

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 113**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 06829534 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1960544**

54 Título: **Marcadores moleculares para el diagnóstico y el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

12.12.2005 DE 102005059242

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

11.06.2013

73 Titular/es:

**STEINER, ERIC (33.3%)
Walter-Gieseckingstr. 21
65193 Wiesbaden , DE;
HENGSTLER, JAN (33.3%) y
SAGEMÜLLER, JENS (33.3%)**

72 Inventor/es:

**STEINER, ERIC;
HENGSTLER, JAN y
SAGEMÜLLER, JENS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 407 113 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

Marcadores moleculares para el diagnóstico y el tratamiento de tumores.

5 Los cánceres están todavía entre las causas principales de muerte a pesar de los enfoques interdisciplinarios y la utilización exhaustiva de modalidades de terapia clásicas.

10 La metástasis es uno de los factores más críticos responsables del fracaso de una terapia contra el cáncer. Aunque la ilustración de la expresión de proteínas, el análisis de alineamientos génicos y la determinación de factores críticos en tejido tumoral han mejorado la clasificación de pronóstico de los tumores, todavía es difícil predecir el riesgo de presentar metástasis por medio del estudio del tumor primario resecado (Jacquemier J *et al.*, Cancer Res. 65:767-779, 2005; Garber K, Science 303:1754-5, 2004; Hengstler JG *et al.*, Cancer Res. 59, 3206-3214, 1999; Hengstler JG *et al.*, Int. J. Cancer 84, 388-395, 1999; Hengstler JG *et al.*, Int. J. Cancer, 95, 121-127, 2001).

15 Un ejemplo típico es el cáncer del endometrio, el tumor maligno más común del aparato genital femenino. Tras la resección total del tumor, la supervivencia depende habitualmente de la aparición de metástasis. Sitios de recidiva de cáncer del endometrio son los ganglios linfáticos paraaórticos, los huesos, el pulmón, la pelvis, el hígado y la vagina (Steiner E *et al.*, Int J Gynecol Cancer 13:197-203, 2003). Actualmente es difícil predecir si un tumor primario del endometrio ha metastatizado o no.

20 Los factores que regulan el establecimiento del fenotipo metastásico permanecen sin definir en gran medida. Se sabe que algunos parámetros histopatológicos tales como el estadio del tumor y el grado histológico están asociados con la supervivencia libre de tumor (Steiner E *et al.*, Int J Gynecol Cancer 13:197-203, 2003). Sin embargo, hasta la fecha ha sido imposible predecir el riesgo de presentar metástasis por medio de la cuantificación de factores críticos en tejido tumoral.

25 El documento WO 00/12758 describe un procedimiento para detectar, diagnosticar, monitorizar, estadificar, pronosticar, obtener imágenes de y tratar tipos de cáncer particulares incluyendo tipos de cáncer ginecológicos tales como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino y cáncer endometrial y cáncer de pulmón.

30 El documento WO 01/70979 describe composiciones, kits y procedimientos para detectar, caracterizar, prevenir y tratar cánceres de ovario humanos.

35 El documento WO 01/96388 describe composiciones y procedimientos para la terapia y el diagnóstico de cáncer de colon.

40 Era el objetivo de la presente invención proporcionar estructuras seleccionadas como diana para un diagnóstico, pronóstico y terapia de cánceres. En particular, era el objetivo de la presente invención identificar marcadores moleculares que hagan posible el diagnóstico diferencial entre tumores metastásicos y no metastásicos, en particular tumores endometriales.

Este objetivo se alcanza según la invención mediante el objeto de las reivindicaciones.

45 En esta solicitud de patente, se identifican marcadores genéticos cuya expresión se correlaciona con un comportamiento metastásico del endometrio. Tales marcadores genéticos se refieren a ácidos nucleicos seleccionados de entre el grupo que consiste en (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-7, una parte de al menos 30 nucleótidos consecutivos de la misma, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c).

50 La presente invención se refiere en general al diagnóstico, el pronóstico y la monitorización, es decir la determinación, de la regresión, la progresión, el desarrollo y/o la aparición, de enfermedades neoplásicas del endometrio, en particular enfermedades tumorales del endometrio y metástasis de las mismas.

55 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico y/o monitorización de un tumor endometrial en un paciente, que comprende (i) detectar y/o determinar la cantidad de un ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en: (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 6 y 7, y una parte de al menos 30 nucleótidos consecutivos de la misma, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c), y/o (ii) detectar y/o determinar la cantidad de una proteína o un péptido codificado por el ácido nucleico de (i) o de una parte del mismo, en una muestra biológica que comprende tejido corporal endometrial aislada de un paciente, en el que la presencia del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo y/o una cantidad aumentada del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo en comparación con un paciente sin un tumor endometrial, sin un riesgo de presentar un tumor endometrial, sin metástasis de un tumor

endometrial y/o sin un riesgo de presentar metástasis de un tumor endometrial, indica la presencia de un tumor endometrial, un riesgo de presentar un tumor endometrial, metástasis de un tumor endometrial y/o un riesgo de presentar metástasis de un tumor endometrial.

5 En formas de realización particulares, el paciente presenta una enfermedad neoplásica, se sospecha que padece o ha contraído una enfermedad neoplásica, o presenta un riesgo de presentar una enfermedad neoplásica. En formas de realización adicionales, el paciente presenta metástasis de una enfermedad neoplásica, se sospecha que padece o ha contraído metástasis de una enfermedad neoplásica o presenta un riesgo de presentar metástasis de una enfermedad neoplásica. En formas de realización particulares, el paciente ya se ha sometido o está previsto que se
10 someta a tratamiento de una enfermedad neoplásica, tal como tratamiento mediante resección tumoral, quimioterapia y/o radioterapia.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento de evaluación y/o pronóstico del comportamiento metastásico y/o la recidiva de un tumor endometrial, que comprende (i) detectar y/o determinar la cantidad de un
15 ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en: (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 6 y 7, y una parte de al menos 30 nucleótidos consecutivos de la misma, (b) un ácido nucleico que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas, (c) un ácido nucleico que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y (d) un ácido nucleico que es complementario al ácido nucleico de (a), (b) o (c), y/o (ii) detectar y/o determinar la cantidad
20 de una proteína o un péptido codificado por el ácido nucleico de (i) o de una parte del mismo, en una muestra biológica que comprende tejido corporal endometrial aislada de un paciente, en el que la presencia del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo y/o una cantidad aumentada del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo en comparación con un paciente sin un tumor endometrial, sin un riesgo de presentar un tumor endometrial, sin metástasis de un tumor endometrial, sin un riesgo de presentar metástasis de un tumor
25 endometrial, sin una recidiva de un tumor endometrial y/o sin un riesgo de presentar una recidiva de un tumor endometrial, indica la presencia de metástasis o recidiva de un tumor endometrial o un riesgo de presentar metástasis o recidiva de un tumor endometrial.

En formas de realización particulares, el paciente presenta una enfermedad neoplásica, se sospecha que padece o ha contraído una enfermedad neoplásica, o presenta un riesgo de presentar una enfermedad neoplásica. En formas de realización adicionales, el paciente presenta metástasis de una enfermedad neoplásica, se sospecha que padece o ha contraído metástasis de una enfermedad neoplásica o presenta un riesgo de presentar metástasis de una enfermedad neoplásica. En formas de realización particulares, el paciente ya se ha sometido o está previsto que se
30 someta a tratamiento de una enfermedad neoplásica, tal como tratamiento mediante resección tumoral, quimioterapia y/o radioterapia.

Los procedimientos según la invención permiten preferentemente que se realice un pronóstico sobre si se ha producido o se producirá metástasis de un tumor endometrial. Preferentemente, los procedimientos según la invención permiten que se distinga entre alteraciones benignas y malignas y pueden proporcionar información sobre
40 el éxito del tratamiento de un tumor endometrial que ya se ha llevado a cabo o que va a llevarse a cabo, tal como tratamiento por medio de resección tumoral, quimioterapia y/o radioterapia. En particular, los procedimientos según la invención pueden proporcionar información sobre la probabilidad de una recidiva en un tratamiento de un tumor endometrial que ya se ha llevado a cabo o que va a llevarse a cabo.

45 El experto en la materia está familiarizado con las posibilidades para realizar una detección y/o determinación de la cantidad en los procedimientos según la invención.

En formas de realización particulares, la detección y/o determinación de la cantidad en los procedimientos según la invención comprende (i) poner en contacto la muestra biológica con un agente que se une específicamente al ácido nucleico, a la proteína o al péptido o a la parte del mismo, y (ii) detectar la formación de un complejo entre el agente y el ácido nucleico o la proteína o el péptido o la parte del mismo.

Puede detectarse un ácido nucleico o puede determinarse la cantidad de un ácido nucleico según la invención con una sonda de oligonucleótido o polinucleótido que se hibrida específicamente con el ácido nucleico, o puede
55 amplificarse selectivamente el ácido nucleico, preferentemente amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En una realización, la sonda comprende una secuencia de 6-50, en particular de 10-30, 15-30 ó 20-30, nucleótidos contiguos del ácido nucleico que va a detectarse.

Puede detectarse una proteína o un péptido o una parte del mismo o puede determinarse la cantidad de una proteína o un péptido o de una parte del mismo según la invención con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína o el péptido o a la parte del mismo.

En una realización, la proteína o el péptido que va a detectarse o la parte del mismo se encuentra en un complejo con una molécula de CMH.

65

El agente utilizado para detectar o determinar la cantidad, en particular la sonda de oligonucleótido o polinucleótido, o el anticuerpo está preferentemente marcado de manera detectable. En formas de realización particulares, el marcador detectable es un marcador radiactivo, marcador fluorescente o marcador enzimático.

5 El término “unir” se refiere según la invención a una unión específica. La expresión “unión específica” significa que una unión a una diana tal como un epítipo, para la que es específico un agente de unión tal como un anticuerpo, es más fuerte en comparación con la unión a una diana diferente.

Una “unión más fuerte” puede caracterizarse, por ejemplo, por una menor constante de disociación.

10

Descripción detallada de la invención

Según la invención, un ácido nucleico es preferentemente ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Según la invención, los ácidos nucleicos comprenden ADN genómico, ADNc, ARNm, moléculas producidas de manera recombinante y sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede estar presente según la invención como una molécula monocatenaria o bicatenaria y lineal o circular cerrada covalentemente.

15

El término “derivado” de un ácido nucleico significa según la invención que están presentes sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos individuales o múltiples, preferentemente al menos 2, al menos 4, al menos 6, y preferentemente hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 10, hasta 15 o hasta 20, en el ácido nucleico. El término “derivado” de un ácido nucleico comprende además también la derivatización química de un ácido nucleico en una base de nucleótido, en el azúcar o en el fosfato, y ácidos nucleicos que contienen nucleótidos y análogos de nucleótido que no se producen de manera natural.

20

Los ácidos nucleicos descritos según la invención están preferentemente aislados. El término “ácido nucleico aislado” significa según la invención que el ácido nucleico se ha (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) producido de manera recombinante mediante clonación, (iii) purificado, por ejemplo mediante escisión y fraccionamiento mediante electroforesis en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico disponible para manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

25

30

Un ácido nucleico es entonces “complementario” a otro ácido nucleico si las dos secuencias pueden hibridarse entre sí y formar un dúplex estable, llevándose a cabo la hibridación preferentemente en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones restrictivas). Se describen condiciones restrictivas, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook *et al.*, ed., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina sérica bovina al 0,02%, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7. Tras la hibridación, se lava la membrana a la que se ha transferido el ADN, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego en 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C.

35

40

Según la invención, los ácidos nucleicos complementarios presentan al menos el 40%, en particular al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, y preferentemente al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99%, de identidad de nucleótidos.

