaca gccggcagcc cccctcccag 2160
tttgaacctc tggacatgaa gctcatgagg cgttacatag ccatgtgccc cgagaagcag 2220
cccatggtgc cagagtctct ggtgactac atcacagcag catacgtgga gatgaggcga 2280
gaggtcttgg ctagttaagg tggccacct atctctgccc ggacctgct ggtatctctg 2340
cgctttcca ctgctctggc acgtctgaga atggtggatg tggtggagaa agaagatgtg 2400
aatgaagcca tcaggctaat ggagatgtca aaggactctc ttctaggaga caagggggcag 2460
acagctagga ctcagagacc agcagatgtg atatttgcca ccgtccgtga actgggtctca 2520
gggggcccga gtgtccgggt ctctgaggca gaggcagcgt gtgtatctcg tggcttcaca 2580
cccggccagt tccaggcggc tctggatgaa tatgaggagc tcaatgtctg gcaggctaat 2640
gcttcccggg cacggatcac tttgtctgga ttccagcctg cttgcaacct tggggctctc 2700
ttgttccctg ctggcctgcc ccttgggaag gggcagtgat gcctttgagg ggaaggagga 2760
gccctcttt cctccatgct gca.cttactc cttttgctaa taaaagtgtt tgtagattgt 2820
c

```

- <210> 14
- <211> 719
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 14

5

ES 2 381 644 T3

```

Met Ala Leu Lys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Glu Lys Val Lys Lys Phe
 1          5          10          15
Leu Gln Glu Phe Tyr Gln Asp Asp Glu Leu Gly Lys Lys Gln Phe Lys
          20          25          30
Tyr Gly Asn Gln Leu Val Arg Leu Ala His Arg Glu Gln Val Ala Leu
          35          40          45
Tyr Val Asp Leu Asp Asp Val Ala Glu Asp Asp Pro Glu Leu Val Asp
          50          55          60
Ser Ile Cys Glu Asn Ala Arg Arg Tyr Ala Lys Leu Phe Ala Asp Ala
          65          70          75          80
Val Gln Glu Leu Leu Pro Gln Tyr Lys Glu Arg Glu Val Val Asn Lys

```

					85					90					95				
Asp	Val	Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Glu	His	Arg	Leu	Met	Met	Glu	Gln	Arg				
			100					105					110						
Ser	Arg	Asp	Pro	Gly	Met	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Asn	Gln	Tyr	Pro	Ala				
		115					120					125							
Glu	Leu	Met	Arg	Arg	Phe	Glu	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Asn				
		130				135					140								
Lys	Pro	Arg	Val	Ile	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Gly	Lys	Leu				
		145				150				155					160				
Val	Thr	Val	Arg	Gly	Ile	Val	Thr	Arg	Val	Ser	Glu	Val	Lys	Pro	Lys				
				165					170						175				
Met	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asp	Gln	Cys	Gly	Ala	Glu	Thr	Tyr				
			180					185					190						
Gln	Pro	Ile	Gln	Ser	Pro	Thr	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Ser				
		195					200					205							
Gln	Glu	Cys	Gln	Thr	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gln	Thr				
		210				215						220							
Arg	Gly	Ser	Arg	Phe	Ile	Lys	Phe	Gln	Glu	Met	Lys	Met	Gln	Glu	His				
		225				230				235					240				
Ser	Asp	Gln	Val	Pro	Val	Gly	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Val	Leu				
				245					250						255				
Val	Glu	Gly	Glu	Asn	Thr	Arg	Ile	Ala	Gln	Pro	Gly	Asp	His	Val	Ser				
			260					265					270						
Val	Thr	Gly	Ile	Phe	Leu	Pro	Ile	Leu	Arg	Thr	Gly	Phe	Arg	Gln	Val				
			275				280					285							
Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Thr	Tyr	Leu	Glu	Ala	His	Arg	Ile	Val				
			290				295				300								
Lys	Met	Asn	Lys	Ser	Glu	Asp	Asp	Glu	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr				
				310						315					320				
Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Ile	Ala	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu				
				325					330						335				
Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Glu	Ile	Tyr	Gly	His	Glu	Asp	Val	Lys	Lys				
			340					345					350						
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Asp	Gln	Ser	Pro	Arg	Gly				
			355				360					365							
Met	Lys	Ile	Arg	Gly	Asn	Ile	Asn	Ile	Cys	Leu	Met	Gly	Asp	Pro	Gly				
		370				375					380								
Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Leu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Pro	Arg					
				390					395						400				
Ser	Gln	Tyr	Thr	Thr	Gly	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	Leu	Thr	Ala				
				405					410						415				
Ala	Val	Leu	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly				
			420					425							430				
Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Gln	Gly	Val	Cys	Cys	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp				
			435				440					445							
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Asp	Arg	Thr	Ala	Ile	His	Glu	Val	Met	Glu	Gln				
			450			455					460								
Gln	Thr	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Asn	Ala				
				470						475					480				
Arg	Cys	Ser	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Asn				
				485					490						495				
Pro	Arg	Arg	Ser	Leu	Glu	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Leu				
			500					505							510				
Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Pro	Asp	Arg	Asp				
			515				520					525							
Asn	Asp	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	His	Ile	Thr	Tyr	Val	His	Gln	His	Ser				
			530			535					540								
Arg	Gln	Pro	Pro	Ser	Gln	Phe	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Lys	Leu	Met	Arg				
				550						555					560				
Arg	Tyr	Ile	Ala	Met	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Pro	Met	Val	Pro	Glu	Ser				
				565					570						575				
Leu	Ala	Asp	Tyr	Ile	Thr	Ala	Ala	Tyr	Val	Glu	Met	Arg	Arg	Glu	Ala				
			580					585							590				
Trp	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Ala				
			595				600								605				
Ile	Leu	Arg	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Met	Val	Asp	Val				

ES 2 381 644 T3

	610					615						620			
Val	Glu	Lys	Glu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Ile	Arg	Leu	Met	Glu	Met	Ser
625					630					635					640
Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Gly	Asp	Lys	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Thr	Gln	Arg
				645					650					655	
Pro	Ala	Asp	Val	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Gly	Gly
			660					665					670		
Arg	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Gln	Arg	Cys	Val	Ser	Arg	Gly
		675						680				685			
Phe	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Gln	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Leu
	690					695					700				
Asn	Val	Trp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	Thr	Phe	Val	
705					710						715				

<210> 15
 <211> 2900
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

ES 2 381 644 T3

```

agtgtcgtgt aaacagtgtc cttccgcgcg gcgccgcgcg agagagctgc ggccccgggg 60
ggcgtgcctg ggatccggag cttcgcctcg gcccgggaaa ggcggcagtg ggctggggtc 120
gcggtgtctc tgggtgtgat ggccaatggc tggactggct cccgccctgg gcggaggaat 180
cccagctgtg gaagcggctg gaatccgggc ccatgtgctt ctttgtttac taagagcggg 240
agcgtatggc ggagcggggg tggggtgcgg tggcggggtg cggtgggcga ggtcccggtg 300
aaatcagggg ctaagggggac ccaaagaagg cgggggatca taggggtgga aagaagctg 360
agaaccttga gaccggagtg tgaggggcca acggggagg gcgctagaat tttaaactaa 420
agttagggacc ggaattcccc tggggagatg ttggatggcc ctgtgcactg ccacgggctc 480
tttattcttc gctggttaga aacagacttg tgaaaaagag ttatgccac tttggggaga 540
cttcgaaaag gtaagaagt tcttacaaga gttctaccag gatgatgaac tcgggaagaa 600
gcagttcaag tatgggaacc agttggttcg gctggctcat cgggaaccagg tggctctgta 660
tgtggacctg gacgacgtag ccgaggatga ccccgagttg gtggactcaa tttgtgagaa 720
tgccaggcgc tacgcgaagc tctttgctga tgccgtacaa gagctgctgc ctcaagtaca 780
ggagagggaa gtggtaata aagatgtcct ggacgtttac attgagcatc ggctaataat 840
ggagcagcgg agtcgggacc ctgggatggt ccgaagcccc cagaaccagt acctgctga 900
actcatgcgc agattgtgag tggctctctg cgggaaagat gtagggattg gttctccagg 960
atcttgtttg tgactgtttt ctcoccttag tgagctgtat tttcaaggcc ctacgagcaa 1020
caagcctcgt gtgatccggg aagtcggggc tgactctgtg gggaaagtgg taactgtgcg 1080
tggaatcgtc actcgtgtct ctgaagtcaa acccaagatg gtggtggcca cttaacttg 1140
tgaccagtgt ggggcagaga cctaccagcc gatccagctt cccactttca tgcctctgat 1200
catgtgcca agccaggagt gccaaaccaa ccgctcagga gggcggctgt atctgcagac 1260
acggggctcc agattcatca aattccagga gatgaagatg caagaacata gtgatcaggt 1320
gcctgtggga aatatccctc gtagtatcac ggtgctggta gaaggagaga acacaaggat 1380
tgcccagcct ggagaccacg tcagcgtcac tggatatttc ttgccaatcc tgcgcaactg 1440
gttccgacag gtggtacagg gtttactctc agaaacctac ctggaagccc atcggattgt 1500
gaagatgaac aagagtgagg atgatgagtc tggggctgga gagctcacca gggagagct 1560
gaggcaaat gcagaggagg atttctacga aaagctggca gcttcaatcg cccagaaat 1620
atacgggcat gaagatgtga agaaggcact gctgctcctg ctagtccggg gtgtggacca 1680
gtctctcga ggcatgaaaa tccggggcaa catcaacatc tgtctgatgg gggatcctgg 1740
tgtggccaag tctcagctcc tgtcatacat tgatogactg gcgcctcgca gccagtacac 1800
aacaggcccg ggctcctcag gagtggggct tacggcagct gtgctgagag actcctgag 1860
tggagaactg accttagagg gtggggccct ggtgctggct gaccaggtg tgctgtgat 1920
tgatgagttc gacaagatcg ctgaggccga ccgcacagcc atccacgagg tcatggagca 1980
gcagaccatc tccattgcca aggccggcat tctcaccaca ctcaatgcc gctgctccat 2040
cctggctgcc gccaacctc cctacgggcg ctacaacct cgcgcagcc tggagcagaa 2100
catacagcta cctgctgcac tgcctccccg gtttgacct ctctggctga ttcaggaccg 2160
gcccagcca gacaatgacc tacggttggc ccagcacatc acctatgtgc accagcacag 2220
coggcagccc cctcccagt ttgaacctc ggacatgaag ctcatgaggc gttacatagc 2280
catgtgcgc gagaagcagc ccatggtgcc agagtctctg gctgactaca tcacagcagc 2340
atacgtggag atgaggcgag aggcctgggc tagtaaggat gccacctata ctctgcccg 2400
gacctgctg gctatcctgc gcttccac tgctctggca cgtctgagaa tgggtggatgt 2460
ggtggagaaa gaagatgtga atgaagccat caggctaatt gagatgtcaa aggactctct 2520
tctaggagac aaggggcaga cagctaggac tcagagacca gcagatgtga tatttgccac 2580
cgtccgtgaa ctggtctcag gggccggaag tgcctggctc tctgaggcag agcagcctg 2640
tgtatctcgt ggcttcacac ccgccagtt ccaggcggct ctggatgaat atgaggagct 2700