45

El término “% de identidad” pretende referirse a un valor porcentual de nucleótidos que son idénticos en una alineación óptima entre dos secuencias que van a compararse, siendo dicho valor porcentual puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias pueden distribuirse aleatoriamente y a lo largo de toda la longitud de la secuencia y la secuencia que va a compararse puede comprender adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia, con el fin de obtener una alineación óptima entre dos secuencias. Las comparaciones de secuencia entre dos secuencias se llevan a cabo habitualmente comparando dichas secuencias, tras una alineación óptima, con respecto a un segmento o “ventana de comparación”, con el fin de identificar regiones locales de coincidencia de secuencia. La alineación óptima para una comparación puede llevarse a cabo manualmente o con la ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, con la ayuda del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, y con la ayuda del algoritmo de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444 o con la ayuda de programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

50

55

Se obtiene el porcentaje de identidad determinando el número de posiciones idénticas en las que coinciden las secuencias que van a compararse, dividiendo este número entre el número de posiciones comparadas y multiplicado este resultado por 100.

60

Por ejemplo, puede utilizarse el programa de BLAST “BLAST 2 sequences” que está disponible en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/b12seq/wblast2.cgi>.

65

5 Los ácidos nucleicos pueden estar presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos que pueden ser homólogos o heterólogos. En formas de realización particulares, un ácido nucleico se une funcionalmente a secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto al ácido nucleico, haciendo referencia en este caso el término "homólogo" al hecho de que un ácido nucleico también se une funcionalmente de manera natural a la secuencia de control de la expresión, y haciendo referencia el término "heterólogo" al hecho de que un ácido nucleico no se une funcionalmente de manera natural a la secuencia de control de la expresión.

10 Un ácido nucleico, preferentemente un ácido nucleico transcribible y en particular un ácido nucleico que codifica para un péptido o una proteína, y una secuencia de control de la expresión se unen "funcionalmente" entre sí, si se unen covalentemente entre sí de tal manera que la transcripción o expresión del ácido nucleico está bajo el control o bajo la influencia de la secuencia de control de la expresión. Si el ácido nucleico va a traducirse en un péptido o una proteína funcional, la inducción de una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión está unida funcionalmente a la secuencia codificante da como resultado la transcripción de la secuencia codificante, sin provocar un desplazamiento del marco de lectura en la secuencia codificante o sin poder la secuencia codificante traducirse en el péptido o la proteína deseado.

20 El término "secuencia de control de la expresión" comprende promotores, secuencias de unión al ribosoma y otros elementos de control que controlan la transcripción de un gen o la traducción del ARN derivado. En formas de realización particulares, pueden regularse las secuencias de control de la expresión. La estructura precisa de las secuencias de control de la expresión puede variar dependiendo de la especie o el tipo celular pero comprende habitualmente secuencias no transcritas en 5' y no traducidas en 5' y 3' implicadas en la iniciación de la transcripción o la traducción, tal como la caja TATA, secuencia de ocupación de extremos, secuencia CAAT y similares. En particular, las secuencias de control de la expresión no transcritas en 5' comprenden una región promotora que engloba una secuencia promotora para el control de la transcripción del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias de control de la expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en el sentido de 5'.

30 El término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ADN en el sentido de 5' (en 5') de la secuencia codificante de un gen y controla la expresión de la secuencia codificante proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para ARN polimerasa. La región promotora puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para factores adicionales, implicados en la regulación de la transcripción del gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procarionta o eucariota. Un promotor puede ser "inducible" e iniciar la transcripción en respuesta a un inductor, o puede ser "constitutivo" si la transcripción no está controlada por un inductor. Un promotor inducible se expresa sólo en un grado muy pequeño o nada en absoluto, si está ausente un inductor. En presencia del inductor, "se activa" el gen o se aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado habitualmente por la unión de un factor de transcripción específico.

40 Promotores preferidos son, por ejemplo, promotores para polimerasa de SP6, T3 o T7.

45 El término "expresión" se utiliza en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas.

50 Además, un ácido nucleico que codifica para una proteína o un péptido puede unirse a otro ácido nucleico que codifica para una secuencia peptídica que controla la secreción de la proteína o el péptido codificado por el ácido nucleico de una célula huésped. Un ácido nucleico también puede unirse a otro ácido nucleico que codifica para una secuencia peptídica que provoca el anclaje de la proteína o el péptido codificado a la membrana celular de una célula huésped o la compartimentalización de la misma en orgánulos particulares de dicha célula. De manera similar, puede establecerse una unión a un ácido nucleico que representa un gen indicador o cualquier "etiqueta".

55 En una realización preferida, está presente un ácido nucleico en un vector, dado el caso con un promotor que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se utiliza a este respecto en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermedio para un ácido nucleico que, por ejemplo, permita que se introduzca dicho ácido nucleico en células procariontas y/o eucariotas y, dado el caso, que se integre en un genoma. Tales vectores se replican y/o se expresan preferentemente en la célula. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos o genomas virales. El término "plásmido", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere en general a un constructo de material genético extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

65 El término "célula huésped" se refiere a cualquier célula que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico exógeno, preferentemente ADN o ARN. El término "célula huésped" comprende según la invención células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, células de mamífero, en particular células de seres humanos, células de levadura y células de insecto). Se prefieren especialmente células de mamífero tales como

células de seres humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejido y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de médula ósea y células madre embrionarias. En otras formas de realización, la célula huésped es una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el término "célula presentadora de antígeno" según la invención células dendríticas, monocitos y macrófagos. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en una única o en varias copias y, en una realización, se expresa en la célula huésped.

En aquellos casos de la descripción, en los que una molécula de CMH presenta una proteína o un péptido, un vector de expresión también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha molécula de CMH. La secuencia de ácido nucleico que codifica para la molécula de CMH puede estar presente en el mismo vector de expresión que el ácido nucleico que codifica para la proteína o el péptido, o ambos ácidos nucleicos pueden estar presentes en vectores de expresión diferentes. En este último caso, los dos vectores de expresión pueden cotransfectarse en una célula. Si una célula huésped no expresa ni la proteína o el péptido ni la molécula de CMH, ambos ácidos nucleicos que codifican para los mismos pueden transfectarse en la célula o bien en el mismo vector de expresión o bien en vectores de expresión diferentes. Si la célula ya expresa la molécula de CMH, sólo puede transfectarse la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína o el péptido en la célula.

Kits para amplificar un ácido nucleico con el fin de detectar de ese modo el ácido nucleico o determinar su cantidad comprenden, por ejemplo, un par de cebadores de amplificación que se hibridan con el ácido nucleico que va a amplificarse. Los cebadores comprenden preferentemente una secuencia de 6-50, en particular de 10-30, 15-30 ó 20-30, nucleótidos contiguos del ácido nucleico que va a amplificarse y no se solapan con el fin de evitar la formación de dímeros de cebadores. Uno de los cebadores se hibridará con una cadena del ácido nucleico que va a amplificarse y el otro cebador se hibridará con la cadena complementaria en una disposición que permita la amplificación del ácido nucleico.

Pueden utilizarse "ácidos nucleicos antisentido" para regular, en particular reducir, la expresión de un ácido nucleico. El término "ácido nucleico antisentido" significa un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado u oligodesoxirribonucleótido modificado y que se hibrida en condiciones fisiológicas a ADN que comprende un gen particular o a ARNm de dicho gen, inhibiendo de ese modo la transcripción de dicho gen y/o la traducción de dicho ARNm. Un "ácido nucleico antisentido" comprende también un constructo que contiene un ácido nucleico o una parte del mismo en orientación inversa con respecto a su promotor natural. Un transcrito antisentido de un ácido nucleico o de una parte del mismo puede formar un dúplex con el ARNm que se produce de manera natural que especifica un péptido o una proteína, impidiendo por tanto la traducción del ARNm en dicho péptido o dicha proteína. Otra opción es la utilización de ribozimas para inactivar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos antisentido preferidos presentan una secuencia de 6-50, en particular de 10-30, 15-30 ó 20-30, nucleótidos contiguos del ácido nucleico diana y preferentemente son totalmente complementarios al ácido nucleico diana o una parte del mismo.

Preferentemente, el oligonucleótido antisentido se hibrida con un sitio N-terminal o en el sentido de 5' tal como un sitio de iniciación de la traducción, un sitio de iniciación de la transcripción o un sitio promotor o el oligonucleótido antisentido se hibrida con una región no traducida en 3' o un sitio de corte y empalme de ARNm.

En una forma de realización, un oligonucleótido consiste según la invención en ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o una combinación de los mismos. El extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido se unen a este respecto mediante un enlace fosfodiéster. Estos oligonucleótidos pueden sintetizarse de la manera habitual o producirse de manera recombinante.

Preferentemente, un oligonucleótido es un oligonucleótido "modificado". A este respecto, el oligonucleótido puede estar modificado de maneras muy diferentes, por ejemplo, con el fin de aumentar su estabilidad o eficacia terapéutica, sin impedir su capacidad para unirse a su diana. El término "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido en el que (i) al menos dos de sus nucleótidos se unen entre sí mediante un enlace internucleosídico sintético (es decir, un enlace internucleosídico que no es un enlace fosfodiéster), y/o (ii) un grupo químico que normalmente no está presente en ácidos nucleicos se une covalentemente al oligonucleótido. Enlaces internucleosídicos sintéticos preferidos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres carboximetílicos y péptidos.

El término "oligonucleótido modificado" también comprende oligonucleótidos con una o más bases modificadas covalentemente y/o uno o más azúcares modificados covalentemente. Los "oligonucleótidos modificados" comprenden por ejemplo oligonucleótidos con residuos de azúcar que se unen covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos a un grupo hidroxilo en la posición 3' y un grupo fosfato en la posición 5'. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender, por ejemplo, un residuo de ribosa alquilado en 2'-O o otro azúcar en lugar de ribosa, tal como arabinosa.

El término “péptido” se refiere a sustancias que comprenden al menos dos, al menos 3, al menos 4, al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 13, al menos 16, al menos 20 y preferentemente hasta 50, 100 ó 150, aminoácidos consecutivos que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos. El término “proteína” se refiere a grandes péptidos, preferentemente péptidos con al menos 151 aminoácidos, pero los términos “péptido” y “proteína” se utilizan en la presente memoria en general como sinónimos.

Las proteínas y los péptidos descritos están preferentemente aislados. Los términos “proteína aislada” o “péptido aislado” significan que la proteína o el péptido están separados de su entorno natural. Una proteína o un péptido aislado pueden estar en un estado esencialmente purificado. El término “esencialmente purificado” significa que la proteína o el péptido está esencialmente libre de otras sustancias con las que está asociado en la naturaleza o *in vivo*.

Tales proteínas y péptidos sirven, por ejemplo, para la producción de anticuerpos y pueden emplearse en un ensayo inmunológico o de diagnóstico o como agentes terapéuticos. Las proteínas y los péptidos descritos en la presente memoria pueden aislarse de muestras biológicas tales como homogeneizados tisulares o celulares y también pueden expresarse de manera recombinante en una multiplicidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

Los “derivados” de una proteína o un péptido o de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de delección de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden fusiones amino- y/o carboxi-terminales, así como inserciones de aminoácidos individuales o múltiples en una secuencia de aminoácidos particular. En variantes de la secuencia de aminoácidos con una inserción, se introducen uno o más residuos de aminoácido en un sitio predeterminado en una secuencia de aminoácidos, aunque también es posible la inserción al azar con el examen adecuado del producto resultante. Las variantes de delección de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia. Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan porque al menos se elimina un residuo en la secuencia y otro residuo se inserta en su lugar. Las modificaciones están presentes preferentemente en posiciones en la secuencia de aminoácidos que no están conservadas entre proteínas o péptidos homólogos y/o se sustituyen preferentemente aminoácidos por otros que presentan propiedades similares tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, electronegatividad, volumen de la cadena lateral y similares (sustitución conservativa). Las sustituciones conservativas se refieren, por ejemplo, a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que se enumera a continuación en el mismo grupo como el aminoácido sustituido:

1. Pequeños residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. Residuos cargados negativamente y sus amidas: Asn, Asp, Glu, Gln
3. Residuos cargados positivamente: His, Arg, Lys
4. Grandes residuos alifáticos, apolares: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. Grandes residuos aromáticos: Phe, Tyr, Trp.

Tres residuos se ponen entre paréntesis debido a su papel particular en la arquitectura de proteínas. Gly es el único residuo sin una cadena lateral y por tanto confiere flexibilidad a dicha cadena. Pro presenta una geometría inusual que restringe en gran medida la cadena. Cys puede formar un puente disulfuro.

Las variantes de aminoácidos descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis peptídica conocidas tales como, por ejemplo, mediante “síntesis en fase sólida” (Merrifield, 1964) y procedimientos similares o mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para producir proteínas y péptidos con sustituciones, inserciones o delecciones se describe en detalle en Sambrook *et al.* (1989), por ejemplo.

Los “derivados” de proteínas o péptidos también incluyen sustituciones, delecciones y/o adiciones individuales o múltiples de cualquier molécula que esté asociada con la proteína o el péptido, tal como hidratos de carbono, lípidos y/o proteínas o péptidos. El término “derivado” además se extiende también a todos los equivalentes químicos funcionales de las proteínas y los péptidos y a sustancias que no contienen sólo los componentes de aminoácido sino también componentes distintos de aminoácidos tales como azúcares y estructuras de fosfato, y también comprenden sustancias que contienen enlaces tales como enlaces éster, enlaces tioéter o enlaces disulfuro.

Una parte o un fragmento de una proteína o un péptido presenta preferentemente una propiedad funcional de la proteína o el péptido del que se deriva. Tales propiedades funcionales incluyen, por ejemplo, la interacción con anticuerpos o la interacción con otros péptidos o proteínas. Una propiedad importante es la capacidad para formar un complejo con moléculas de CMH y, dado el caso, para generar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante la estimulación de células T citotóxicas o cooperadoras. Una parte o un fragmento de una proteína o un péptido comprende preferentemente una secuencia de al menos 6, al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al

menos 20, o al menos 30, y preferentemente hasta 8, 10, 12, 15, 20, 30 ó 50, aminoácidos consecutivos de la proteína o el péptido.

5 Una parte o un fragmento de un ácido nucleico que codifica para una proteína o un péptido se refiere según la invención preferentemente a la parte del ácido nucleico que codifica al menos para la proteína o el péptido y/o para una parte o un fragmento de la proteína o el péptido, tal como se definió anteriormente.

10 Pueden producirse antisueros que contienen anticuerpos, que se unen específicamente a una diana mediante diversos procedimientos convencionales; véase, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9, "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142 y "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447. A este respecto también es posible generar anticuerpos que presentan afinidad y especificidad que reconocen proteínas de membrana complejas en su forma nativa (Azorsa *et al.*, J. Immunol. Methods 229: 35-48, 1999; Anderson *et al.*, J. Immunol. 143: 1899-1904, 1989; Gardsvoll, J. Immunol. Methods 234: 107-116, 2000). Esto es especialmente importante para la producción de anticuerpos que pretenden utilizarse terapéuticamente, pero también para muchas aplicaciones de diagnóstico. Esto puede implicar la inmunización con la proteína completa, con subsecuencias extracelulares, así como con células que expresan la molécula diana en una forma plegada fisiológicamente.

20 Los anticuerpos monoclonales se producen tradicionalmente con la ayuda de la tecnología del hibridoma (detalles técnicos: véanse "Monoclonal Antibodies: A Practical Approach" de Philip Shepherd, Christopher Dean ISBN 0-19-963722-9; "Antibodies: A Laboratory Manual" de Ed Harlow, David Lane ISBN: 0879693142, "Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO" de Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow ISBN: 0879695447).

25 Se sabe que sólo una pequeña parte de una molécula de anticuerpo, el parátipo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase Clark, W. R. (1986), The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991), Essential Immunology, 7ª edición, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento pero no están implicadas en la unión a antígenos. Un anticuerpo del que se ha eliminado enzimáticamente la región pFc' o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, porta ambos sitios de unión a antígenos de un anticuerpo completo. De manera similar, un anticuerpo del que se ha eliminado enzimáticamente la región Fc o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, porta un sitio de unión a antígenos de una molécula de anticuerpo intacta. Además, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera unida covalentemente de un anticuerpo y parte de la cadena pesada del anticuerpo, denominado Fd. Los fragmentos Fd son los principales determinantes de la especificidad de anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes, sin alterar la especificidad del anticuerpo), y los fragmentos Fd cuando están aislados mantienen la capacidad para unirse a un epítipo.

40 Dentro de la parte de unión a antígenos de un anticuerpo, existen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones de entramado (FR) que mantienen la estructura terciaria del parátipo. Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG hay cuatro regiones de entramado (FR1 a FR4) que están separadas en cada caso por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las regiones CDR y en particular CDR3 e incluso más la región CDR3 de la cadena pesada son responsables en gran medida de la especificidad de anticuerpo.

50 Se sabe que pueden sustituirse regiones distintas a CDR de un anticuerpo de mamífero por regiones similares de anticuerpos que presentan una especificidad igual o diferente, manteniéndose la especificidad del epítipo del anticuerpo original. Esto hizo posible desarrollar los denominados anticuerpos "humanizados" en los que se unen covalentemente CDR no humanas a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

55 El documento WO 92/04381 describe como ejemplo diferente la producción y la utilización de anticuerpos anti-VRS murinos humanizados en los que al menos parte de las regiones FR murinas se han sustituido por regiones FR de origen humano. Tales anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos intactos con capacidad de unión a antígenos, se denominan frecuentemente anticuerpos "quiméricos".

60 La expresión "anticuerpo" también comprende fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab, Fv y Fd, anticuerpos quiméricos en los que regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias no humanas o humanas homólogas, anticuerpos de fragmento F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias no humanas o humanas homólogas, anticuerpos de fragmento Fab quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias no humanas o humanas homólogas y anticuerpos de fragmento Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias no humanas o humanas homólogas. El término "anticuerpo" también comprende anticuerpos de cadena sencilla.

65

Los anticuerpos también pueden acoplarse a agentes de diagnóstico específicos con el fin de presentar, por ejemplo, células y tejidos que expresan proteínas o péptidos particulares. También pueden acoplarse a agentes terapéuticos.

5 Los agentes de diagnóstico incluyen cualquier marcador que sea adecuado para: (i) proporcionar una señal detectable, (ii) interactuar con un segundo marcador con el fin de modificar la señal detectable proporcionada por el marcador primero o segundo, por ejemplo FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), (iii) influir en la movilidad tal como la movilidad electroforética por medio de la carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporcionar un grupo de captura, por ejemplo complejación por afinidad, complejación de anticuerpo/antígeno o complejación iónica. Marcadores adecuados son estructuras tales como marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferentemente marcadores isotópicos estables, marcadores enzimáticos, marcadores de partículas, en particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lectinas, y secuencias de marcaje que comprenden secuencias de ácido nucleico y/o de aminoácidos. Los agentes de diagnóstico comprenden, pero no se limitan a, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y agentes de radiodiagnóstico, incluyendo emisores de positrones tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, y núclidos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

La expresión “agente terapéutico” significa según la invención cualquier sustancia que puede ejercer una acción terapéutica, y comprende, pero no se limita a, agentes anticancerígenos, compuestos dotados de yodo radiactivo, toxinas, fármacos citostáticos o citolíticos, etc. Los agentes anticancerígenos comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfano, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubina, doxorubicina, taxol, etopósido, fluorouracilo, interferón- α , lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbazona HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Se describen agentes anticancerígenos adicionales, por ejemplo, en Goodman y Gilman, “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 8ª edición, 1990, McGraw-Hill, Inc., en particular el capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner)). Las toxinas pueden ser proteínas tales como proteína antiviral de fitolaca, toxina del cólera, toxina pertúsica, ricina, gelonina, abrina, exotoxina diftérica o exotoxina de *Pseudomonas*. Los residuos de toxinas también pueden ser radionúclidos de emisión de alta energía tales como cobalto-60.

El término “complejo mayor de histocompatibilidad” o “CMH” se refiere a un complejo de genes que está presente en todos los vertebrados. Las proteínas o moléculas de CMH están implicadas en la señalización entre linfocitos y células presentadoras de antígeno en respuestas inmunitarias normales, en las que se unen a péptidos y los presentan para su reconocimiento por receptores de células T. Las moléculas de CMH se unen a péptidos dentro de un compartimento de procesamiento intracelular y presentan dichos péptidos en la superficie de células presentadoras de antígeno para su reconocimiento por células T. La región de CMH humana, también denominada HLA, está ubicada en el cromosoma 6 y comprende las regiones de clase I y clase II. En una realización preferida según todos los aspectos de la invención, una molécula de CMH es una molécula de HLA.

El término “paciente” comprende según la invención pacientes masculinos y femeninos, preferentemente pacientes femeninos. Los ejemplos de pacientes comprenden según la invención seres humanos, primates no humanos u otros animales, en particular mamíferos tales como vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores tales como ratones y ratas. En una realización especialmente preferida, el paciente es un ser humano.

La expresión “enfermedad neoplásica” se refiere a la formación *de novo* de tejidos corporales en el sentido de crecimiento excesivo autónomo, no regulado y/o incontrolado, refiriéndose el término “enfermedad” a cualquier estado patológico. Una enfermedad neoplásica es una enfermedad tumoral o cáncer tal como leucemias, seminomas, melanomas, teratomas, gliomas, cánceres de riñón, glándula suprarrenal, tiroides, intestino, hígado, colon, estómago, tracto gastrointestinal, ganglios linfáticos, esófago, colorrectales, páncreas, oído, nariz y garganta (ONG), mama, próstata, útero, ovarios, huesos, vagina y pulmón, y en particular cáncer del endometrio y metástasis del mismo que en el caso de cáncer del endometrio, se producen, en particular, en ganglios linfáticos paraaórticos, huesos, pulmón, pelvis, hígado y vagina. Se prefiere que se induzca una enfermedad neoplásica mediante carcinogénesis. Según la invención, las neoplasias se refieren a alteraciones benignas sin metástasis y alteraciones malignas, en particular con crecimiento invasivo y formación de metástasis.

Según la invención, el término “miometrio” se refiere a la fuerte capa intermedia de la pared uterina, formada por músculos lisos.

El término “recidiva” se refiere según la invención a una recidiva de una enfermedad, en particular su recidiva tras su curación o curación aparente. Con respecto a una enfermedad tumoral, el término “recidiva” se refiere a la recidiva de tumores tras el tratamiento satisfactorio inicialmente tal como tratamiento mediante cirugía, quimioterapia y/o radioterapia.

La expresión "cantidad aumentada" se refiere preferentemente a un aumento en al menos el 10%, en particular al menos el 20%, al menos el 50% o al menos el 100%. La cantidad de una sustancia está aumentada en un objeto de prueba tal como una muestra biológica con respecto a una referencia, incluso si puede detectarse en el objeto de prueba pero no está presente y/o no puede detectarse en la referencia.

Una muestra biológica puede ser una muestra de tejido, incluyendo fluidos corporales, y/o una muestra celular, y puede obtenerse de la manera habitual tal como mediante biopsia de tejido, incluyendo biopsia en sacabocados, y tomando sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales.

Los términos "célula T" y "linfocito T" incluyen células T cooperadoras y células T citolíticas o citotóxicas.