caatgtctgg caggtcaatg cttcccgac acggatcaet tttgtctgat tccagcctgc 2760
ttgcaacct ggggtcctct tgttccctgc tggcctgcc cttgggaagg ggcagtgatg 2820
cctttgaggg gaaggaggag cccctcttc tcccatgctg cacttactcc ttttctaata 2880
aaaagtgttt gtagatttgt                                     2900

```

<210> 16
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

5

Met Val Val Ala Thr Tyr Thr Cys Asp Gln Cys Gly Ala Glu Thr Tyr
1 5 10 15
Gln Pro Ile Gln Ser Pro Thr Phe Met Pro Leu Ile Met Cys Pro Ser
20 25 30
Gln Glu Cys Gln Thr Asn Arg Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Gln Thr
35 40 45
Arg Gly Ser Arg Phe Ile Lys Phe Gln Glu Met Lys Met Gln Glu His
50 55 60
Ser Asp Gln Val Pro Val Gly Asn Ile Pro Arg Ser Ile Thr Val Leu
65 70 75 80
Val Glu Gly Glu Asn Thr Arg Ile Ala Gln Pro Gly Asp His Val Ser
85 90 95
Val Thr Gly Ile Phe Leu Pro Ile Leu Arg Thr Gly Phe Arg Gln Val
100 105 110
Val Gln Gly Leu Leu Ser Glu Thr Tyr Leu Glu Ala His Arg Ile Val
115 120 125
Lys Met Asn Lys Ser Glu Asp Asp Glu Ser Gly Ala Gly Glu Leu Thr
130 135 140
Arg Glu Glu Leu Arg Gln Ile Ala Glu Glu Asp Phe Tyr Glu Lys Leu
145 150 155 160
Ala Ala Ser Ile Ala Pro Glu Ile Tyr Gly His Glu Asp Val Lys Lys
165 170 175
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Gly Val Asp Gln Ser Pro Arg Gly
180 185 190
Met Lys Ile Arg Gly Asn Ile Asn Ile Cys Leu Met Gly Asp Pro Gly
195 200 205
Val Ala Lys Ser Gln Leu Leu Ser Tyr Ile Asp Arg Leu Ala Pro Arg
210 215 220
Ser Gln Tyr Thr Thr Gly Arg Gly Ser Ser Gly Val Gly Leu Thr Ala
225 230 235 240
Ala Val Leu Arg Asp Ser Val Ser Gly Glu Leu Thr Leu Glu Gly Gly
245 250 255
Ala Leu Val Leu Ala Asp Gln Gly Val Cys Cys Ile Asp Glu Phe Asp
260 265 270
Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Thr Ala Ile His Glu Val Met Glu Gln
275 280 285
Gln Thr Ile Ser Ile Ala Lys Ala Gly Ile Leu Thr Thr Leu Asn Ala
290 295 300
Arg Cys Ser Ile Leu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Tyr Gly Arg Tyr Asn
305 310 315 320
Pro Arg Arg Ser Leu Glu Gln Asn Ile Gln Leu Pro Ala Ala Leu Leu
325 330 335
Ser Arg Phe Asp Leu Leu Trp Leu Ile Gln Asp Arg Pro Asp Arg Asp
340 345 350
Asn Asp Leu Arg Leu Ala Gln His Ile Thr Tyr Val His Gln His Ser
355 360 365
Arg Gln Pro Pro Ser Gln Phe Glu Pro Leu Asp Met Lys Leu Met Arg
370 375 380
Arg Tyr Ile Ala Met Cys Arg Glu Lys Gln Pro Met Val Pro Glu Ser
385 390 395 400
Leu Ala Asp Tyr Ile Thr Ala Ala Tyr Val Glu Met Arg Arg Glu Ala
405 410 415
Trp Ala Ser Lys Asp Ala Thr Tyr Thr Ser Ala Arg Thr Leu Leu Ala
420 425 430

ES 2 381 644 T3

Ile	Leu	Arg	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Met	Val	Asp	Val
		435					440					445			
Val	Glu	Lys	Glu	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Ile	Arg	Leu	Met	Glu	Met	Ser
450						455					460				
Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Gly	Asp	Lys	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Thr	Gln	Arg
465					470					475					480
Pro	Ala	Asp	Val	Ile	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Gly	Gly
				485					490					495	
Arg	Ser	Val	Arg	Phe	Ser	Glu	Ala	Glu	Gln	Arg	Cys	Val	Ser	Arg	Gly
			500					505					510		
Phe	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Gln	Ala	Ala	Leu	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Leu
		515					520					525			
Asn	Val	Trp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Thr	Arg	Ile	Thr	Phe	Val	
	530					535					540				

<210> 17
 <211> 2140
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 17

5

```

agctgagggtg  tgagcagctg  ccgaagtcag  ttccttgtgg  agccggagct  gggcgcgat  60
tcgccgaggc  accgaggcac  tcagaggagg  cgccatgtca  gaaccggctg  gggatgtccg  120
tcagaaccca  tgcggcagca  aggcctgccg  ccgcctcttc  ggcccagtgg  acagcgagca  180
gctgagccgc  gactgtgatg  cgtaaatggc  gggctgcatc  caggaggccc  gtgagcgatg  240
gaacttcgac  tttgtcaccg  agacaccact  ggaggggtgac  ttgcctggg  agcgtgtcgc  300
gggccttggc  ctgcccgaagc  tetaccttcc  cacggggccc  cggcgaggcc  gggatgagtt  360
gggaggaggc  aggcggcctg  gcacctcacc  tgctctgctg  caggggacag  cagaggaaga  420
ccatgtggac  ctgtcactgt  cttgtaccct  tgtgcctcgc  tcaggggagc  aggctgaagg  480
gtccccaggt  ggacctggag  actctcaggg  tcgaaaaagg  cggcagacca  gcatgacaga  540
tttctaccac  tccaaacgcc  ggctgatctt  ctccaagagg  aagccctaat  ccgcccacag  600
gaagcctgca  gtcctggaag  cgogagggcc  tcaaaggccc  gctctacatc  ttctgcctta  660
gtctcagttt  gtgtgtctta  attattattt  gtgttttaat  ttaaacacct  cctcatgtac  720
ataccctgca  cgccccctgc  cccccagcct  ctggcattag  aattatttaa  acaaaaacta  780
ggcgggtgaa  tgagaggttc  ctaagagtg  tgggcatttt  tabtttatga  aatactattt  840
aaagcctect  catcccggtg  tctccttttc  ctctctcccg  gaggttgggt  gggccggctt  900
catgccagct  acttctctct  cccaacttgt  ccgctgggtg  gtaccctctg  gaggggtgtg  960
gctccttccc  atcgtctgca  caggcgggta  tgaaattcac  cccctttcct  ggacactcag  1020
acctgaattc  tttttcattt  gagaagtaaa  cagatggcac  tttgaagggg  cctcaccgag  1080
tgggggcatc  atcaaaaact  ttggagtccc  ctcacctcct  ctaagggttg  gcagggtgac  1140
cctgaagtga  gcacagccta  gggctgagct  ggggacctgg  taccctcctg  gctcttgata  1200
ccccctctg  tottgtagag  gcaggggaa  ggtgggttac  tggagcagac  caccctgctt  1260
gcccctcatg  cccctctgac  ctgcactggg  gagcccgtct  cagtgttgag  ccttttccct  1320
ctttggctcc  cctgtacctt  ttgaggagcc  ccagcttacc  cttctctctc  agctgggctc  1380
tgcaattccc  ctctgtgtgt  gtccctcccc  cttgtctttc  ccttcagtac  cctctcatgc  1440
tccaggtggc  tctgaggtgc  ctgtcccacc  cccaccccca  gctcaatgga  ctggaagggg  1500
aagggacaca  caagaagaag  ggcaaccctg  ttctacctca  ggcagctcaa  gcagcgaccg  1560
ccccctctc  tagctgtggg  ggtgagggtc  ccatgtggtg  gcacaggccc  ccttgagtgg  1620
ggttatctct  gtgttagggg  tatatgatgg  gggagtagat  ctttctagga  gggagacact  1680
ggcccctcaa  atcgtccagc  gaccttcctc  atccaccoca  tccctcccca  gttcattgca  1740
ctttgattag  cagcggaaac  aggagtcaga  cattttaaga  tgggtggcag  agaggctatg  1800
gacagggcat  gccacgtggg  ctcatatggg  gctgggagta  gttgtctttc  ctggcactaa  1860
cgttgagccc  ctggaggcac  tgaagtgcct  agtgtacttg  gagtattggg  gtctgacccc  1920
aaacaccttc  cagetctgt  aaataactgg  cctggactgt  tttctctcgg  ctccccatgt  1980
gtcctgggtc  cggtttctcc  acctagactg  taaacctctc  gagggcaggg  accacacct  2040
gtactgttct  gtgtctttca  cagctcctcc  cacaatgctg  aatatacagc  aggtgctcaa  2100
taaatgattc  ttagtgactt  taaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  2140
    
```

10

<210> 18
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 18

15

Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys

1 5 10 15

Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg
 20 25 30

Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg
 35 40 45

Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala
 50 55 60

Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr
 65 70 75 80

Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg Arg Pro Gly
 85 90 95

Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp
 100 105 110

Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu
 115 120 125

Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln
 130 135 140

Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Pro

<210> 19
 <211> 2281
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 19

ES 2 381 644 T3

```

agctgaggtg tgagcagctg ccgaagtacg ttccttgtgg agccggagct gggcgcggat 60
tcgcccaggg accgagggcac tcagaggagg tgagagagcg gcggcagaca acagggggacc 120
ccgggcccggc ggcccagagc cgagccaagc gtgcccgcgt gtgtccctgc gtgtccgcga 180
ggatgctgtg tcgcccgggtgt gtgctgcgtt cacagggtgt tctgcccagc gcgccatgtc 240
agaaccggct ggggatgtcc gtcagaacct atgcccagc aaggcctgcc gccgcctctt 300
cggcccagtg gacagcgagc agctgagccg cgactgtgat gcgctaattg cgggctgcat 360
ccaggaggcc cgtgagcgat ggaacttoga ctttgtcacc gagacaccac tggagggtga 420
cttcgcctgg gagcgtgtgc ggggccttgg cctgcccagc ctctaccttc cccggggcc 480
ccggcgaagg cgggatgagt tgggaggagg caggcggcct ggcacctcac ctgctctgct 540
gcaggggaca gcagaggaag accatgtgga cctgtcactg tcttgtacct ttgtgcctcg 600
ctcaggggag caggctgaag ggtcccagc tggacctgga gactctcagg gtcgaaaacg 660
gcggcagacc agcatgacag atttctacca ctccaaacgc cggctgatct tctccaagag 720
gaagccctaa tccgcccaca ggaagcctgc agtctggaa gcgcgagggc ctcaaaggcc 780
cgctctacat ctctgcctt agtctcagtt tgtgtgtctt aattattatt tgtgttttaa 840
tttaaaccac tccctcatgta cataccctgg ccgcccctg cccccagc tctggcatta 900
gaattattta aacaaaaact aggcggttga atgagaggtt cctaagagtg ctgggcattt 960
ttattttatg aaatactatt taaagcctcc tcatcccgct ttctcctttt cctctctccc 1020
ggagggtggg tgggcggcct tcatgccagc tacttccctc tccccacttg tccgctgggt 1080
ggtacctctt ggaggggtgt ggctccttcc catcgtgtc acaggcgggt atgaaattca 1140
cccccttcc tggacactca gacctgaatt cttttcatt tgagaagtaa acagatggca 1200
ctttgaaggg gcctcaccga gtgggggat catcaaaaac tttggagtcc cctcacctcc 1260
tetaaggttg ggcaggggtga cctgaagtg agcacagcct agggctgagc tggggacctg 1320
gtaccctcct ggcctctgat accccctct gtcttgtgaa ggcaggggga aggtggggtc 1380
ctggagcaga ccaccccggc tgcctcatg gccctctga cctgcactgg ggagcccgtc 1440
tcagtgttga gccttttccc tctttggctc cctgtacct tttgaggagc cccagctacc 1500
cttctctctc agctgggctc tgaattccc ctctgctgct gtccctcccc cttgtccttt 1560
ccctcagta cctctcagc tccaggtggc tctgaggtgc ctgtcccacc cccaccccca 1620
gctcaatgga ctggaagggg aagggacaca caagaagaag ggcacctag ttctacctca 1680
ggcagctcaa gcagcgaccg cccctctctc tagctgtggg ggtgagggtc ccatgtgggt 1740
gcacagggcc ccttgagtg gggtatctct gtgttagggg tatatgatgg gggagtagat 1800
ctttctagga gggagacact ggcccctcaa atcgtccagc gaccttctc atccacocca 1860
tcctcccca gttcattgca ctttgattag cagcgggaaca aggagtoga cattttaaga 1920
tggtygcagt agaggctatg gacagggcat gccacgtggg ctcatatggg gctggggagta 1980
gttgtcttcc ctggcactaa cgttgagccc ctggaggcac tgaagtgtct agtgtacttg 2040
gagtattggg gtctgacccc aaacaccttc cagctcctgt aacatactgg cctggactgt 2100
tttctctcgg ctcccctatgt gtcctgggtc ccgtttctcc acctagactg taaacctctc 2160
gagggcaggg accacacct gtactgttct gtgtctttca cagctcctcc cacaatgctg 2220

aatatacagc aggtgctcaa taaatgattc ttagtgactt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
a
2281

```

- <210> 20
- <211> 164
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 20

5

ES 2 381 644 T3

```

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

```

<210> 21
 <211> 1275
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

5

```

cctccetaag ggcgcctccg gcagcccttc ccgcgtgccc agggctcaga gccgttccga 60
gatcctggag gtccgggtgg gagtgggggt ggggtggggg tgggggtgaa ggtggggggc 120
gggcgcgctc aggaaggcgg ggtgcgcgcc tgcggggcgg agatgggcag gggcggtgc 180
gtgggtccca gtctgcagtt aagggggcag gaggggcgt gctcacctct ggtgccaag 240
ggcggcgcag cggctgccga gctcggccct ggagggcggc agaacatggt gcgcaggttc 300
ttggtgacct tccggattcg gcgcgcgtgc ggcccgcgc gagtgagggt tttcgtggtt 360
cacatcccgc ggctcacggg ggagtgggca gcgccagggg cgcgccccgc tgtggccctc 420
gtgctgatgc tactgaggag ccagcgtcta gggcagcagc cgcttcctag aagaccaggt 480
catgatgatg gccagcgcgc gagtggcgga gctgctgctg ctccacggcg cggagcccaa 540
ctgcccggac cccgccactc tcacccgacc cgtgcacgac getgcccggg agggcttct 600
ggacacgctg gtggtgctgc accgggcccg ggccggcctg gacgtgcgcg atgcctgggg 660
ccgtctgccc gtggacctgg ctgaggagct gggccatcgc gatgtcgcac ggtacctgcg 720
cgcggctgcg gggggcaccg gaggcagtaa ccctgcgccg atagatgccg cggagggtcc 780
ctcagacatc cccgattgaa agaaccagag aggcctctgag aaacctcggg aaacttagat 840
catcagtcac cgaaggtcct acagggccac aactgcccc gccacaacc accccgcttt 900
cgtagttttc atttagaaaa tagagctttt aaaaatgtcc tgccttttaa cgtagatata 960
tgccttcccc cactaccgta aatgtccatt tatatcattt tttatatatt cttataaaaa 1020
tgtaaaaaag aaaaacaccg cttctgcctt ttcactgtgt tggagttttc tggagtgagc 1080
actcacgccc taagcgcaca ttcattgtgg catttcttgc gagectcgca gectccggaa 1140
gctgtcgact tcatgacaag cattttgtga actagggag ctcagggggg ttactggctt 1200
ctcttgagtc acactgctag caaatggcag aaccaaagct caaataaaaa taaataaatt 1260
ttcattcatt cactc 1275

```

10

<210> 22
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

15

```

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

```

<210> 23
 <211> 5698
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

```

aggttcaagt ggagctctcc taaccgacgc gcgtctgtgg agaagcggct tggctcggggg 50
tggctcctgtg gggctcctgoc tgttttagtgc ctttcagggt tcttgagccc cttcaccgacc 120
gtcaccatgg aagtgtcacc attgcagcct gtaaatgaaa atatgcaagt caacaaaata 180
aagaaaaatg aagatgctaa gaaaagactg tctgttgaaa gaatctatca aaagasaaca 240
caattggaac atatttttgc cgcgccagac acctacattg gttctgtgga attagtgacc 300
cagcaaatgt gggtttacga tgaagatggt ggcattaact ataggggaag cacttttgtt 360
cctggtttgt acaaaatctt tgatgagatt ctagttaatg ctgctggaca caaacaagg 420
gacccaaaaa tgtcttgtat tagagtcaaca attgatccgg aaaacaattt aattagtata 480
tggaaataatg gaaaaggat tctgttgtt gaacacaaag ttgaaaagat gtatgtccca 540
gctctcatat ttggacagct cctaacttct agtaactatg atgatgatga aaagaaagtg 600
acaggtggtc gaaatggeta tggagccaaa ttgtgtaaca tattcagtac caaatttact 660
gtggaaacag ccagtagaga atacaagaaa atgttcaaac agacatggat ggataatatg 720
ggaagagctg gtgagatgga actcaagccc tccaatggag aagattatac atgtatcacc 780
tttcagcctg atttgtctaa gtttaaaatg caaagcctgg acaaaagata tgttgcacta 840
atggtcagaa gagcatatga tattgtctgga tccaccaaag atgtcaaagt ctttcttaat 900
ggaaataaac tgcagtaaa aggatttctg agttatgtgg acatgtattt gaaggacaag 960
ttggatgaaa ctggtaactc cttgaaagta atacatgaac aagtaacca caggtgggaa 1020
gtgtgtttaa ctatgagtga aaaaggcttt cagcaatta gctttgtcaa cagcattgct 1080
acatccaagg gtggcagaca tgttgattat gtactgatc agattgtgac taaacttgtt 1140
gatgttgtga agaagaagaa caagggtggt tttgcagtaa aagcacatca ggtgaaaaat 1200
cacatgtgga tttttgtaaa tgccttaatt gaaaacccaa cctttgactc tcagacaaaa 1260
gaaaacatga ctttacaacc caagagcttt ggatcaacat gcccaattgag tgaaaaat 1320
atcaaaagctg ccattggctg tggatttcta gaaagcatac taaactgggt gaagtttaag 1380
gcccaagctc agttaaacaa gaagtgttca gctgtaaaac ataatagaat caagggaa 1440
cccaactcg atgatgccaa tgatgcaggg ggcgaaaact ccaactgagt tacgcttact 1500
ctgactgagg gagattcagc caaaactttg cctgtttcag gccttgggtg ggtgggaga 1560
gacaaatag gggttttccc tcttagagga aaaatactca atgttcgaga agcttctcat 1620
aagcagatca tggaaaatgc tgagattaac aatatcatca agattgtggg tcttcagtac 1680
aagaaaaact atgaagatga agattcattg aagacgcttc gttatgggaa gataatgatt 1740
atgacagatc aggaccaaga tggttcccac atcaaaggct tgctgattaa ttttatccat 1800
cacaactggc cctctcttct gcgacatcgt tttctggagg aatttatcac tcccattgta 1860
aaggatctca asaacaagca agaaaaggca ttttacagcc ttcctgaatt tgaagagtgg 1920
aagagttcta ctccaaatca taaaaaatgg aaagtcaaat attacaagg tttgggcacc 1980
agcacatcaa aggaagctaa agaatacttt gcagatatga aaagacatcg tatccagttc 2040

```

10

aaatattctg gtcctgaaga tgatgctgct atcagcctgg cctttagcaa aaaacagata 2100
 gatgatcgaa aggaatgggt aactaatttc atggaggata gaagacaacg aaagtactt 2160
 gggcttctcg aggattactt gtatggacaa actaccacat atctgacata taatgacttc 2220
 atcaacaagg aacttatctt gttctcaaat tctgataacg agagatctat cccttctatg 2280
 gtggatgggt tgaaccagg tcagagaaag gttttgttta ctgcttcaa acggaatgac 2340
 aagcgaagaag taaaggttgc ccaattagct ggatcagtg ctgaaatgtc ttcttatcat 2400
 catggtgaga tgcactaat gatgaccat atcaatttg ctcagaattt tgtgggtagc 2460
 aataatctaa acctcttgca gccattgggt cagttggta ccaggctaca tggggcaag 2520
 gattctgcta gtccacgata catctttaca atgctcagct ctttggctcg attgttattt 2580
 ccaccaaaag atgatcacac gttgaagttt ttatatgatg acaaccagcg tgttgagcct 2640
 gaatggtaca ttctattat tcccatggtg ctgataaatg gtgctgaagg aatcgggtact 2700
 ggggtgctct gcaaaatccc caactttgat gtgctgaaa ttgtaaaata catcaggcgt 2760
 ttgatggatg gagaagaacc tttgccaatg ctccaagtt acaagaactt caagggtact 2820
 attgaagaac tggctccaaa tcaatagtgt attagtggg aagtagctat tcttaattct 2880
 acaaccattg aaatctcaga gcttcccgtc agaacatgga cccagacata caaagaacaa 2940
 gttctagaac ccatgttgaa tggcaccgag aagacacctc ctctcataac agactatagg 3000
 gaataccata cagataccac tgtgaaattt gttgtgaaga tgaactgaga aaaactggca 3060
 gaggcagaga gagtggact acacaaagtc ttcaaaactcc aaactagtct cacatgcaac 3120
 tctatgggtc tttttgacca cgtaggctgt taaagaaat atgacacggg tttggatatt 3180
 ctaagagact tttttgaact cagacttaaa tattatggat taagaaaaga atggctocta 3240
 ggaatgcttg gtgctgaatc tgctaaactg aataatcagg ctgctttat cttagagaaa 3300
 atagatggca aaataatcat tgaaaataag cctaagaaag aattaattaa agttctgatt 3360
 cagaggggat atgattcgga tcctgtgaag gcctggaaag aagcccagca aaaggtcca 3420
 gatgaagaag aaaaatgaaga gagtgaacac gaaaaggaaa ctgaaaagag tgactcogta 3480
 acagattctg gaccaacctt caactatctt ctgtgatgac ccttttggtt ttaaccaag 3540
 gaaaagaaag atgaactctg caggctaaga aatgaaaaag aacaagagct ggacacatta 3600
 aaaagaaaga gtccatcaga tttgtggaaa gaagacttg ctacattat tgaagaattg 3660
 gaggctgttg aagccaagga aaaacaagat gaacaagtgc gacttctcgg gaaagggggg 3720
 aaggccaagg ggaaaaaaac acaaatggct gaagttttgc cttctccgcy tggtaaaaga 3780
 gtcattccac gaataacat agaaaatgaaa gcagagggcag aaaagaaaaa taaaagaaa 3840
 attaagaatg aaaatactga aggaagocct caagaagatg gtgtggaact agaaggccta 3900
 aaacaaagat tagaaaagaa acagaaaaga gaaccaggta caaagacaaa gaaacaaact 3960
 acattggcat ttagccaat caaaaagga aagaagagaa atccctggtc tgattcagaa 4020
 tcagatagga gcagtgaaga aagtaatttt gatgtccctc cacgagaaac agagccacgg 4080
 agagcagcaa caaaaacaaa attcacaatg gatttggatt cagatgaaga ttctcagat 4140
 tttgatgaaa aaactgatga tgaagatttt gtcccatcag atgctagtcc acctaaagacc 4200
 aaaacttccc caaaacttag taacaaagaa ctgaaaaccac agaaaagtgt cgtgtcagac 4260
 cttgagctg atgatgttaa gggcagtgta ccactgtctt caagccctcc tgetacacat 4320
 ttcccagatg aaactgaaat tacaaaccca gtctctaaaa agaattgtgac agtgaagaag 4380
 acagcagcaa aaagtcagtc ttccacctcc actaccgggt ccaaaaaaag ggtgccccca 4440
 aaaggaaacta aaagggatcc agctttgaat tctgggtgtct ctcaaaagcc tgatcctgcc 4500
 aaaaccaaga atcgccgcaa aaggaaagcca tccacttctg atgattctga ctctaatttt 4560
 gagaaaattg ttccgaaagc agtcacaagc aagaaatcca agggggagag tgatgacttc 4620
 catatggact ttgactcagc tgtggctcct cgggcaaaat ctgtacgggc aaagaacact 4680
 ataaagtacc tggagagtc agatgaagat gatctgtttt aaaatgtgag gcgattattt 4740
 taagtaatta tcttaccag cccaagactg gttttaaagt tacctgaagc tcttaacttc 4800
 ctccccctg aatttagttt ggggaaggty tttttagtac aagacatcaa agtgaagtaa 4860
 agcccagtg ttctttagct ttttataata ctgtctaaat agtgaccatc tcatgggcat 4920
 tgtttcttc tctgctttgt ctgtgttttg agtctgcttt cttttgtctt taaaacctga 4980
 ttttaagtt cttctgaact gtagaatatg ctatctgate acttcagcgt aaagcagttt 5040
 gtttattaac catccactaa gctaaaacta gaggcagttt atttaaaagt gtcactcttc 5100
 ctctttctc actttcagta gatatgagat agagcataat tatctgtttt atcttagttt 5160
 tatacataat ttaccatcag atagaacttt atggttctag tacagatact ctactacact 5220
 cagcctctta tgtgccaagt tttttttaa gcaatgagaa attgctcatg ttcttcatct 5280
 tctcaaatca tcagaggcca aagaaaaaca ctttggctgt gtctataact tgacacagtc 5340
 aatagaatga agaaaattag agtagttatg tgattatttc agctcttgac ctgtcccctc 5400
 tggctgcctc tgagctctgaa tctcccaaag agagaaacca atttctaaga ggactggatt 5460
 cggaagact cggggacaac atttgatcca agatcttaaa tgttatattg ataacctgc 5520
 tcagcaatga gotattagat tcattttggg aaatctccat aatttcaatt tgtaaacttt 5580
 gttaaagacct gtctacattg ttatatgtgt gtgacttgag taatgttatc aacgtttttg 5640
 taaatattta ctatgtttt ctattagcta aattccaaca atttgtact ttaataaa 5698

<210> 24
 <211> 1531
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Val Ser Pro Leu Gln Pro Val Asn Glu Asn Met Gln Val Asn
1 5 10 15
Lys Ile Lys Lys Asn Glu Asp Ala Lys Lys Arg Leu Ser Val Glu Arg
20 25 30
Ile Tyr Gln Lys Lys Thr Gln Leu Glu His Ile Leu Leu Arg Pro Asp
35 40 45
Thr Tyr Ile Gly Ser Val Glu Leu Val Thr Gln Gln Met Trp Val Tyr
50 55 60
Asp Glu Asp Val Gly Ile Asn Tyr Arg Glu Val Thr Phe Val Pro Gly
65 70 75 80
Leu Tyr Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala Ala Asp Asn Lys
85 90 95
Gln Arg Asp Pro Lys Met Ser Cys Ile Arg Val Thr Ile Asp Pro Glu
100 105 110
Asn Asn Leu Ile Ser Ile Trp Asn Asn Gly Lys Gly Ile Pro Val Val
115 120 125
Glu His Lys Val Glu Lys Met Tyr Val Pro Ala Leu Ile Phe Gly Gln
130 135 140
Leu Leu Thr Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Asp Glu Lys Lys Val Thr Gly
145 150 155 160
Gly Arg Asn Gly Tyr Gly Ala Lys Leu Cys Asn Ile Phe Ser Thr Lys
165 170 175
Phe Thr Val Glu Thr Ala Ser Arg Glu Tyr Lys Lys Met Phe Lys Gln
180 185 190
Thr Trp Met Asp Asn Met Gly Arg Ala Gly Glu Met Glu Leu Lys Pro
195 200 205
Phe Asn Gly Glu Asp Tyr Thr Cys Ile Thr Phe Gln Pro Asp Leu Ser
210 215 220
Lys Phe Lys Met Gln Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu Met Val
225 230 235 240
Arg Arg Ala Tyr Asp Ile Ala Gly Ser Thr Lys Asp Val Lys Val Phe
245 250 255
Leu Asn Gly Asn Lys Leu Pro Val Lys Gly Phe Arg Ser Tyr Val Asp
260 265 270
Met Tyr Leu Lys Asp Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu Lys Val
275 280 285
Ile His Glu Gln Val Asn His Arg Trp Glu Val Cys Leu Thr Met Ser
290 295 300
Glu Lys Gly Phe Gln Gln Ile Ser Phe Val Asn Ser Ile Ala Thr Ser
305 310 315 320
Lys Gly Gly Arg His Val Asp Tyr Val Ala Asp Gln Ile Val Thr Lys
325 330 335
Leu Val Asp Val Val Lys Lys Lys Asn Lys Gly Gly Val Ala Val Lys
340 345 350
Ala His Gln Val Lys Asn His Met Trp Ile Phe Val Asn Ala Leu Ile
355 360 365
Glu Asn Pro Thr Phe Asp Ser Gln Thr Lys Glu Asn Met Thr Leu Gln
370 375 380
Pro Lys Ser Phe Gly Ser Thr Cys Gln Leu Ser Glu Lys Phe Ile Lys
385 390 395 400
Ala Ala Ile Gly Cys Gly Ile Val Glu Ser Ile Leu Asn Trp Val Lys
405 410 415
Phe Lys Ala Gln Val Gln Leu Asn Lys Lys Cys Ser Ala Val Lys His
420 425 430
Asn Arg Ile Lys Gly Ile Pro Lys Leu Asp Asp Ala Asn Asp Ala Gly
435 440 445
Gly Arg Asn Ser Thr Glu Cys Thr Leu Ile Leu Thr Glu Gly Asp Ser
450 455 460
Ala Lys Thr Leu Ala Val Ser Gly Leu Gly Val Val Gly Arg Asp Lys
465 470 475 480
Tyr Gly Val Phe Pro Leu Arg Gly Lys Ile Leu Asn Val Arg Glu Ala
485 490 495

Ser His Lys Gln Ile Met Glu Asn Ala Glu Ile Asn Asn Ile Ile Lys
 500 505 510
 Ile Val Gly Leu Gln Tyr Lys Lys Asn Tyr Glu Asp Glu Asp Ser Leu
 515 520 525
 Lys Thr Leu Arg Tyr Gly Lys Ile Met Ile Met Thr Asp Gln Asp Gln
 530 535 540
 Asp Gly Ser His Ile Lys Gly Leu Leu Ile Asn Phe Ile His His Asn
 545 550 555 560
 Trp Pro Ser Leu Leu Arg His Arg Phe Leu Glu Glu Phe Ile Thr Pro
 565 570 575
 Ile Val Lys Val Ser Lys Asn Lys Gln Glu Met Ala Phe Tyr Ser Leu
 580 585 590
 Pro Glu Phe Glu Glu Trp Lys Ser Ser Thr Pro Asn His Lys Lys Trp
 595 600 605
 Lys Val Lys Tyr Tyr Lys Gly Leu Gly Thr Ser Thr Ser Lys Glu Ala
 610 615 620