Algunos procedimientos terapéuticos se basan en una respuesta del sistema inmunitario de un paciente, que da como resultado la lisis de células presentadoras de antígeno tales como células cancerosas que presentan uno o más péptidos. A este respecto, por ejemplo, se administran linfocitos T citotóxicos autólogos que son específicos para un complejo de un péptido y una molécula de CMH a un paciente que presenta una anomalía celular. La producción *in vitro* de tales linfocitos T citotóxicos se conoce.

En un procedimiento terapéutico que se denomina transferencia adoptiva (Greenberg, J. Immunol. 136(5):1917, 1986; Riddell *et al.*, Science 257:238, 1992; Lynch *et al.*, Eur. J. Immunol. 21:1403-1410, 1991; Kast *et al.*, Cell 59:603-614, 1989) se combinan células que presentan el complejo deseado (por ejemplo, células dendríticas) con linfocitos T citotóxicos del paciente que va a tratarse, dando como resultado la propagación de linfocitos T citotóxicos específicos. Los linfocitos T citotóxicos propagados se administran entonces a un paciente que presenta una anomalía celular, presentando las células anómalas el complejo específico. Los linfocitos T citotóxicos lisan entonces las células anómalas, activando de ese modo una acción terapéutica deseada.

La transferencia adoptiva no es la única forma de terapia que puede aplicarse. También pueden generarse linfocitos T citotóxicos *in vivo* de manera conocida *per se*. En un procedimiento se utilizan células no proliferativas que expresan el complejo, tales como células tumorales irradiadas o células que se han transfectado con uno o ambos genes necesarios para la presentación del complejo (es decir, el péptido antigénico y la molécula de CMH de presentación). Una forma preferida es la introducción de una proteína o un péptido que es característico para un tumor, en forma de ARN recombinante, en células que entonces presentan el complejo de interés. Tales células se reconocen por linfocitos T citotóxicos autólogos que entonces se propagan.

Puede lograrse una acción similar combinando una proteína o un péptido con un adyuvante para hacer posible la incorporación *in vivo* en células presentadoras de antígeno. La proteína o el péptido pueden representarse como tal, como ADN (por ejemplo, dentro de un vector) o como ARN. La proteína o el péptido pueden procesarse de modo que se produzca una pareja peptídica para la molécula de HLA. También es posible una presentación sin que se requiera procesamiento adicional. Éste es el caso en particular si los péptidos pueden unirse a moléculas de HLA. Se prefieren formas de administración en las que el antígeno total se procesa *in vivo* por una célula dendrítica, puesto que esto también puede producir respuestas de células T cooperadoras que se requieren para una respuesta inmunitaria eficaz (Ossendorp *et al.*, Immunol Lett. 74:75-79, 2000; Ossendorp *et al.*, J. Exp. Med. 187:693-702, 1998).

Los términos "inmunización" o "vacunación" se refieren a un aumento o una activación de una respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Pueden emplearse modelos animales para someter a prueba un efecto de inmunización frente al cáncer. Pueden introducirse, por ejemplo, células cancerosas humanas en un ratón para crear un tumor, y administrarse uno o más ácidos nucleicos que codifican para proteínas o péptidos característicos para células cancerosas. El efecto sobre las células cancerosas (por ejemplo, reducción en el tamaño tumoral) puede medirse como criterio para la eficacia de una inmunización mediante el ácido nucleico.

Como parte de la composición para inmunización, se administran preferentemente uno o más antígenos o fragmentos estimulantes del mismo junto con uno o más adyuvantes para inducir una respuesta inmunitaria o aumentar una respuesta inmunitaria. Un adyuvante es una sustancia que se incorpora en el antígeno o se administra junto con el mismo y potencia la respuesta inmunitaria. Los adyuvantes pueden potenciar la respuesta inmunitaria proporcionando un reservorio de antígeno (de manera extracelular o en macrófagos), activando macrófagos y/o estimulando determinados linfocitos. Se conocen adyuvantes y comprenden de manera no limitativa monofosforil-lípido-A (MPL, SmithKline Beecham), saponinas tales como QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; documento WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 y QS-L1 (So *et al.*, Mol. Cells. 7:178-186, 1997), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, vitamina E, montanida, alumbre, oligonucleótidos CpG (véase Kreig *et al.*, Nature 374:546-9, 1995) y diversas emulsiones de agua en aceite que se preparan a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol. Preferentemente se administran péptidos en una mezcla con DQS21/MPL. La razón de DQS21 con respecto a MPL es normalmente de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferentemente de aproximadamente 1:5 a 5:1 y en particular de aproximadamente 1:1. En una formulación de vacuna para la administración a seres humanos, DQS21 y MPL están presentes normalmente en un intervalo de desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 100 µg.

También pueden administrarse otras sustancias que estimulan una respuesta inmunitaria en el paciente. Por ejemplo, pueden utilizarse citocinas para una vacunación debido a sus propiedades reguladoras sobre los linfocitos. Tales citocinas comprenden, por ejemplo, interleucina-12 (IL-12) que ha mostrado que potencia los efectos protectores de las vacunas (véase Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF e IL-18.

Pueden administrarse proteínas y péptidos de manera conocida *per se*. Por ejemplo, pueden administrarse ácidos nucleicos mediante procedimientos *ex vivo*, es decir, retirando células de un paciente, modificando genéticamente las células para introducir un ácido nucleico, y volviendo a introducir las células modificadas en el paciente. Esto comprende habitualmente introducir *in vitro* una copia funcional de un gen en las células de un paciente y devolver las células modificadas genéticamente al paciente. La copia funcional del gen está bajo el control funcional de elementos reguladores que permiten que el gen se exprese en las células modificadas genéticamente. El experto en la materia conoce procedimientos de transfección y transducción. También está prevista según la invención la administración de ácidos nucleicos *in vivo* utilizando vectores tales como virus y liposomas dirigidos.

Preferentemente, se selecciona un vector viral para la administración de un ácido nucleico de entre el grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, poxvirus, incluyendo virus *Vaccinia* y poxvirus atenuados, virus del bosque de Semliki, retrovirus, virus Sindbis y partículas pseudovirales Ty. Se prefieren especialmente adenovirus y retrovirus. Los retrovirus son normalmente deficientes para la replicación (es decir, no pueden producir partículas infecciosas).

Pueden emplearse diversos procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células *in vitro* o *in vivo*. Tales procedimientos comprenden la transfección de precipitados con fosfato de calcio de ácidos nucleicos, transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, transfección o infección con los virus anteriores que portan los ácidos nucleicos de interés, transfección mediada por liposomas y similares. En formas de realización particulares, se prefiere el guiado del ácido nucleico a células particulares. En tales formas de realización, un portador empleado para administrar un ácido nucleico a una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula de direccionamiento a la diana unida. Por ejemplo, puede incorporarse una molécula tal como un anticuerpo que es específico para una proteína de membrana de superficie en la célula diana, o un ligando para un receptor en la célula diana, en el portador de ácido nucleico o unirse al mismo. Si se desea la administración de un ácido nucleico mediante liposomas, pueden incorporarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie que está asociada con endocitosis en la formulación de liposomas para hacer que sea posible el direccionamiento a la diana y/o la captación. Tales proteínas incluyen proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas, que son específicos para un tipo celular particular, anticuerpos contra proteínas que se internalizan, proteínas que se dirigen a un sitio intracelular, y similares.

La presente invención se describe en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos que sirven exclusivamente para fines ilustrativos y no han de entenderse como limitativos. Formas de realización adicionales que están englobadas asimismo por la invención son accesibles al experto en la materia basándose en la descripción y los ejemplos.

Figuras

Figura 1. Análisis de transferencia de tipo Northern utilizando una sonda específica para EDI-3

Se obtuvo ARN de testículos, músculo esquelético, hígado, pulmón, bazo, cerebro y corazón (carriles 1-8). Se encontró expresión del transcrito EDI-3 en testículos (carril 1), músculo esquelético (carril 3) y corazón (carril 8).

Figura 2. Expresión de EDI-3 en carcinomas endometriales primarios

Se encontró una expresión elevada en un factor de 6,4 en tumores metastásicos en comparación con tumores no metastásicos ($p < 0,001$; prueba de Mann-Whitney, bilateral). Sólo se incluyeron las pacientes observadas a lo largo de un periodo de al menos 5 años. Sin embargo, también se obtiene una diferencia con respecto a la expresión de EDI-3 cuando se incluyen las 57 pacientes, incluyendo también las observadas a lo largo de periodos más cortos a 5 años ($p < 0,001$, datos no mostrados). La línea horizontal en el centro de una caja indica el valor de la mediana de la muestra. Los bordes de una caja indican los percentiles 25° y 75°. Los bigotes indican el intervalo de valores que se encuentran dentro de 1,5 longitudes de caja.

Figura 3. Experimento de confirmación utilizando un segundo par de cebadores para cuantificar la expresión de ARNm de EDI-3

El par de cebadores n.º 1 amplifica un fragmento entre las posiciones de pb 2872 y 3172, mientras que el par de cebadores n.º 2 da como resultado una amplificación entre las posiciones de pb 3161 y 3362. La PCR cuantitativa produjo una correlación con $p < 0,001$ y $R = 0,824$.

Figura 4. Experimento de confirmación utilizando un segundo par de cebadores para cuantificar la expresión de ARNm de EDI-3

De manera similar a los resultados obtenidos con el primer par de cebadores, se encontró una mayor expresión de EDI-3 en tumores metastásicos en comparación con tumores no metastásicos ($p < 0,001$, prueba de Mann-Whitney, bilateral). Sólo se tuvieron en cuenta las pacientes observadas a lo largo de un periodo de al menos cinco años. La línea horizontal en el centro de una caja indica el valor de la mediana de la muestra. Los bordes de una caja marcan los percentiles 25° y 75° percentiles. Los bigotes indican el intervalo de valores que se encuentran dentro de 1,5 longitudes de caja.

Figura 5. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación entre la expresión del transcrito EDI-3 y el intervalo de tiempo hasta una recidiva tras resección de tejido de cáncer endometrial

Se dicotomizó la expresión de EDI-3 utilizando el percentil del 75% ($p = 0,0023$, prueba de rangos logarítmicos).

Figura 6. Análisis de Kaplan-Meier de la asociación entre la expresión del transcrito EDI-3 y el intervalo de tiempo hasta una recidiva en función del estadio de FIGO

Se dicotomizó la expresión de EDI-3 utilizando el percentil del 75%.

Figura 7. Experimento de confirmación utilizando un segundo par de cebadores para cuantificar la expresión de ARNm de EDI-3

De manera similar a los resultados obtenidos con el primer par de cebadores, el intervalo de tiempo hasta la aparición de una recidiva fue más largo para pacientes con baja expresión de EDI-3 en comparación con pacientes con alta expresión de EDI-3 tras resección de tejido de cáncer endometrial. Se dicotomizó EDI-en el percentil del 75% ($p < 0,001$, prueba de rangos logarítmicos).

Ejemplos

Ejemplo 1: Pacientes y muestras de tejido

Entre 1985 y 2000, se trataron 269 pacientes con cáncer de endometrio confirmado de manera histológica en el Departamento de Obstetricia y Ginecología en el Hospital Universitario en Maguncia, Alemania.