 Lys Glu Tyr Phe Ala Asp Met Lys Arg His Arg Ile Gln Phe Lys Tyr
 625 630 635 640
 Ser Gly Pro Glu Asp Asp Ala Ala Ile Ser Leu Ala Phe Ser Lys Lys
 645 650 655
 Gln Ile Asp Asp Arg Lys Glu Trp Leu Thr Asn Phe Met Glu Asp Arg
 660 665 670
 Arg Gln Arg Lys Leu Leu Gly Leu Pro Glu Asp Tyr Leu Tyr Gly Gln
 675 680 685
 Thr Thr Thr Tyr Leu Thr Tyr Asn Asp Phe Ile Asn Lys Glu Leu Ile
 690 695 700
 Leu Phe Ser Asn Ser Asp Asn Glu Arg Ser Ile Pro Ser Met Val Asp
 705 710 715 720
 Gly Leu Lys Pro Gly Gln Arg Lys Val Leu Phe Thr Cys Phe Lys Arg
 725 730 735
 Asn Asp Lys Arg Glu Val Lys Val Ala Gln Leu Ala Gly Ser Val Ala
 740 745 750
 Glu Met Ser Ser Tyr His His Gly Glu Met Ser Leu Met Met Thr Ile
 755 760 765
 Ile Asn Leu Ala Gln Asn Phe Val Gly Ser Asn Asn Leu Asn Leu Leu
 770 775 780
 Gln Pro Ile Gly Gln Phe Gly Thr Arg Leu His Gly Gly Lys Asp Ser
 785 790 795 800
 Ala Ser Pro Arg Tyr Ile Phe Thr Met Leu Ser Ser Leu Ala Arg Leu
 805 810 815
 Leu Phe Pro Pro Lys Asp Asp His Thr Leu Lys Phe Leu Tyr Asp Asp
 820 825 830
 Asn Gln Arg Val Glu Pro Glu Trp Tyr Ile Pro Ile Ile Pro Met Val
 835 840 845
 Leu Ile Asn Gly Ala Glu Gly Ile Gly Thr Gly Trp Ser Cys Lys Ile
 850 855 860
 Pro Asn Phe Asp Val Arg Glu Ile Val Asn Asn Ile Arg Arg Leu Met
 865 870 875 880
 Asp Gly Glu Glu Pro Leu Pro Met Leu Pro Ser Tyr Lys Asn Phe Lys
 885 890 895
 Gly Thr Ile Glu Glu Leu Ala Pro Asn Gln Tyr Val Ile Ser Gly Glu
 900 905 910
 Val Ala Ile Leu Asn Ser Thr Thr Ile Glu Ile Ser Glu Leu Pro Val
 915 920 925
 Arg Thr Trp Thr Gln Thr Tyr Lys Glu Gln Val Leu Glu Pro Met Leu
 930 935 940
 Asn Gly Thr Glu Lys Thr Pro Pro Leu Ile Thr Asp Tyr Arg Glu Tyr
 945 950 955 960
 His Thr Asp Thr Thr Val Lys Phe Val Val Lys Met Thr Glu Glu Lys
 965 970 975
 Leu Ala Glu Ala Glu Arg Val Gly Leu His Lys Val Phe Lys Leu Gln
 980 985 990
 Thr Ser Leu Thr Cys Asn Ser Met Val Leu Phe Asp His Val Gly Cys
 995 1000 1005
 Leu Lys Lys Tyr Asp Thr Val Leu Asp Ile Leu Arg Asp Phe Phe Glu
 1010 1015 1020

Leu Arg Leu Lys Tyr Tyr Gly Leu Arg Lys Glu Trp Leu Leu Gly Met
 1025 1030 1035 1040
 Leu Gly Ala Glu Ser Ala Lys Leu Asn Asn Gln Ala Arg Phe Ile Leu
 1045 1050 1055
 Glu Lys Ile Asp Gly Lys Ile Ile Ile Glu Asn Lys Pro Lys Lys Glu
 1060 1065 1070
 Leu Ile Lys Val Leu Ile Gln Arg Gly Tyr Asp Ser Asp Pro Val Lys
 1075 1080 1085
 Ala Trp Lys Glu Ala Gln Gln Lys Val Pro Asp Glu Glu Glu Asn Glu
 1090 1095 1100
 Glu Ser Asp Asn Glu Lys Glu Thr Glu Lys Ser Asp Ser Val Thr Asp
 1105 1110 1115 1120
 Ser Gly Pro Thr Phe Asn Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
 1125 1130 1135
 Thr Lys Glu Lys Lys Asp Glu Leu Cys Arg Leu Arg Asn Glu Lys Glu
 1140 1145 1150
 Gln Glu Leu Asp Thr Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Asp Leu Trp Lys
 1155 1160 1165
 Glu Asp Leu Ala Thr Phe Ile Glu Glu Leu Glu Ala Val Glu Ala Lys
 1170 1175 1180
 Glu Lys Gln Asp Glu Gln Val Gly Leu Pro Gly Lys Gly Gly Lys Ala
 1185 1190 1195 1200
 Lys Gly Lys Lys Thr Gln Met Ala Glu Val Leu Pro Ser Pro Arg Gly
 1205 1210 1215
 Gln Arg Val Ile Pro Arg Ile Thr Ile Glu Met Lys Ala Glu Ala Glu
 1220 1225 1230
 Lys Lys Asn Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Asn Thr Glu Gly Ser Pro
 1235 1240 1245
 Gln Glu Asp Gly Val Glu Leu Glu Gly Leu Lys Gln Arg Leu Glu Lys
 1250 1255 1260
 Lys Gln Lys Arg Glu Pro Gly Thr Lys Thr Lys Lys Gln Thr Thr Leu
 1265 1270 1275 1280
 Ala Phe Lys Pro Ile Lys Lys Gly Lys Lys Arg Asn Pro Trp Ser Asp
 1285 1290 1295
 Ser Glu Ser Asp Arg Ser Ser Asp Glu Ser Asn Phe Asp Val Pro Pro
 1300 1305 1310
 Arg Glu Thr Glu Pro Arg Arg Ala Ala Thr Lys Thr Lys Phe Thr Met
 1315 1320 1325
 Asp Leu Asp Ser Asp Glu Asp Phe Ser Asp Phe Asp Glu Lys Thr Asp
 1330 1335 1340
 Asp Glu Asp Phe Val Pro Ser Asp Ala Ser Pro Pro Lys Thr Lys Thr
 1345 1350 1355 1360
 Ser Pro Lys Leu Ser Asn Lys Glu Leu Lys Pro Gln Lys Ser Val Val
 1365 1370 1375
 Ser Asp Leu Glu Ala Asp Asp Val Lys Gly Ser Val Pro Leu Ser Ser
 1380 1385 1390
 Ser Pro Pro Ala Thr His Phe Pro Asp Glu Thr Glu Ile Thr Asn Pro
 1395 1400 1405
 Val Pro Lys Lys Asn Val Thr Val Lys Lys Thr Ala Ala Lys Ser Gln
 1410 1415 1420
 Ser Ser Thr Ser Thr Thr Gly Ala Lys Lys Arg Ala Ala Pro Lys Gly
 1425 1430 1435 1440
 Thr Lys Arg Asp Pro Ala Leu Asn Ser Gly Val Ser Gln Lys Pro Asp
 1445 1450 1455
 Pro Ala Lys Thr Lys Asn Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ser Thr Ser Asp
 1460 1465 1470
 Asp Ser Asp Ser Asn Phe Glu Lys Ile Val Ser Lys Ala Val Thr Ser
 1475 1480 1485
 Lys Lys Ser Lys Gly Glu Ser Asp Asp Phe His Met Asp Phe Asp Ser
 1490 1495 1500
 Ala Val Ala Pro Arg Ala Lys Ser Val Arg Ala Lys Lys Pro Ile Lys
 1505 1510 1515 1520
 Tyr Leu Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Leu Phe
 1525 1530

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 25
 ctctgagccc gccaaagc 17
 10 <210> 26
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 26
 20 tgtaagaact tottaacctt ttcttctct a 31
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 27
 ccctcggcag cgatggcact 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 28
 gaggaatccc gagctgtgaa 20
 <210> 29
 <211> 14
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 29
 cccgctcccg ccat 14
 <210> 30
 <211> 32
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 30
 cccatgtgct tctttgttta ctaagagcgg aa 32
 65 <210> 31

ES 2 381 644 T3

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 gtccgaagcc cccagaa 17
 10 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 32
 20 cccgacagag accactcaca 20
 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 33
 cagtaccctg ctgaactcat gcgca 25
 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 34
 cgctacgcga agctctttg 19
 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 35
 cctttgtttg ccattgttct ctaa 24
 <210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 36
 tgccgtacaa gagctgctgc ctca 24
 65 <210> 37

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 37
 caaacgccgg ctgatctt 18
 10 <210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 38
 20 ccaggactgc aggcttct 19
 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 39
 caagaggaag ccctaaccg ccca 24
 <210> 40
 <211> 16
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 40
 gagcggcggc agacaa 16
 45 <210> 41
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 41
 ccggaacac gcatcct 17
 55 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 42
 65 ccagagccg agccaagcgt g 21
 <210> 43

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 43
 10 tggagactct cagggtcgaa a 21
 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 44
 20 tccagtctgg ccaacagagt t 21
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 45
 cggcggcaga ccagcatgac 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 46
 gccctcgtgc tgatgtact 20
 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 47
 tcatcatgac ctggtcttct agga 24
 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 48
 agcgtctagg gcagcagccg c 21
 65 <210> 49

<211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 49
 tgcccaacgc accga 15
 10 <210> 50
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 50
 20 gggcgctgcc catca 15
 <210> 51
 <217> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 51
 tcggaggccg atccaggtca tg 22
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 52
 aagcttcctt tccgtcatgc 20
 <210> 53
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 53
 catgacctgc cagagagaac ag 22
 <210> 54
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 54
 60 cccccacctt ggctctgacc a 21
 65 <210> 55

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 ggaaaccaag gaagaggaat gag 23
 10 <210> 56
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 56
 20 tgtccccc ttcagatctt ct 22
 <210> 57
 <211> 26
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 57
 acgcgcgtac agatctctcg aatgct 26
 <210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 58
 cacgccctaa ggcacat 18
 <210> 59
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 59
 cctagttcac aaaatgcttg tcatg 25
 <210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador
 <400> 60
 60 tttcttgca gcctcgcagc ctc 23
 <210> 61

ES 2 381 644 T3

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 61
 aaagaagatg atgaccgggt ttac 24
 10 <210> 62
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 62
 20 gagcctctgg atggtgcaa 19
 <210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 63
 caaactcaac gtgcaagcct cgga 24
 <210> 64
 <211> 14
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 64
 tccgccgagg acaa 14
 <210> 65
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 65
 catggtgtcc cgctcctt 18
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 66
 accctggcct caggccggag 20
 65 <210> 67

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Cebador

<400> 67
 ggaattgtg gccacctgta tt 22

10

<210> 68
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador

<400> 68
 ctggagaaat cactgttcc tattct 27

20

<210> 69
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador

30

<400> 69
 cagtccttgc attatcattg aaacacctca ca 32

35

<210> 70
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Cebador

<400> 70
 tcaactcatt ggaattacct cattattc 28

45

<210> 71
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Cebador

<400> 71
 accatcagtg acgtaagcaa actc 24

55

<210> 72
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Cebador

<400> 72
 ccaaactga ggaaatctat gctcctaaac tcca 34

65

<210> 73

ES 2 381 644 T3

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 73
 ttttgaagtt ctgcattctg acttg 25

10 <210> 74
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 74
 accatcagtg acgtaagcaa gataa 25

<210> 75
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

30 <400> 75
 aaccacagat gaggtcata cttctagact gget 34

<210> 76
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(156)
 <223> Secuencia parcial de aminoácidos para la isoforma 1 p16/p14ARF

40 <400> 76

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

45 <210> 77

ES 2 381 644 T3

<211> 105
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(105)
 <223> Secuencia parcial de aminoácidos para la isoforma 2 p16/p14ARF

10 <400> 77

```

Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly
 1          5          10          15
Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His
 20          25          30
Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg
 35          40          45
Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val
 50          55          60
Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu Arg
 65          70          75          80
Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile Asp Ala
 85          90          95
Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
 100          105
    
```

<210> 78
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1)...(116)
 <223> Secuencia parcial de aminoácidos para la isoforma 3 p16/p14ARF

20 <400> 78

```

Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
 1          5          10          15
Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
 20          25          30
Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
 35          40          45
Ile Gln Val Gly Arg Arg Ser Ala Ala Gly Ala Gly Asp Gly Gly Arg
 50          55          60
Leu Trp Arg Thr Lys Phe Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Ser Ala Ser
 65          70          75          80
Ile Leu Arg Lys Lys Gly Arg Leu Pro Gly Glu Phe Ser Glu Gly Val
 85          90          95
Cys Asn His Arg Pro Pro Pro Gly Asp Ala Leu Gly Ala Trp Glu Thr
 100          105          110
Lys Glu Glu Glu
 115
    
```

<210> 79
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 79

ES 2 381 644 T3

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

5 <210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 80
 ggaggtggta ctggccatgt a 21

15 <210> 81
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 81
 gggagatgcg gacatggat 19

25 <210> 82
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 82
 ccaagtacga ccgcatcacc aacca 25

35 <210> 83
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 83
 cattccaaga cctgcctacc a 21

45

<210> 84
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR

 10 <400> 84
 atgcgagtga gcaaaccaat t 21

 <210> 85
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR
 20
 <400> 85
 acacaagatt cgagagctca cctcatcca 29

 <210> 86
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR
 30
 <400> 86
 ggctacatgg tggcaagga 19

 <210> 87
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador PCR
 40
 <400> 87
 45 tggaaataac aatcgagcca aag 23

 <210> 88
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador PCR

 <400> 88
 55 tgctagtcca cgatacatct ttacaatgct cagc 34

 <210> 89
 <211> 3769
 <212> ADN
 60 <213> Homo sapiens

 <400> 89

ES 2 381 644 T3

aaagctgcag	cgtctggaaa	aaagcgactt	gtggcggctg	agcgtggcgc	aggcgaatcc	60
tcggcactaa	gcaaatatgg	acctcgcggc	ggcagcggag	ccgggcggcg	gcagccagca	120
cctggaggtc	cgcaacgagg	tgcccgagaa	gtgccagaaa	ctgttctcgg	acttcttggg	180
ggagtttcag	agcagcagtg	gagaaattaa	atacttgcaa	ttagcagagg	aactgattcg	240
tctcgagaga	aacacattgg	ttgtgagttt	tgtggacctg	gaacaattta	accagcaact	300
ttccaccacc	attcaagagg	agttctatag	agtttacctt	tacctgtgtc	gggccttgaa	360
aacattcgtc	aaagaccgta	aagagatccc	tcttgccaag	gatttttatg	ttgcattcca	420
agcactgcct	accagacaca	agattcgaga	gctcacctca	tccagaattg	gtttgcctac	480
tcggcatcag	gggcagggtg	tgccgactca	cccagttcac	ccagagcttg	tgagcggaac	540
ttttctgtgc	ttggactgtc	agacagtgat	cagggatgta	gaacagcagt	tcaaatcac	600
acagccaaac	atctgccgaa	atccagtttg	tgccaacagg	aggagattct	tactggatac	660
aaataaatca	agatttggtg	attttcaaaa	ggttcgtatt	caagagaccc	aagctgagct	720
tctcagaggg	agtatcccc	gcagtttaga	agtaatttta	agggtggaag	ctgtggaatc	780
agctcaagct	ggtgacaagt	gtgactttac	agggacactg	attgtttgtc	ctgacgtctc	840
caagcttagc	acaccaggag	cacgtgcaga	aactaattcc	cgtgtcagtg	gtgttgatgg	900
atatgagaca	gaaggcattc	gaggactccg	ggcccttggg	gttagggacc	tttcttatag	960
gctggctctt	cttgccctgct	gtgttgccgc	aaccaaccca	aggtttgggg	ggaaagagct	1020
cagagatgag	gaacagacag	ctgagagcat	taagaaccaa	atgactgtga	aagaatggga	1080
gaaagtgttt	gagatgagtc	aagataaaaa	tctataccac	aatctttgta	ccagcctggt	1140
ccctactata	catggcaatg	atgaagtaaa	acgggggtgc	ctgctgatgc	tctttgggtg	1200
cgttccaaag	acaacaggag	aagggacctc	tcttcgaggg	gacataaatg	tttgcattgt	1260
tggtgaccga	agtacagcta	agagccaatt	tctcaagcac	gtggaggagt	tcagccccag	1320
agctgtctac	accagtggta	aagcgtccag	tgctgtctgc	ttaacagcag	ctgttgtgag	1380
agatgaagaa	tctcatgagt	ttgtcattga	ggctggagct	ttgatgttgg	ctgataatgg	1440
tgtgtgttgt	attgatgaat	ttgataagat	ggacgtgcgg	gatcaagtgg	ctatcatgga	1500