Pudo obtenerse ARN de alta calidad sólo de 63 de estas pacientes por tres motivos: (i) partes de las muestras de tumor utilizadas para el análisis de ARN se examinaron adicionalmente de manera histológica. Si la fracción de células tumorales era menor que el 95%, la muestra no se incluyó en el presente estudio. (ii) No fue posible congelar ningún tejido de algunos pacientes con tumores pequeños. (iii) La calidad de algunas muestras de ARN no fue suficiente basándose en la razón de bandas de 28S y 18S, o la expresión del gen de huPO (fosfoproteína humana) constitutivo era demasiado baja (Mohrmann G. *et al.*, Int. J. Cancer, en impresión, 2005). Basándose en la información de las historias clínicas, incluyendo informes quirúrgicos e informes patológicos, se generó una base de datos. Se incluyeron el tipo y grado de tumor histológico, el peso, la altura y la edad de las pacientes, diabetes mellitus, el estadio de FIGO, el tipo de cirugía y la clasificación TNM patológica. El estadio de FIGO seguía el sistema de determinación de estadio quirúrgico para carcinomas endometriales de 1988 (Creasman W T, Gynecol Oncol 1989; 35: 125-7). Se calculó el índice de masa corporal (IMC) utilizando la fórmula $IMC = [\text{peso}/(\text{altura})^2]$. Se calculó el tiempo libre de recidiva como la diferencia entre la fecha de un tratamiento quirúrgico y la fecha de una documentación de una recidiva. Se desarrollaron recidivas debidas a un nuevo crecimiento tumoral en ganglios linfáticos paraaórticos, pelvis, huesos, pulmón, hígado y vagina. Se evaluaron todas las muestras histológicas por un patólogo experimentado. Se clasificaron todos los tumores según la clasificación OMS/ISGYPY (Scully R E *et al.*, International Classification and Histologic Typing of Female Genital Tract Tumours. Springer: Nueva York, 1994). Se determinó el grado del tumor según Kurman *et al.* (Kurman R J *et al.*, En: Kurman R J, ed. Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 4ª ed. Springer: Nueva York, 1994, 439-86), teniendo en cuenta características estructurales y características centrales. Se clasificó la profundidad de invasión según Sevin y Angioli (Sevin B-U, Angioli R. Uterine Corpus: Multimodality Therapy in Gynecologic Oncology. Thieme: Nueva York, 1996) en función de la infiltración del tercio interno, central y externo del miometrio. Para el aislamiento de ARN, sólo se incluyeron en el estudio muestras de tumor controladas de manera histológica que contenían al menos el 95% de células tumorales sin endometrio o miometrio no neoplásico. Un procedimiento quirúrgico convencional fue la histerectomía abdominal y ovariosalpingectomía bilateral. Se diseccionaron los ganglios linfáticos en los casos en los que secciones congeladas intraquirúrgicas mostraron infiltración del tercio externo del miometrio y también en los casos con afectación cervicouterina, dependiendo de factores de morbilidad general del paciente.

Entre los 63 pacientes con ARN disponible de alta calidad, se seleccionaron tres parejas de pacientes con estadio de FIGO, grado, tipo de tumor histopatológico, tipo de cirugía, estado menopáusico, profundidad de invasión en el miometrio idénticos, así como un índice de masa corporal similar. Estas parejas comprendían en cada caso una paciente que desarrolló metástasis en el plazo de cinco años tras la cirugía y otra paciente en la que no se encontró

que tuviera ninguna metástasis dentro de un periodo de observación de al menos cinco años. Se utilizaron las seis pacientes relacionadas (“conjunto de selección de tumores”) para identificar genes expresados de manera diferencial.

- 5 Las 57 pacientes restantes sirvieron como “conjunto de validación” y comprendían 13 pacientes que desarrollaron metástasis más tarde, mientras que las demás pacientes permanecieron libres de tumor. Se utilizó el “conjunto de validación” para tratar dos cuestiones con respecto a genes candidatos que se habían identificado en el “conjunto de selección” de tumores: (i) ¿mostraron los tumores primarios de pacientes que más tarde desarrollaron metástasis una mayor expresión de un gen candidato que las pacientes sin metástasis? (ii) ¿se identificaron genes candidatos en el “conjunto de selección de tumores”, que estaban asociados con el periodo hasta una recidiva en un análisis multivariante? Se resumen las características de las pacientes en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades del “conjunto de validación” de pacientes con carcinomas endometriales primarios

15 Carcinomas endometriales primarios (n = 57)

	Número evaluado (n = 57)	%	No analizable
Estadio de FIGO			1
Estadio I	35	62,5	
Estadio II	7	12,5	
Estadio III	11	19,6	
Estadio IV	3	5,4	
Grado histológico			2
Estadio I	18	32,7	
Estadio II	23	41,8	
Estadio III	14	25,5	
Profundidad de invasión ¹			0
baja	21	36,8	
alta	36	63,2	
Metástasis ²			2
No	42	76,4	
Sí	13	23,6	
Estado menopáusico			0
pre	6	10,5	
post	51	89,5	
Edad en la cirugía (años, promedio ± desviación estándar)	68,5 ± 11,5		
Altura (cm, promedio ± desviación estándar)	163 ± 5,2		
Peso (kg, promedio ± desviación estándar)	79,5 ± 16,9		

¹Se clasificó la profundidad de invasión como baja (infiltración de como máximo el tercio interno del miometrio) y alta (infiltración de los tercios central y externo del miometrio).

²Metástasis: tras haberse extirpado el tumor primario mediante cirugía convencional (histerectomía abdominal y ovariopalingectomía bilateral), se distinguieron dos clases: (i) “sin metástasis”, si la paciente permaneció libre de tumor, (ii) “metástasis”, si se encontró un crecimiento tumoral renovado en cualquiera de los siguientes sitios: ganglios linfáticos paraaórticos, pelvis, huesos, pulmón, hígado o vagina.

Ejemplo 2: Presentación diferencial

- 20 Se aisló ARN de tejido congelado utilizando un kit disponible comercialmente (MidiKit, Qiagen, Hilden, Alemania). Se evaluó la calidad del ARN aislado por medio de la razón de las bandas de 28S y 18S en un gel de agarosa al 1% y por medio de la expresión del gen de huPO constitutivo, tal como se describió anteriormente (Mohrmann G *et al.*, *Int. J. Cancer*, en impresión, 2005). Se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones del ARN aislado. Se llevó a cabo transcripción inversa utilizando el kit de presentación diferencial DeltaTM (Clontech, Heidelberg,

Alemania). Se obtuvo la amplificación utilizando los cebadores P y T representados a continuación (Arbitrary Primer, Clontech, Heidelberg, Alemania):

Cebadores P

5
 P 1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
 P 2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'
 P 3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
 P 4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
 10
 P 5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
 P 6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
 P 7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
 P 8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
 P 9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
 15
 P 10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

Cebadores T

20
 T 1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA-3'
 T 2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC-3'
 T 3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAG-3'
 T 4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCA-3'
 T 5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC-3'
 T 6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCG-3'
 25
 T 7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA-3'
 T 8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC-3'
 T 9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG-3'

30
 Se fraccionaron los productos de la primera amplificación en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 8% y se visualizaron mediante tinción con plata utilizando el kit de tinción con plata rápida (ICN Biomedicals, Ohio, EE.UU.). Se cortaron las bandas que eran visibles en muestras de pacientes con metástasis pero que estaban ausentes en muestras de pacientes con tumores no metastásicos, y se purificó el ADN utilizando el kit QiaExII (Qiagen, Hilden, Alemania). Para preparar suficiente ADN para la secuenciación, se amplificó de nuevo el producto purificado con la ayuda de los mismos cebadores utilizados para la identificación. Tras la purificación por medio de columnas QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania), se determinó la secuencia de ADN mediante secuenciación cíclica.

35
 Un estudio de presentación diferencial del "conjunto de selección de tumores" dio como resultado la identificación de tres transcritos, concretamente EDI-1, EDI-2 y EDI-3, que estaban presentes en tumores que formaban metástasis, pero no se expresaban en carcinomas endometriales no metastásicos.

40
 Se encontró EDI-1 por medio de los cebadores de Clontech P 3 y T 3 y presentaba una longitud de 260 pb en el gel de poliacrilamida. Tras una nueva amplificación, purificación y secuenciación con la ayuda del cebador P 3, se obtuvo la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1.

45
 Se encontró EDI-2 por medio de los cebadores de Clontech P 2 y T 5 y presentaba una longitud de 190 pb en el gel de poliacrilamida. Tras una nueva amplificación, purificación y secuenciación con la ayuda del cebador de Clontech P 2, se obtuvo la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 2.

50
 Se obtuvo EDI-3 por medio de los cebadores de Clontech P 3 y T 3 y presentaba una longitud de 270 pb en el gel de poliacrilamida. Tras una nueva amplificación, purificación y secuenciación con la ayuda del cebador de Clontech P 3, se obtuvo la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3.

55
 El fragmento de ácido nucleico de EDI-3 secuenciado presenta homología con un transcrito no caracterizado aún funcionalmente de 5444 pb (número de registro AL109935.39.1.178601, SEQ ID NO: 7) que contiene un marco de lectura abierto predicho de 2016 pb. Según la información de la base de datos, el gen correspondiente consiste en 20 exones y está ubicado en el brazo corto del cromosoma 20 en la banda de p13. El análisis de transferencia de tipo Northern confirmó el tamaño de transcrito esperado (figura 1).

Ejemplo 3: RT-PCR cuantitativa

60
 Se llevó a cabo un análisis de TaqMan tal como se describió recientemente (Mohrmann G *et al.*, Int. J. Cancer, en impresión, 2005). Brevemente, se aisló ARN total de tejido tumoral utilizando el minikit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm. Se utilizaron 2 µg de ARN total para una mezcla básica de síntesis de ADNc que contenía 2,5 µl de transcriptasa inversa MultiScribe (50 U/µl, Applied Biosystems), 10 µl de tampón RT, 22 µl de MgCl₂ 25 mM, 20 µl de mezcla de dNTP (Applied Biosystems), 2 µl de inhibidor de ARNasa (20 U/µl, Applied Biosystems), 5 µl de hexámeros aleatorios (50 µM, Applied Biosystems) en un volumen

total de 100 µl. Se incubó la mezcla a 25°C durante 2 minutos, a 48°C durante 30 minutos, y se inactivó la enzima a 95°C durante 5 minutos. Se diluyeron todos los ADNc añadiendo 150 µl de agua tratada con DEPC y se almacenaron a -20°C. Para un análisis de PCR cuantitativa se utilizó la tecnología de PCR Taq-Man™ (sistema de detección de secuencias Gene Amp 5700, ABI, Weiterstadt, Alemania). Se llevó a cabo una PCR en un volumen de 25 µl con 12,5 µl de mezcla maestra de PCR SYBR GREEN (que incluye tampón de enzima, colorante fluorescente y nucleótidos, Applied Biosystems), 5 µM de cada cebador (2,5 µl, 10 mM), 2,5 µl de agua tratada con DEPC y 5 µl de molde de ADNc. Se utilizaron dos pares de cebadores para el análisis de EDI-3: (i) 5'-TTTCA AAATG CTGCA GGGTA AT-3' y 5'-ACCCA CAAAG CAACA GTGTG TA-3', (ii) 5'-CACAA TCTGC TTCTA ATCCA AGAA-3' y 5'-TGCTT TGTGG GTTTG TTTT TA-3'. La PCR comprendía preincubación a 50°C durante 2 minutos, seguida por desnaturalización a 95°C durante 10 minutos. Se llevaron a cabo 40 ciclos, incluyendo desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación a 60°C durante 60 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos. La reacción estuvo seguida por el protocolo de disociación, mediante el cual se estudió el intervalo entre 60 y 94°C. Se midieron los intervalos de emisión del colorante fluorescente en tiempo real durante la PCR, y se obtuvieron valores relativos de cuantificación de ARNm a partir del número de ciclos umbral a partir del cual podía detectarse el aumento en la señal asociada con el crecimiento exponencial del producto de PCR. Se utilizó software de sistema de detección de secuencias, versión 1.6 (ABI, Weiterstadt, Alemania). Se normalizó la cuantificación mediante el gen de huPO (fosfoproteína humana) constitutivo según Vlachtsis *et al.* (Vlachtsis K *et al.*, *Oncol Rep.* 9: 1133-8, 2002). Se incluyó un control negativo sin transcriptasa inversa en todos los análisis de PCR.