agctatggaa	cagcagacca	tatccatcac	taaagcagga	gtgaaggcta	ctctgaacgc	1560
ccggacgtcc	atthggcag	cagcaaaccc	aatcagtgga	cactatgaca	gatcaaaatc	1620
attgaaacag	aatataaatt	tgtcagctcc	catcatgtcc	cgattcgatc	tcttctttat	1680
ccttgtggat	gaatgtaatg	aggttacaga	ttatgccatt	gccaggcgca	tagtagattt	1740
gcattcaaga	attgaggaat	caattgatcg	tgtctattcc	ctcgatgata	tcagaagata	1800
tcttctcttt	gcaagacagt	ttaaacccaa	gatttccaaa	gagtcagagg	acttcatgtt	1860
ggagcaatat	aaacatctcc	gccagagaga	tggttctgga	gtgaccaagt	cttcatggag	1920
gatctacagt	cgacagcttg	agagcatgat	tcgtctctct	gaagctatgg	ctcggatgca	1980
ctgtctgtgat	gaggtccaac	ctaaacatgt	gaaggaaagct	ttccggttac	tgaataaatc	2040
aatcatccgt	gtggaaacac	ctgatgtcaa	tctagatcaa	gaggaagaga	tccagatgga	2100
ggtagatgag	ggtgctggtg	gcataaatgg	tcattgctgac	agccctgctc	ctgtgaaacg	2160
gatcaatggc	tacaatgaag	acataaatca	agagtctgct	cccaaagcct	ccttaaggct	2220
gggcttctct	gagtactgcc	gaatctctaa	ccttatgtgt	cttcaacctc	gaaaggtgga	2280
agaagaagag	gacgagtcag	cattaaagag	gagcgagctt	gtaactgggt	acttgaagga	2340
aatcgaaatca	gagatagact	ctgaagaaga	acttataaat	aaaaaaagaa	tcatagagaa	2400
agttattcat	cgactcacac	actatgatca	tgttctaatt	gagctcacc	aggctggatt	2460
gaaaggctcc	acagagggaa	gtgagagcta	tgaagaagat	ccttacttgg	tagttaaccc	2520
taactacttg	ctcgagagat	gagatagtga	aagtaactga	ccagagctga	ggaaactgtg	2580
caagcaccct	cgtggcctgg	agcctggctg	gagctctgct	agggacagaa	gtgtttctgg	2640
aagtgatgct	tccaggattt	gttttcagaa	acaagaattg	agttgatggg	cctatgtgtc	2700
acattcatca	caggtttcat	accaacacag	gcttcagcac	ttccttgggt	gtgtttctcg	2760
tcccagtgaa	gttggaacca	aataatgtgt	agtctctata	accaatacct	ttgttttcat	2820
gtgtaagaaa	aggcccatba	cttttaaggt	atgtgctgtc	ctattgagca	aataactttt	2880
tttcaattgc	cagctactgc	ttttattcat	caaaaataaaa	taacttggtc	tgaagtgtgc	2940
tattggattt	ctttctactg	taccctgatt	attacttcca	tctacttctg	aatgtgagac	3000
tttccctttt	tgcttaacct	ggagtgaaga	ggtagaactg	tggtattatg	gatgaggttt	3060
ctatgagaag	gagtcattag	agaactcata	tgaaagctag	aggcctttag	gatgactttc	3120
caaggttaat	tccagttggt	tttttttttt	tttaagttta	taaaagttta	ttatactttt	3180
ttaaaattac	tctttagtaa	tttattttac	ttctgtgtcc	taagggtaat	ttctcaggat	3240
tgttttcaaa	ttgctttttt	aggggaaata	ggtcatttgc	tatattacaa	gcaatcccca	3300
aattttatgg	tcttccagga	aaagttatta	ccgtttatga	tactaacagt	tcttgagact	3360
tagctatgat	cagtatgttc	atgaggtgga	gcagttcctg	tggtgcagct	tttaacaaca	3420
gatggcatct	attaaatcac	aaagtatggt	aaaggtcaca	aaagcaaaat	acttctctga	3480
ggctaaggcc	cacgtgggac	agtctaatac	ccatgagtac	tcaacttgcc	ttgatgtctg	3540
agctttccag	tgcaatgtga	atthgagcag	ccagaaatct	attagtagaa	agcaagacag	3600
attaatatag	gttaaaacaa	tgatttaaat	atgtttctcc	caataattat	ctcttccctt	3660
ggaatcaact	tgtatgaaac	cttgtcaaaa	tgtactccac	aagtatgtac	aattaagtat	3720
tttaaaaaata	aatggcaaac	attaaaaaca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa		3769

<210> 90
<211> 821
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 90

Met	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Ala	Gly	Ser	Gln	His	Leu
1			5						10				15		
Glu	Val	Arg	Asp	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Cys	Gln	Lys	Leu	Phe	Leu	Asp
		20						25				30			
Phe	Leu	Glu	Glu	Phe	Gln	Ser	Ser	Asp	Gly	Glu	Ile	Lys	Tyr	Leu	Gln
		35					40					45			
Leu	Ala	Glu	Glu	Leu	Ile	Arg	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Leu	Val	Val	Ser
		50				55					60				
Phe	Val	Asp	Leu	Glu	Gln	Phe	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Thr	Thr	Ile	Gln
65					70					75					80
Glu	Glu	Phe	Tyr	Arg	Val	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Cys	Arg	Ala	Leu	Lys	Thr
				85						90					95
Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Lys	Glu	Ile	Pro	Leu	Ala	Lys	Asp	Phe	Tyr	Val
			100					105					110		
Ala	Phe	Gln	Asp	Leu	Pro	Thr	Arg	His	Lys	Ile	Arg	Glu	Leu	Thr	Ser
		115					120					125			
Ser	Arg	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Arg	Ile	Ser	Gly	Gln	Val	Val	Arg	Thr
		130					135					140			
His	Pro	Val	His	Pro	Glu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Phe	Leu	Cys	Leu	Asp
145					150						155				160
Cys	Gln	Thr	Val	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	Gln	Gln	Phe	Lys	Tyr	Thr	Gln
				165						170					175
Pro	Asn	Ile	Cys	Arg	Asn	Pro	Val	Cys	Ala	Asn	Arg	Arg	Arg	Phe	Leu
			180					185						190	
Leu	Asp	Thr	Asn	Lys	Ser	Arg	Phe	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Val	Arg	Ile
		195					200						205		
Gln	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ser	Ile	Pro	Arg	Ser	Leu
		210				215						220			
Glu	Val	Ile	Leu	Arg	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Gly	Asp