Utilizando el “conjunto de validación de carcinomas”, se investigó si era posible confirmar la diferencia con respecto a la expresión de EDI-3, hallada en el “conjunto de selección de tumores”. Una RT-PCR cuantitativa indicó una expresión elevada de EDI-3 en un factor de 6,4 en carcinomas endometriales metastásicos en comparación con carcinomas endometriales no metastásicos ($p < 0,001$, figura 2). Se obtuvieron resultados similares en un estudio independiente de la misma especie de ARN utilizando un segundo par de cebadores (figuras 3 y 4).

Ejemplo 4: La expresión de EDI-3 indica supervivencia libre de recidiva

Si la expresión de EDI-3 está asociada con una formación de metástasis, podría suponerse que EDI-3 fuese un indicador de la ausencia de recidiva. La expresión de EDI-3 (dicotomizada en el percentil del 75%) estaba asociada en efecto con una supervivencia libre de recidiva (figura 5). El intervalo de tiempo promedio hasta una recidiva era de 1,47 años en el caso de pacientes que expresaban grandes cantidades de EDI-3. En cambio, el 79% de pacientes con baja expresión de EDI-3 estuvieron libres de tumor 5 años tras la cirugía ($p = 0,0023$). Utilizando el modelo de los riesgos proporcionales, EDI-3 era significativo en un análisis univariante ($RR = 4,3$, $P = 0,002$), y en un análisis de regresión ascendente multivariante con el estadio de FIGO (I, II frente a III, IV), una edad de más de 70 años, diabetes mellitus (s/n), determinación del grado (1, 2 frente a 3) y la profundidad de invasión en el miometrio (0-2 mm frente a +3 mm) como covariables ($RR = 3,6$, $P = 0,012$). Sólo la expresión de EDI-3 y el estadio de FIGO eran pronósticos en un análisis multivariante (tabla 2).

Tabla 2: Asociación de la expresión de EDI-3 con la supervivencia libre de tumor en 57 pacientes con cáncer primario del endometrio (“conjunto de validación de tumores”), utilizando el modelo de riesgos proporcionales univariante y multivariante (análisis de Cox)

<u>Análisis univariante</u>			
Factor	Riesgo relativo	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
ARNm de EDI-3	4,3	1,7-11,0	0,002
<u>Análisis multivariante</u>			
Ajustado al estadio de FIGO (I, II frente a III, IV), determinación de estado (1, 2 frente a 3), profundidad de invasión (0-2 mm frente a +3 mm), edad (menos frente a más de 70 años) y diabetes mellitus			
Factor	Riesgo relativo	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
ARNm de EDI-3	3,6	1,3-9,7	0,012
(estadio de FIGO (estadio I, II frente a III, IV)	5,1	1,8-14,0	0,002

Un ajuste con respecto al estadio de FIGO podría ser problemático debido a una posible violación de la suposición de riesgos proporcionales en la que se basa el modelo de Cox, y el pequeño tamaño de muestra. Sin embargo, el efecto de EDI-3 sigue siendo significativo, si se incluye el estadio de FIGO como factor en el modelo de Cox ($p = 0,012$), así como si se utiliza el estadio de FIGO para estratificación, suponiendo funciones de riesgo diferentes para una enfermedad limitada (FIGO I, II) y avanzada (FIGO III, IV) ($p < 0,001$, figura 6). Para someter a prueba la reproducibilidad de la RT-PCR cuantitativa, se estudió adicionalmente la misma especie de ARNm utilizando un segundo par de cebadores dirigidos a una región del transcrito EDI-3 ubicada más en el sentido de 3'. Los datos obtenidos con el segundo par de cebadores coincidían con los del primer par de cebadores ($p < 0,001$, $R = 0,824$) y confirmaron una relación entre la expresión de EDI-3 y una supervivencia libre de recidiva (tabla 3, figura 7).

Tabla 3: Experimento de confirmación utilizando un segundo par de cebadores para cuantificar la expresión de ARNm de EDI-3. De manera similar a los resultados obtenidos con el primer par de cebadores, la expresión del transcrito EDI-3 estaba asociada con la supervivencia libre de tumor en 57 pacientes con cáncer primario del endometrio ("conjunto de validación de tumores"), utilizando el modelo de riesgos proporcionales univariante y multivariante (análisis de Cox)

5

Análisis univariante

Factor	Riesgo relativo	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
ARNm de EDI-3	7,9	3,0-21,3	< 0,001

Análisis multivariante

Ajustado al estadio de FIGO (I, II frente a III, IV), determinación de estado (1, 2 frente a 3), profundidad de invasión (0-2 mm frente a +3 mm), edad (menos frente a más de 70 años) y diabetes mellitus

Factor	Riesgo relativo	Intervalo de confianza del 95%	Valor de p
ARNm de EDI-3	7,3	2,7-19,9	< 0,001

Lista de secuencias

10 <110> Johannes Gutenberg-Universidad de Maguncia, representada por el presidente, *et al.*

<120> Marcadores moleculares para el diagnóstico y el tratamiento de tumores

<130> 410-3 PCT

15

<150> Documento DE 10 2005 059 242.2

<151> 12-12-2005

<160> 31

20

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 162

25

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (5)..(5)

<223> incierta

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (8)..(8)

<223> incierta

<220>

<221> misc_feature

40

<222> (17)..(17)

<223> incierta

<220>

<221> misc_feature

45

<222> (20)..(20)

<223> incierta

<220>

<221> misc_feature

50

<222> (25)..(25)

<223> incierta

<220>

<221> misc_feature

55

<222> (26)..(26)

<223> incierta

ES 2 407 113 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 5 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (36)..(36)
 10 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 15 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(46)
 20 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)..(50)
 25 <223> incierta

<400> 1

ttaanccnct ttttatnccn ttaannaana aaatantttc agtncntcan gagctgggaa	60
actgtatcca ggatgtactc aaacacatgt ttacatattg tctaccgagc ttcaggctga	120
attagtaata gcttactgcc aaaaggataa tatttatgac ca	162

30 <210> 2
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> incierta

40 <400> 2
 cccttctccc tgcactcaat aaaccctcan taatatattct cattgtcaat c 51

45 <210> 3
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> incierta

<400> 3

tgcanactta gtagaataga tcacaacata caaattcaat tcagtgcacg ctttaggtgt	60
taagcatgag attgtacatg tttactgtta ggtccttgca tctgtggtgc taggtgagta	120
tgagaagatg tcaaggactg gacgtatttt tgttgc	156

55 <210> 4
 <211> 126
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 5 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 10 <223> incierta

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 15 <223> incierta

<400> 4

tttcagtn cn tcangagctg ggaaactgta tccaggatgt actcaaacac atgtttacat	60
attgtctacc gagcttcagg ctgaattagt aatagcttac tgccaaaagg ataatatatta	120
tgacca	126

20 <210> 5
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 5

acatattgtc taccgagctt caggctgaat tagtaatagc ttactgccaa aaggataata	60
tttatgacca	70

30 <210> 6
 <211> 145
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

acttagtaga atagatcaca acatacaaat tcaattcagt gcatgcttta ggtgtaagc	60
atgagattgt acatgtttac tgttaggctc ttgcatctgt ggtgctaggt gagtatgaga	120
agatgtcaag gactggacgt atttt	145

35 <210> 7
 <211> 5444
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> CDS
 <222> (206)..(2224)
 <223>

45 <400> 7

ctggagcagc tgaaaccggt ttgagcgtgg ctgcttcctg ccgctcgacg ccgcggcagg	60
ccgcctgggg ggagcgtgg cgaggcacgg acggcgggcg cccggtacct ctgcccgcgg	120
tcctcgctct cgggcggggc ggcggcgacg cggacctgcg gactagcga cccggagcac	180
gacatcataa aataaatcca tcaga atg aca cct tct cag gtt gcc ttt gaa	232
	Met Thr Pro Ser Gln Val Ala Phe Glu
	1 5

ES 2 407 113 T3

ata aga gga act ctt tta cca gga gaa gtt ttt gcg ata tgt gga agc Ile Arg Gly Thr Leu Leu Pro Gly Glu Val Phe Ala Ile Cys Gly Ser 10 15 20 25	280
tgt gat gct ttg gga aac tgg aat cct caa aat gct gtg gct ctt ctt Cys Asp Ala Leu Gly Asn Trp Asn Pro Gln Asn Ala Val Ala Leu Leu 30 35 40	328
cca gag aat gac aca ggt gaa agc atg cta tgg aaa gca acc att gta Pro Glu Asn Asp Thr Gly Glu Ser Met 50 Leu Trp Lys Ala Thr Ile Val 45 55	376
ctc agt aga gga gta tca gtt cag tat cgc tac ttc aaa ggg tac ttt Leu Ser Arg Gly Val Ser Val Gln Tyr Arg Tyr Phe Lys Gly Tyr Phe 60 65 70	424
tta gaa cca aag act atc ggt ggt cca tgt caa gtg ata gtt cac aag Leu Glu Pro Lys Thr Ile Gly Gly Pro Cys Gln Val Ile Val His Lys 75 80 85	472
tgg gag act cat cta caa cca cga tca ata acc cct tta gaa agc gaa Trp Glu Thr His Leu Gln Pro Arg Ser Ile Thr Pro Leu Glu Ser Glu 90 95 100 105	520
att att att gac gat gga caa ttt gga atc cac aat ggt gtt gaa act Ile Ile Ile Asp Gly Gln Phe Gly Ile His Asn Gly Val Glu Thr 110 115 120	568
ctg gat tct gga tgg ctg aca tgt cag act gaa ata aga tta cgt ttg Leu Asp Ser Gly Trp Leu Thr Cys Gln Thr Glu Ile Arg Leu Arg Leu 125 130 135	616
cat tat tct gaa aaa cct cct gtg tca ata acc aag aaa aaa tta aaa His Tyr Ser Glu Lys Pro Pro Val Ser Ile Thr Lys Lys Lys Leu Lys 140 145 150	664
aaa tct aga ttt agg gtg aag ctg aca cta gaa ggc ctg gag gaa gat Lys Ser Arg Phe Arg Val Lys Leu Thr Leu Glu Gly Leu Glu Glu Asp 155 160 165	712
gac gat gat agg gta tct ccc act gta ctc cac aaa atg tcc aat agc Asp Asp Asp Arg Val Ser Pro Thr Val Leu His Lys Met Ser Asn Ser 170 175 180 185	760
ttg gag ata tcc tta ata agc gac aat gag ttc aag tgc agg cat tca Leu Glu Ile Ser Leu Ile Ser Asp Asn Glu Phe Lys Cys Arg His Ser 190 195 200	808
cag ccg gag tgt ggt tat ggc ttg cag cct gat cgt tgg aca gag tac Gln Pro Glu Cys Gly Tyr Gly Leu Gln Pro Asp Arg Trp Thr Glu Tyr 205 210 215	856
agc ata cag acg atg gaa cca gat aac ctg gaa cta atc ttt gat ttt Ser Ile Gln Thr Met Glu Pro Asp Asn Leu Glu Leu Ile Phe Asp Phe 220 225 230	904
ttc gaa gaa gat ctc agt gag cac gta gtt cag ggt gat gcc ctt cct Phe Glu Glu Asp Leu Ser Glu His Val Val Gln Gly Asp Ala Leu Pro 235 240 245	952
gga cat gtg ggt aca gct tgt ctc tta tca tcc acc att gct gag agt Gly His Val Gly Thr Ala Cys Leu Leu Ser Ser Thr Ile Ala Glu Ser 250 255 260 265	1000
gga aag agt gct gga att ctt act ctt ccc atc atg agc aga aat tcc Gly Lys Ser Ala Gly Ile Leu Thr Leu Pro Ile Met Ser Arg Asn Ser 270 275 280	1048

ES 2 407 113 T3

cgg	aaa	aca	ata	ggc	aaa	gtg	aga	gtt	gac	tat	ata	att	att	aag	cca	1096
Arg	Lys	Thr	Ile	Gly	Lys	Val	Arg	Val	Asp	Tyr	Ile	Ile	Ile	Lys	Pro	
			285					290					295			
tta	cca	gga	tac	agt	tgt	gac	atg	aaa	tct	tca	ttt	tcc	aag	tat	tgg	1144
Leu	Pro	Gly	Tyr	Ser	Cys	Asp	Met	Lys	Ser	Ser	Phe	Ser	Lys	Tyr	Trp	
		300					305					310				
aag	cca	aga	ata	cca	ttg	gat	ggt	ggc	cat	cga	ggt	gca	gga	aac	tct	1192
Lys	Pro	Arg	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Gly	His	Arg	Gly	Ala	Gly	Asn	Ser	
	315					320					325					
aca	aca	act	gcc	cag	ctg	gct	aaa	gtt	caa	gaa	aat	act	att	gct	tct	1240
Thr	Thr	Thr	Ala	Gln	Leu	Ala	Lys	Val	Gln	Glu	Asn	Thr	Ile	Ala	Ser	
					335					340					345	
tta	aga	aat	gct	gct	agt	cat	ggt	gca	gcc	ttt	gta	gaa	ttt	gac	gta	1288
Leu	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser	His	Gly	Ala	Ala	Phe	Val	Glu	Phe	Asp	Val	
			350					355						360		
cac	ctt	tca	aag	gac	ttt	gtg	ccc	gtg	gta	tat	cat	gat	ctt	acc	tgt	1336
His	Leu	Ser	Lys	Asp	Phe	Val	Pro	Val	Val	Tyr	His	Asp	Leu	Thr	Cys	
			365					370					375			
tgt	ttg	act	atg	aaa	aag	aaa	ttt	gat	gct	gat	cca	ggt	gaa	tta	ttt	1384
Cys	Leu	Thr	Met	Lys	Lys	Lys	Phe	Asp	Ala	Asp	Pro	Val	Glu	Leu	Phe	
		380					385					390				
gaa	att	cca	gta	aaa	gaa	tta	aca	ttt	gac	caa	ctc	cag	ttg	tta	aag	1432
Glu	Ile	Pro	Val	Lys	Glu	Leu	Thr	Phe	Asp	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Lys	
	395					400					405					
ctc	act	cat	gtg	act	gca	ctg	aaa	tct	aag	gat	cgg	aaa	gaa	tct	gtg	1480
Leu	Thr	His	Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Ser	Lys	Asp	Arg	Lys	Glu	Ser	Val	
	410				415					420					425	
gtt	cag	gag	gaa	aat	tcc	ttt	tca	gaa	aat	cag	cca	ttt	cct	tct	ctt	1528
Val	Gln	Glu	Glu	Asn	Ser	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Pro	Phe	Pro	Ser	Leu	
				430					435					440		
aag	atg	gtt	tta	gag	tct	ttg	cca	gaa	gat	gta	ggg	ttt	aac	att	gaa	1576
Lys	Met	Val	Leu	Glu	Ser	Leu	Pro	Glu	Asp	Val	Gly	Phe	Asn	Ile	Glu	
			445					450					455			
ata	aaa	tgg	atc	tgc	cag	caa	agg	gat	gga	atg	tgg	gat	ggt	aac	tta	1624
Ile	Lys	Trp	Ile	Cys	Gln	Gln	Arg	Asp	Gly	Met	Trp	Asp	Gly	Asn	Leu	
		460					465					470				
tca	aca	tat	ttt	gac	atg	aat	ctg	ttt	ttg	gat	ata	att	tta	aaa	act	1672
Ser	Thr	Tyr	Phe	Asp	Met	Asn	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Leu	Lys	Thr	
	475					480					485					
gtt	tta	gaa	aat	tct	ggg	aag	agg	aga	ata	gtg	ttt	tct	tca	ttt	gat	1720
Val	Leu	Glu	Asn	Ser	Gly	Lys	Arg	Arg	Ile	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	Asp	
	490				495				500						505	
gca	gat	att	tgc	aca	atg	ggt	cgg	caa	aag	cag	aac	aaa	tat	ccg	ata	1768
Ala	Asp	Ile	Cys	Thr	Met	Val	Arg	Gln	Lys	Gln	Asn	Lys	Tyr	Pro	Ile	
				510					515					520		
cta	ttt	tta	act	caa	gga	aaa	tct	gag	att	tat	cct	gaa	ctc	atg	gac	1816
Leu	Phe	Leu	Thr	Gln	Gly	Lys	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Glu	Leu	Met	Asp	
			525					530					535			
ctc	aga	tct	cgg	aca	acc	ccc	att	gca	atg	agc	ttt	gca	cag	ttt	gaa	1864
Leu	Arg	Ser	Arg	Thr	Thr	Pro	Ile	Ala	Met	Ser	Phe	Ala	Gln	Phe	Glu	
		540					545					550				

ES 2 407 113 T3

aat cta ctg ggg ata aat gta cat act gaa gac ttg ctc aga aac cca 1912
 Asn Leu Leu Gly Ile Asn Val His Thr Glu Asp Leu Leu Arg Asn Pro
 555 560 565
 tcc tat att caa gag gca aaa gct aag gga cta gtc ata ttc tgc tgg 1960
 Ser Tyr Ile Gln Glu Ala Lys Ala Lys Gly Leu Val Ile Phe Cys Trp
 570 575 580
 ggt gat gat acc aat gat cct gaa aac aga agg aaa ttg aag gaa ctt 2008
 Gly Asp Asp Thr Asn Asp Pro Glu Asn Arg Arg Lys Leu Lys Glu Leu
 590 595 600
 gga gtt aat ggt cta att tat gat agg ata tat gat tgg atg cct gaa 2056
 Gly Val Asn Gly Leu Ile Tyr Asp Arg Ile Tyr Asp Trp Met Pro Glu
 605 610 615
 caa cca aat ata ttc caa gtg gag caa ttg gaa cgc ctg aag cag gaa 2104
 Gln Pro Asn Ile Phe Gln Val Glu Gln Leu Glu Arg Leu Lys Gln Glu
 620 625 630
 ttg cca gag ctt aag agc tgt ttg tgt ccc act gtt agc cgc ttt gtt 2152
 Leu Pro Glu Leu Lys Ser Cys Leu Cys Pro Thr Val Ser Arg Phe Val
 635 640 645
 ccc tca tct ttg tgt ggg gag tct gat atc cat gtg gat gcc aac ggc 2200
 Pro Ser Ser Leu Cys Gly Glu Ser Asp Ile His Val Asp Ala Asn Gly
 650 655 660 665
 att gat aac gtg gag aat gct tag tttttattgc acagagggtca ttttgggggc 2254
 Ile Asp Asn Val Glu Asn Ala
 670
 gtgcaccgct gttctgggta ttcatttttc atcactgagc attggtgac tatgcctttt 2314
 gggctttctca gttcaatgaa gcaataatga agtatttaac tctttcacta cagttcttgc 2374
 aagtatgcta tttaaattac ttggccagggt ataattgcca gtcagtctct ttatagtgag 2434
 aaaattttatt ggtagtaat ataaatattt taaactaaat atataaatct ataattgtaa 2494
 acatatgttc attaaaagca tagcactttg aaattaacta tataaatagc tcatatttac 2554
 acttacagct tttcatttga tcagggtctga aatcttttagc acttaaggaa aatgactatg 2614
 cataattata cctgaccatg aaaaaataa gtacctcaa tgcatgcatt tgcactggtg 2674
 attccaactg cacaaatctt tgtgccatct tgtatatagg tattttttac atggggtgac 2734
 atgcacacaa caccattttc attcagtatg aaccttgagg ctgctgccat tttccactt 2794
 aaccaaacca gcctgaagggt gaacctcgaa acttgtttca taaatctttc aaaagttggt 2854
 ttacatcaat gttaaaattt caaaatgctg cagggtaatt taatgtataa aatattagta 2914
 agaaaaagta tgtattgcat acttagtaga atagatcaca acatacaaat tcaattcagt 2974
 gcatgcttta ggtgtaagc atgagattgt acatgtttac tgttaggtcc ttgcatctgt 3034
 ggtgctagggt gagtatgaga agatgtcaag gactggacgt attttggtgc ctaaaaaaaa 3094
 aaggctgttt gtaggcgttt taaatatgct tttttgtgt gtctctcact acctattaca 3154
 cactgttgct ttgtgggttt gttttgtatg tgcgtgtgtt atacagtagt taaatttcca 3214
 tgcagaaaaa taaatgctct gaattttcat attagttatc tttattgtat atcatgcatg 3274
 taattttatt agaaatgtag gtcttactaa atgtatatgc atgtatttca gattatacta 3334

ES 2 407 113 T3

ggatttcttg gattagaagc agatttggtt aactgtaact taaagaatga atgttaaata 3394
 aaatgataca gatttatttt ctccattaca aaatgaaatt tcaagaaggt gttacttttg 3454
 tagaatgggt ttataatatg acaagaaatt ttaatatagt gtctacccta aagggatggc 3514
 ttatttgcac ctacctttta ctgcatgttt ttcacaaggc agtttattca tatattgaca 3574
 tattttggta gtagctgaga acctaagact tgaattata cattgtgtag tattttttaa 3634
 gctaagcaat gcaattttgg tcagatctta tttgtgtgaa gataggctct gaaatcctat 3694
 ggtattgctt ttgtaacggt gatattaatg caaaatagtt taggaaatgg agtcttctgc 3754
 aagggttctg tataactttc ccacattgta tgagattttc caaaattttg gtgtgaattg 3814
 ggcacttttg gaaaactcct gaaaaagaat tagtttcctt catctgcaga cctttgtcca 3874
 atacggttac ctttcttta tagtaactcg attagccata tatgtttggt tctagtctcg 3934
 ctcttttgct cctctctat gccttcccag tgctggctcc attttgaaga ctcaaggaca 3994
 gaggggaagc agatcataaa gagaaaaagg agacagaaga aaggatgaag gaaggaggtc 4054
 atggggagtg tggcttctga gcagtttagt tgctggggag agcagacagt cactgcctac 4114
 aatacagaca gaaccttctt gctcactttc tgcctatct ctctctgacc ttatgaacca 4174
 gtgttagtag atgattaaaa catgacaagc aatggctcct tattttcaca ggactaagtc 4234
 cgggccttcg tatcactagc tgttgccctt tacaccctgc ttcagccacc ctgtccctgt 4294
 cattggccct ggacttcttc tctgtgcccg tgtgtcctct gcctgggagc cctctcctcc 4354
 catagtcact ttctctctgc caaactcatt tcttcttggt cccaagacct ctctctgag 4414
 ccttctgga aacttcagga aggatgaatc cgtctttgtg ctccacggct cgtaccttga 4474
 tcaggctgtg catcacagta attctgttct aggtaggcag agttgatctt tgtctcatct 4534
 gccaggctgc aggccttca agggcagga ccttgtcata gtcaattttta ttttcacagt 4594
 gcttggaaaca tgggtgaaaa tgaatgttg aattattgga gtaataaat ttgtatcaaa 4654
 tgtccttttg aattaagaga tttagttatg tttactaaga atgtaactt tgaattggtt 4714
 tgcattttaa caattaggat ggtttattga tgtgaatttt gaaatgtaga ggtataatgt 4774
 taaattattt tatactttat ggaaatcaag tgaatgttt gaaaaaatgc cgccattatc 4834
 ctctggattt ttctactctc tggaaattatg tgctgtaaat gatcggctgt aaatgtgagg 4894
 cacaccacce accctgtgtt ggaaagtgtt gtggcgcttc ctgccacca cccacctctc 4954
 tgccgttgct ccttgtgaca cttgtctgtc gtctccatc caaactcaa gcttacagct 5014
 acctcagtac tgctttgctt gtctgaaaca cctcctttgc ctctctcag tgtcccgtct 5074
 aggtgcagcc tcttccctaa agctcatctc agcttttgat ctgaatgatg atggaaacat 5134
 gcagacagcc tctcagctct actatttaat gttgtagctg ggaaaaaacc cagagaggtt 5194
 aactgatata ctgggttggg actaggatgt gggttttgtg actctgaatc ccatgttctc 5254
 aaactacgct gccttccgaa gtctggcatt tgttagctca tgcctccttg tagtccagct 5314
 tcttatgtgc ctgttatatt ctccagtaag attgtaagcc ccttaagggc agggacgtct 5374
 ttgcatctct agcactgcta tagtgttcta tcttagtta tgaactagat aaataaatgg 5434
 tggtggcaac 5444