225					230						235				240
Lys	Cys	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Leu	Ile	Val	Val	Pro	Asp	Val	Ser	Lys
				245						250					255
Leu	Ser	Thr	Pro	Gly	Ala	Arg	Ala	Glu	Thr	Asn	Ser	Arg	Val	Ser	Gly
			260					265					270		
Val	Asp	Gly	Tyr	Glu	Thr	Glu	Gly	Ile	Arg	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly
		275						280					285		
Val	Arg	Asp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Leu	Val	Phe	Leu	Ala	Cys	Cys	Val	Ala
		290				295					300				
Pro	Thr	Asn	Pro	Arg	Phe	Gly	Gly	Lys	Glu	Leu	Arg	Asp	Glu	Glu	Gln
305					310						315				320
Thr	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Asn	Gln	Met	Thr	Val	Lys	Glu	Trp	Glu	Lys
				325							330				335
Val	Phe	Glu	Met	Ser	Gln	Asp	Lys	Asn	Leu	Tyr	His	Asn	Leu	Cys	Thr
			340					345					350		
Ser	Leu	Phe	Pro	Thr	Ile	His	Gly	Asn	Asp	Glu	Val	Lys	Arg	Gly	Val
		355					360						365		
Leu	Leu	Met	Leu	Phe	Gly	Gly	Val	Pro	Lys	Thr	Thr	Gly	Glu	Gly	Thr
		370				375						380			
Ser	Leu	Arg	Gly	Asp	Ile	Asn	Val	Cys	Ile	Val	Gly	Asp	Pro	Ser	Thr
385					390					395					400
Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	His	Val	Glu	Glu	Phe	Ser	Pro	Arg	Ala
				405						410					415
Val	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala
			420					425					430		
Val	Val	Arg	Asp	Glu	Glu	Ser	His	Glu	Phe	Val	Ile	Glu	Ala	Gly	Ala
		435					440						445		
Leu	Met	Leu	Ala	Asp	Asn	Gly	Val	Cys	Cys	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys
		450				455						460			
Met	Asp	Val	Arg	Asp	Gln	Val	Ala	Ile	His	Glu	Ala	Met	Glu	Gln	Gln
465					470					475					480
Thr	Ile	Ser	Ile	Thr	Lys	Ala	Gly	Val	Lys	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala	Arg
				485						490					495
Thr	Ser	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	His	Tyr	Asp	Arg
			500					505						510	

Ser Lys Ser Leu Lys Gln Asn Ile Asn Leu Ser Ala Pro Ile Met Ser
 515 520 525
 Arg Phe Asp Leu Phe Phe Ile Leu Val Asp Glu Cys Asn Glu Val Thr
 530 535 540
 Asp Tyr Ala Ile Ala Arg Arg Ile Val Asp Leu His Ser Arg Ile Glu
 545 550 555 560
 Glu Ser Ile Asp Arg Val Tyr Ser Leu Asp Asp Ile Arg Arg Tyr Leu
 565 570 575
 Leu Phe Ala Arg Gln Phe Lys Pro Lys Ile Ser Lys Glu Ser Glu Asp
 580 585 590
 Phe Ile Val Glu Gln Tyr Lys His Leu Arg Gln Arg Asp Gly Ser Gly
 595 600 605
 Val Thr Lys Ser Ser Trp Arg Ile Thr Val Arg Gln Leu Glu Ser Met
 610 615 620
 Ile Arg Leu Ser Glu Ala Met Ala Arg Met His Cys Cys Asp Glu Val
 625 630 635 640
 Gln Pro Lys His Val Lys Glu Ala Phe Arg Leu Leu Asn Lys Ser Ile
 645 650 655
 Ile Arg Val Glu Thr Pro Asp Val Asn Leu Asp Gln Glu Glu Glu Ile
 660 665 670
 Gln Met Glu Val Asp Glu Gly Ala Gly Gly Ile Asn Gly His Ala Asp
 675 680 685
 Ser Pro Ala Pro Val Asn Gly Ile Asn Gly Tyr Asn Glu Asp Ile Asn
 690 695 700
 Gln Glu Ser Ala Pro Lys Ala Ser Leu Arg Leu Gly Phe Ser Glu Tyr
 705 710 715 720
 Cys Arg Ile Ser Asn Leu Ile Val Leu His Leu Arg Lys Val Glu Glu
 725 730 735
 Glu Glu Asp Glu Ser Ala Leu Lys Arg Ser Glu Leu Val Asn Trp Tyr
 740 745 750
 Leu Lys Glu Ile Glu Ser Glu Ile Asp Ser Glu Glu Glu Leu Ile Asn
 755 760 765
 Lys Lys Arg Ile Ile Glu Lys Val Ile His Arg Leu Thr His Tyr Asp
 770 775 780
 His Val Leu Ile Glu Leu Thr Gln Ala Gly Leu Lys Gly Ser Thr Glu
 785 790 795 800
 Gly Ser Glu Ser Tyr Glu Glu Asp Pro Tyr Leu Val Val Asn Pro Asn
 805 810 815
 Tyr Leu Leu Glu Asp
 820

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado en una paciente, comprendiendo dicho método:
- 5 a) poner en contacto una muestra corporal de dicha paciente al menos con tres anticuerpos, en el que un primer y segundo anticuerpo se unen específicamente a la proteína 2 de mantenimiento de minicromosomas MCM2 y un tercer anticuerpo que se une específicamente a la topoisomerasa II alfa, Topo2A; y,
- 10 b) detectar la unión de los anticuerpos a MCM2 y a Topo2A.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los al menos tres anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende realizar inmunocitoquímica.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, 2 ó 3 en el que el método se realiza manualmente; o en el que el método se realiza de manera automatizada.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende células de cuello uterino; preferentemente una monocapa de células de cuello uterino.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende células de cuello uterino en suspensión en una preparación basada en líquido o una muestra tisular de cuello uterino.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la sensibilidad de dicho método, para diagnosticar una enfermedad de cuello uterino de alto grado, es de al menos el 90%; o en el que la especificidad de dicho método, para diagnosticar una enfermedad de cuello uterino de alto grado, es de al menos el 85%.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende efectuar tinción de Papanicolaou (Pap) de la muestra.
- 30 9. El método de la reivindicación 1, en el que dichos al menos tres anticuerpos se ponen en contacto con dicha muestra secuencialmente, como reactivos de anticuerpos individuales; o en el que dichos anticuerpos se ponen en contacto con dicha muestra simultáneamente, como un cóctel de anticuerpos.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en el que el método se realiza en respuesta a una paciente que tiene un resultado anómalo en un ensayo de frotis Pap, o en el que el método se realiza como una exploración primaria para detectar una enfermedad de cuello uterino de alto grado en una población general de pacientes.
- 40 11. Un kit que comprende al menos tres anticuerpos, en el que un primer y un segundo anticuerpo, incluidos en el kit, se unen específicamente a MCM2 y en el que un tercer anticuerpo se une específicamente a Topo2A.
12. El kit de la reivindicación 11, en el que los al menos tres anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
- 45 13. El kit de la reivindicación 11, en el que dicho kit comprende adicionalmente un reactivo bloqueador de peroxidasa, un reactivo bloqueador de proteína, productos químicos para la detección de la unión de anticuerpos a dichas proteínas biomarcadoras, un colorante de contraste, un agente colorante azul e instrucciones para su uso.
- 50 14. El kit de la reivindicación 13, en el que para la detección de la unión de anticuerpos, dichos productos químicos comprenden un cromógeno y un anticuerpo secundario conjugado con un polímero marcado, en el que el cromógeno comprende 3',3'-diaminobencidina y en el que el polímero marcado comprende peroxidasa de rábano picante conjugada con un polímero de dextrano; dicho colorante de contraste comprende hematoxilina; o en el que dicho agente colorante azul comprende una solución que comprende solución salina tamponada con Tris, pH 7,4, Tween-20 y azida sódica.
- 55 15. El kit de la reivindicación 11 ó 13 que comprende adicionalmente una muestra de control positivo; en la que preferentemente dicha muestra de control positivo comprende células SiHa.
- 60 16. El kit de la reivindicación 11 ó 13 que adicionalmente comprende reactivos para tinción Pap; en el que preferentemente los reactivos para tinción Pap comprenden EA50 y Orange G.
17. El kit de la reivindicación 11 ó 13, en el que dichos al menos tres anticuerpos se proporcionan como reactivos individuales; o en el que dichos al menos tres anticuerpos se proporcionan como un cóctel.
- 65 18. Un método para usar el kit de la reivindicación 11 ó 13 para diagnosticar enfermedades de cuello uterino de alto grado en una muestra procedente de una paciente, que comprende poner en contacto dicha muestra con dichos al menos tres anticuerpos.

FIG. 1: Proliferación y desregulación del ciclo celular en displasia de cuello uterino

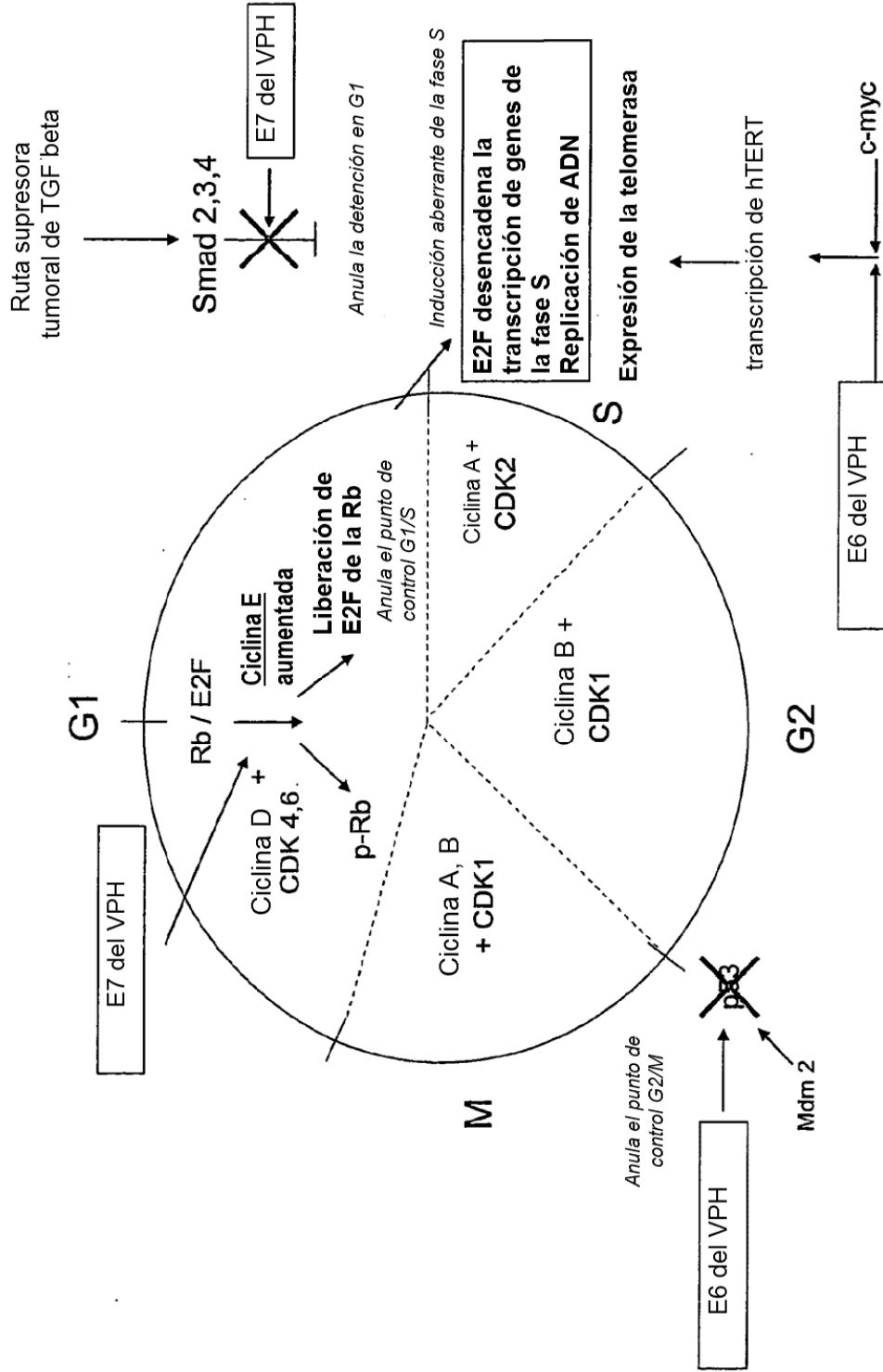


FIG. 2: Inducción aberrante de la fase S en neoplasia de cuello uterino

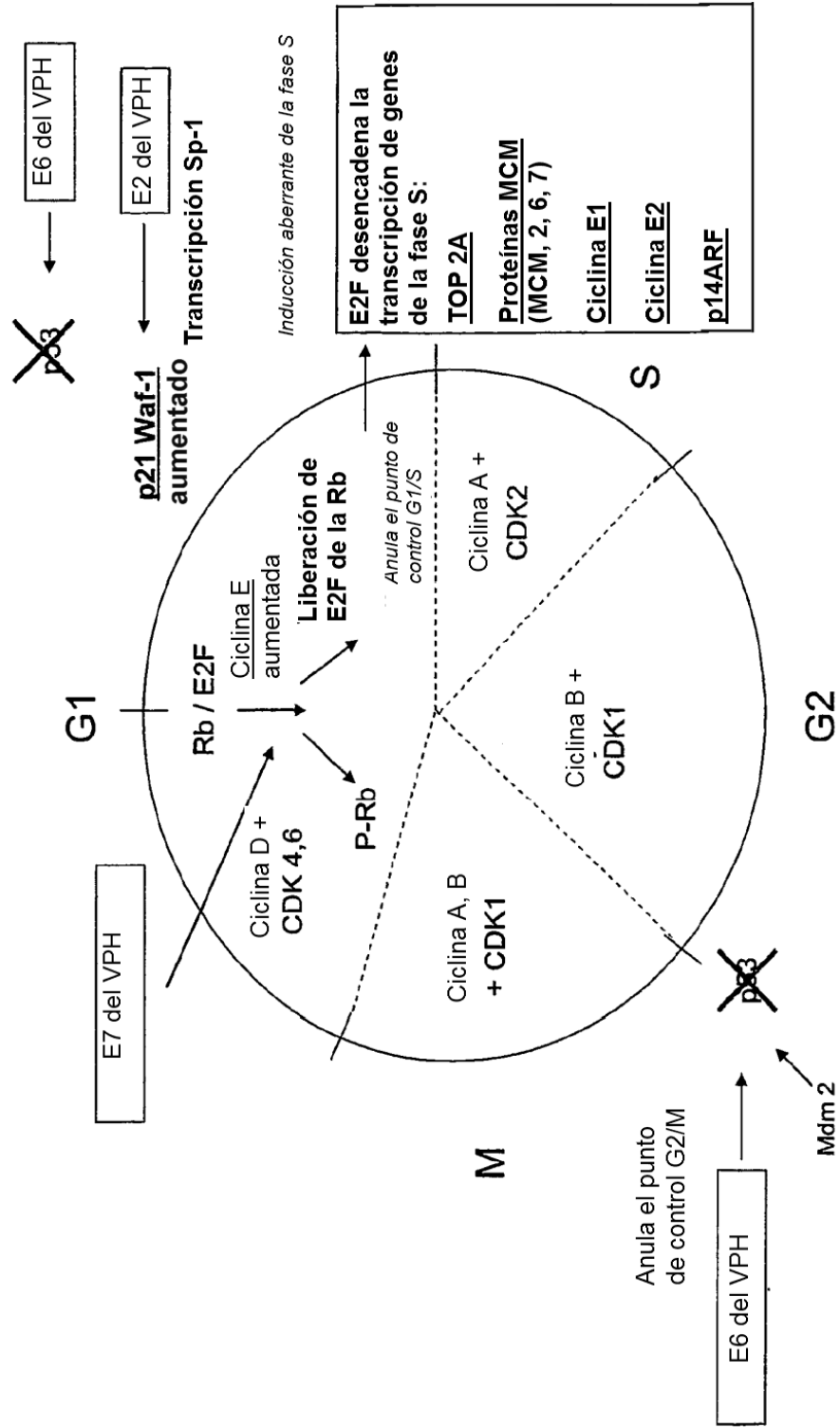


FIG. 3: Inducción aberrante de la fase S en neoplasia de cuello uterino

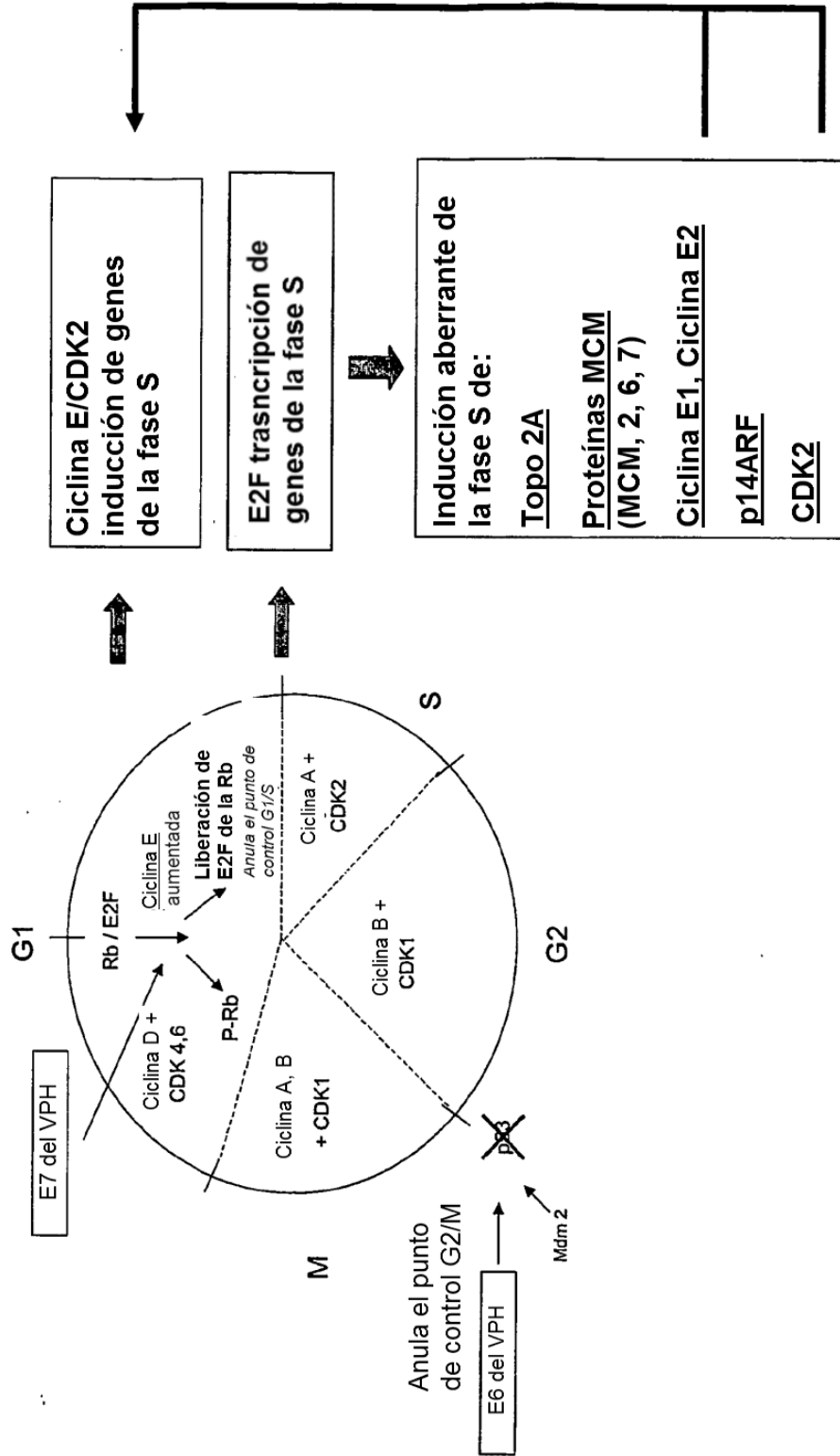


FIG. 4: Inducción aberrante de la fase S en neoplasia de cuello uterino

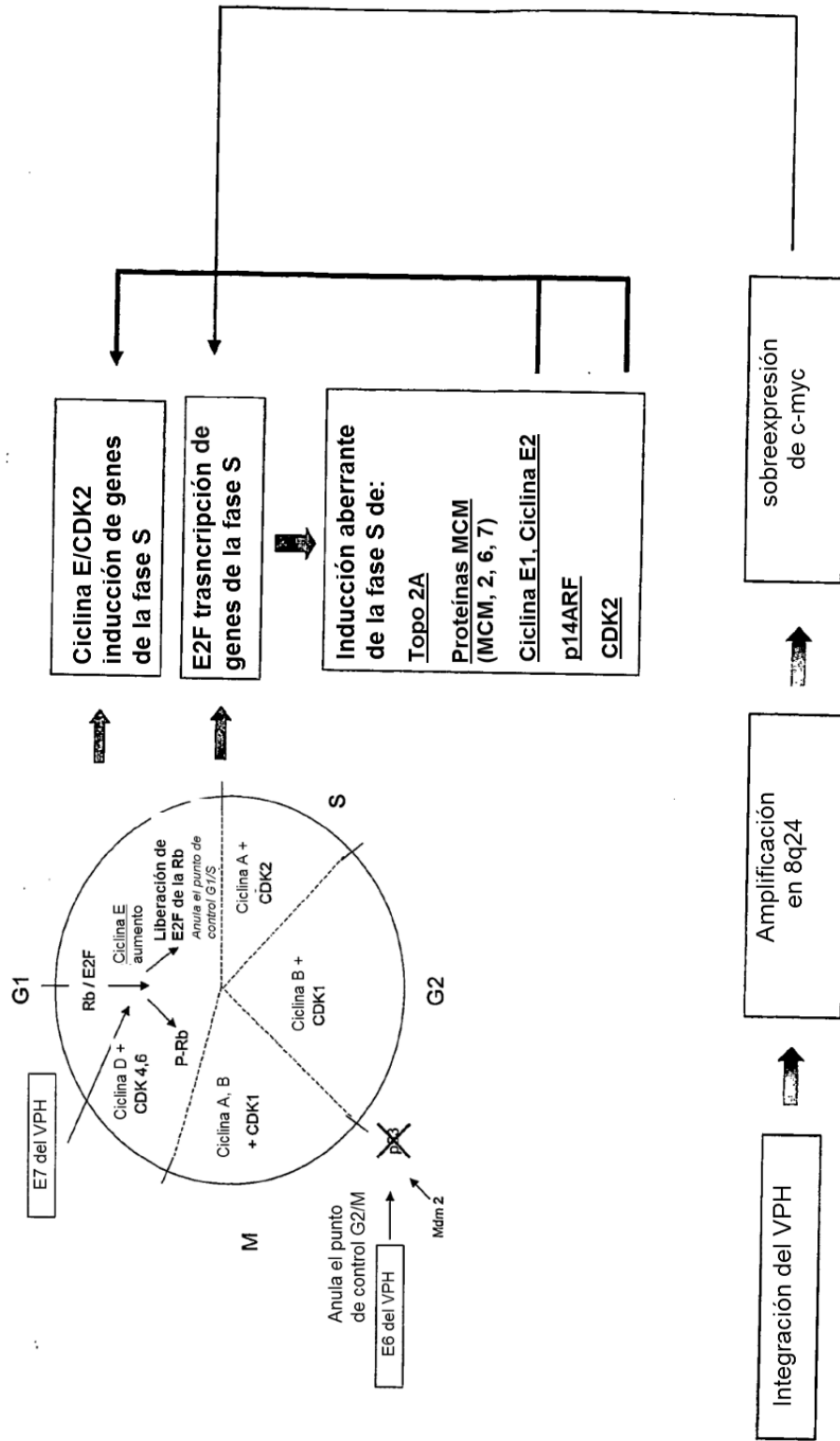


FIG. 5: Variantes de transcripción de MCM7: cebadores TaqMan

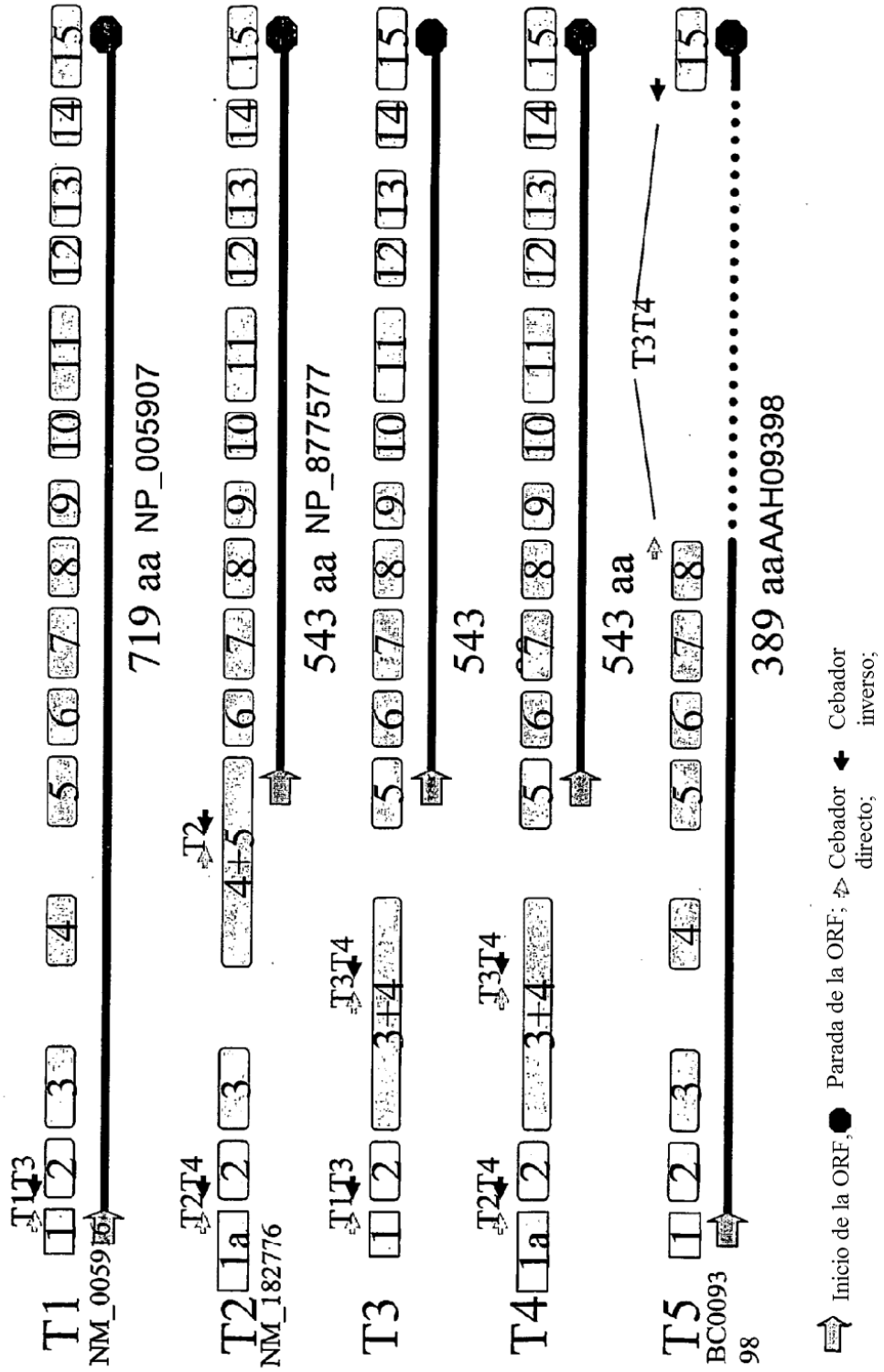
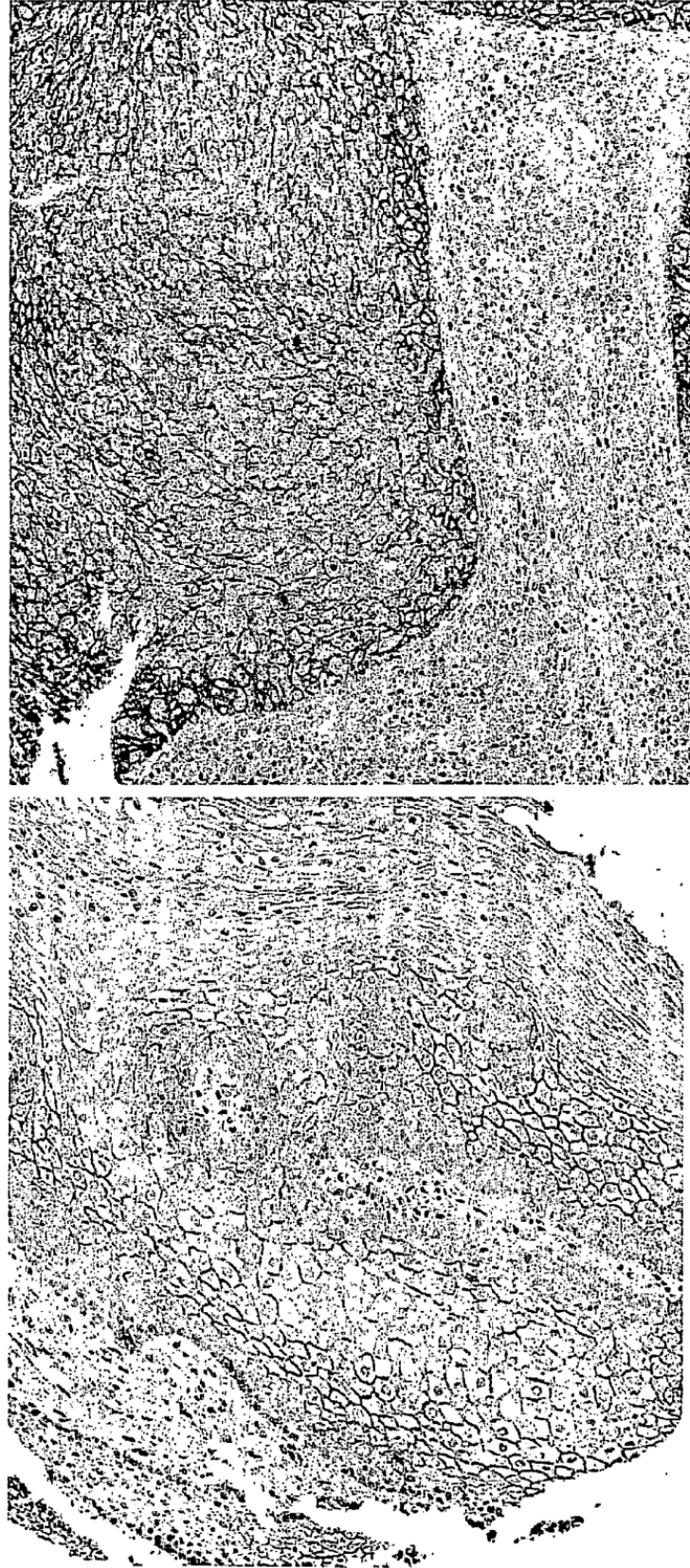


FIG. 6: Expresión de claudina I en muestras tisulares de cuello uterino (IHC)



Displasia leve

Carcinoma de células escamosas

FIG. 7: Expresión de claudina I en muestras tisulares (IHC) y citológicas (ICC)

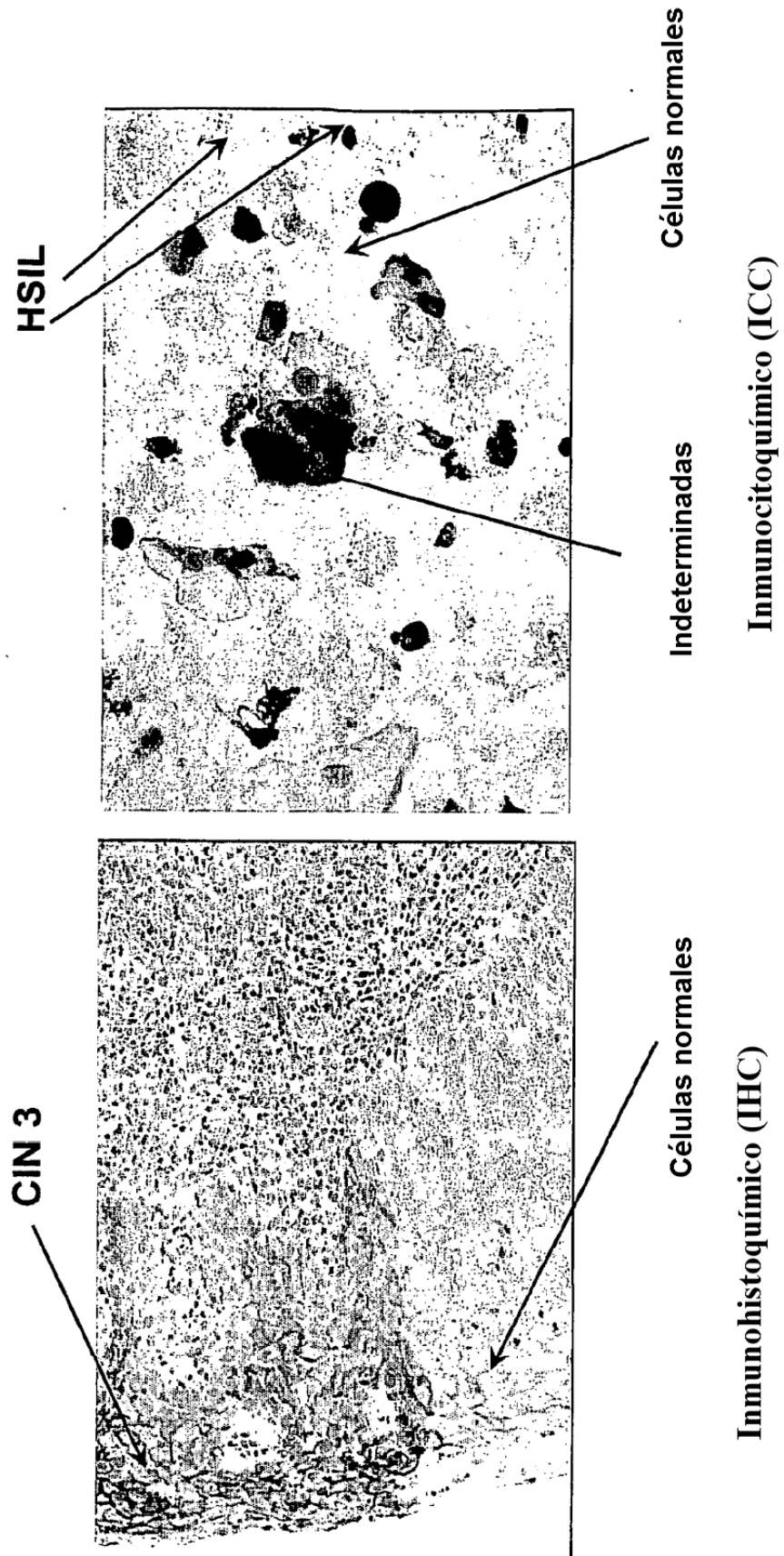


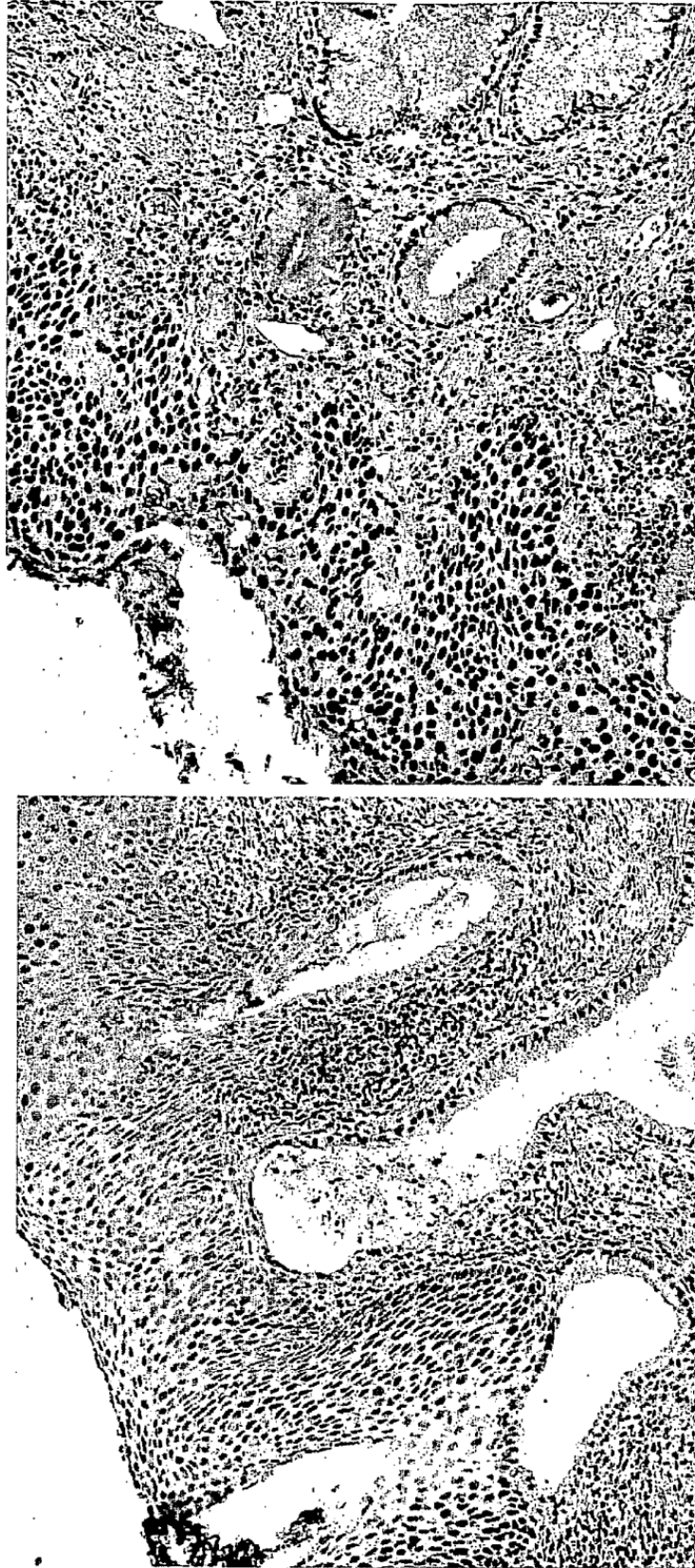
FIG. 8: Ensayo ICC de una muestra con enfermedad de cuello uterino de alto grado



MCM2 (marcador nuclear)

P16 (marcador citoplásmico)

FIG. 9: Patrones de tinción diferencial en muestras tisulares de cuello uterino (IHC) usando diferentes anticuerpos contra MCM6



Tinción subóptima del Mab
Anticuerpo procedente de Transducción Labs

Tinción óptima del Mab
Anticuerpo fabricado internamente