- <210> 8
- 5 <211> 672
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 8

ES 2 407 113 T3

Met Thr Pro Ser Gln Val Ala Phe Glu Ile Arg Gly Thr Leu Leu Pro
1 5 10 15

Gly Glu Val Phe Ala Ile Cys Gly Ser Cys Asp Ala Leu Gly Asn Trp
20 25 30

Asn Pro Gln Asn Ala Val Ala Leu Leu Pro Glu Asn Asp Thr Gly Glu
35 40 45

Ser Met Leu Trp Lys Ala Thr Ile Val Leu Ser Arg Gly Val Ser Val
50 55 60

Gln Tyr Arg Tyr Phe Lys Gly Tyr Phe Leu Glu Pro Lys Thr Ile Gly
65 70 75 80

Gly Pro Cys Gln Val Ile Val His Lys Trp Glu Thr His Leu Gln Pro
85 90 95

Arg Ser Ile Thr Pro Leu Glu Ser Glu Ile Ile Ile Asp Asp Gly Gln
100 105 110

Phe Gly Ile His Asn Gly Val Glu Thr Leu Asp Ser Gly Trp Leu Thr
115 120 125

Cys Gln Thr Glu Ile Arg Leu Arg Leu His Tyr Ser Glu Lys Pro Pro
130 135 140

Val Ser Ile Thr Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ser Arg Phe Arg Val Lys
145 150 155 160

Leu Thr Leu Glu Gly Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg Val Ser Pro
165 170 175

Thr Val Leu His Lys Met Ser Asn Ser Leu Glu Ile Ser Leu Ile Ser
180 185 190

Asp Asn Glu Phe Lys Cys Arg His Ser Gln Pro Glu Cys Gly Tyr Gly
195 200 205

Leu Gln Pro Asp Arg Trp Thr Glu Tyr Ser Ile Gln Thr Met Glu Pro
210 215 220

ES 2 407 113 T3

Asp Asn Leu Glu Leu Ile Phe Asp Phe Phe Glu Glu Asp Leu Ser Glu
 225 230 235 240

His Val Val Gln Gly Asp Ala Leu Pro Gly His Val Gly Thr Ala Cys
 245 250 255

Leu Leu Ser Ser Thr Ile Ala Glu Ser Gly Lys Ser Ala Gly Ile Leu
 260 265 270

Thr Leu Pro Ile Met Ser Arg Asn Ser Arg Lys Thr Ile Gly Lys Val
 275 280 285

Arg Val Asp Tyr Ile Ile Ile Lys Pro Leu Pro Gly Tyr Ser Cys Asp
 290 295 300

Met Lys Ser Ser Phe Ser Lys Tyr Trp Lys Pro Arg Ile Pro Leu Asp
 305 310 315 320

Val Gly His Arg Gly Ala Gly Asn Ser Thr Thr Thr Ala Gln Leu Ala
 325 330 335

Lys Val Gln Glu Asn Thr Ile Ala Ser Leu Arg Asn Ala Ala Ser His
 340 345 350

Gly Ala Ala Phe Val Glu Phe Asp Val His Leu Ser Lys Asp Phe Val
 355 360 365

Pro Val Val Tyr His Asp Leu Thr Cys Cys Leu Thr Met Lys Lys Lys
 370 375 380

Phe Asp Ala Asp Pro Val Glu Leu Phe Glu Ile Pro Val Lys Glu Leu
 385 390 395 400

Thr Phe Asp Gln Leu Gln Leu Leu Lys Leu Thr His Val Thr Ala Leu
 405 410 415

Lys Ser Lys Asp Arg Lys Glu Ser Val Val Gln Glu Glu Asn Ser Phe
 420 425 430

Ser Glu Asn Gln Pro Phe Pro Ser Leu Lys Met Val Leu Glu Ser Leu
 435 440 445

Pro Glu Asp Val Gly Phe Asn Ile Glu Ile Lys Trp Ile Cys Gln Gln
 450 455 460

Arg Asp Gly Met Trp Asp Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Phe Asp Met Asn
 465 470 475 480

Leu Phe Leu Asp Ile Ile Leu Lys Thr Val Leu Glu Asn Ser Gly Lys
 485 490 495

ES 2 407 113 T3

Arg Arg Ile Val Phe Ser Ser Phe Asp Ala Asp Ile Cys Thr Met Val
 500 505 510

Arg Gln Lys Gln Asn Lys Tyr Pro Ile Leu Phe Leu Thr Gln Gly Lys
 515 520 525

Ser Glu Ile Tyr Pro Glu Leu Met Asp Leu Arg Ser Arg Thr Thr Pro
 530 535 540

Ile Ala Met Ser Phe Ala Gln Phe Glu Asn Leu Leu Gly Ile Asn Val
 545 550 555 560

His Thr Glu Asp Leu Leu Arg Asn Pro Ser Tyr Ile Gln Glu Ala Lys
 565 570 575

Ala Lys Gly Leu Val Ile Phe Cys Trp Gly Asp Asp Thr Asn Asp Pro
 580 585 590

Glu Asn Arg Arg Lys Leu Lys Glu Leu Gly Val Asn Gly Leu Ile Tyr
 595 600 605

Asp Arg Ile Tyr Asp Trp Met Pro Glu Gln Pro Asn Ile Phe Gln Val
 610 615 620

Glu Gln Leu Glu Arg Leu Lys Gln Glu Leu Pro Glu Leu Lys Ser Cys
 625 630 635 640

Leu Cys Pro Thr Val Ser Arg Phe Val Pro Ser Ser Leu Cys Gly Glu
 645 650 655

Ser Asp Ile His Val Asp Ala Asn Gly Ile Asp Asn Val Glu Asn Ala
 660 665 670

<210> 9

- 5 <211> 25
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>

- 10 <223> oligonucleótido

<400> 9

attaaccctc actaaatgct gggga

25

- 15 <210> 10
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> oligonucleótido

<400> 10

attaaccctc actaaatcgg tcatag

26

- 25 <210> 11
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> oligonucleótido

ES 2 407 113 T3

	<400> 11 attaaccctc actaaatgct ggtgg	25
5	<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 12 attaaccctc actaaatgct ggtag	25
20	<210> 13 <211> 26 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
30	<400> 13 attaaccctc actaaagatc tgactg	26
35	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 14 attaaccctc actaaatgct gggtg	25
50	<210> 15 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido	
60	<400> 15 attaaccctc actaaatgct gtatg	25
65	<210> 16 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido	
75	<400> 16 attaaccctc actaaatgga gctgg	25
80	<210> 17 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
85	<220> <223> oligonucleótido	

ES 2 407 113 T3

	<400> 17 attaaccctc actaaatgtg gcagg	25
5	<210> 18 <211> 25 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 18 attaaccctc actaaagcac cgtcc	25
20	<210> 19 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
30	<400> 19 cattatgctg agtgatatct tttttttaa	30
35	<210> 20 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 20 cattatgctg agtgatatct tttttttac	30
50	<210> 21 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido	
60	<400> 21 cattatgctg agtgatatct ttttttttag	30
65	<210> 22 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido	
75	<400> 22 cattatgctg agtgatatct tttttttca	30
80	<210> 23 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
85	<220> <223> oligonucleótido	

ES 2 407 113 T3

	<400> 23 cattatgctg agtgatatct tttttttcc	30
5	<210> 24 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 24 cattatgctg agtgatatct tttttttcg	30
20	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
30	<400> 25 cattatgctg agtgatatct tttttttga	30
35	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 26 cattatgctg agtgatatct tttttttgc	30
50	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido	
60	<400> 27 cattatgctg agtgatatct tttttttgg	30
65	<210> 28 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido	
75	<400> 28 tttcaaatg ctgcaggga at	22
80	<210> 29 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
85	<220> <223> oligonucleótido	

ES 2 407 113 T3

	<400> 29 accacaaaag caacagtgtg ta	22
5	<210> 30 <211> 24 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 30 cacaatctgc ttctaatcca agaa	24
20	<210> 31 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
	<400> 31 tgctttgtgg gtttgtttg ta	22

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico y/o monitorización de un tumor endometrial en un paciente, que comprende

- 5 (i) detectar y/o determinar la cantidad de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en:
 - (a) un ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 6 y 7, y una parte de al menos 30 nucleótidos consecutivos de la misma,
 - 10 (b) un ácido nucleico, que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas,
 - (c) un ácido nucleico, que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y
 - 15 (d) un ácido nucleico, que es complementario del ácido nucleico de (a), (b) o (c), y/o
- (ii) detectar y/o determinar la cantidad de una proteína o péptido codificado por el ácido nucleico de (i) o de una parte del mismo,

en una muestra biológica aislada de un paciente, que comprende tejido corporal endometrial,

20 en el que la presencia del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo y/o una cantidad aumentada del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo en comparación con un paciente sin un tumor endometrial, sin riesgo de presentar un tumor endometrial, sin metástasis de un tumor endometrial y/o sin riesgo de presentar metástasis de un tumor endometrial, indica la presencia de un tumor endometrial, riesgo de presentar un tumor endometrial, metástasis de un tumor endometrial y/o riesgo de presentar metástasis de un tumor endometrial.

2. Procedimiento de evaluación y/o pronóstico del comportamiento metastásico y/o la aparición de una recidiva de un tumor endometrial, que comprende

- 30 (i) detectar y/o determinar la cantidad de un ácido nucleico seleccionado de entre el grupo que consiste en:
 - (a) un ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 6 y 7, y una parte de al menos 30 nucleótidos consecutivos de la misma,
 - 35 (b) un ácido nucleico, que se hibrida con el ácido nucleico de (a) en condiciones restrictivas,
 - (c) un ácido nucleico, que es degenerado con respecto al ácido nucleico de (a) o (b), y
 - 40 (d) un ácido nucleico, que es complementario del ácido nucleico de (a), (b) o (c), y/o
- (ii) detectar y/o determinar la cantidad de una proteína o un péptido codificado por el ácido nucleico de (i) o de una parte del mismo,

en una muestra biológica aislada de un paciente que comprende tejido corporal endometrial,

45 en el que la presencia del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo y/o una cantidad aumentada del ácido nucleico, la proteína o el péptido o la parte del mismo en comparación con un paciente sin un tumor endometrial, sin riesgo de presentar un tumor endometrial, sin metástasis de un tumor endometrial, sin riesgo de presentar metástasis de un tumor endometrial, sin una recidiva de un tumor endometrial y/o sin riesgo de presentar una recidiva de un tumor endometrial, indica la presencia de metástasis o recidiva de un tumor endometrial o un riesgo de presentar metástasis o recidiva de un tumor endometrial.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 2, que permite distinguir entre alteraciones benignas y malignas.

55 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la detección y/o determinación de la cantidad comprende

- 60 (i) poner en contacto la muestra biológica con un agente, que se une específicamente al ácido nucleico o a la proteína o al péptido o a la parte del mismo, y
- (ii) detectar la formación de un complejo entre el agente y el ácido nucleico o la proteína o el péptido o la parte del mismo.

65 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que

- (i) el agente, que se une específicamente al ácido nucleico es un oligonucleótido o polinucleótido que se hibrida específicamente con el ácido nucleico, o
 - (ii) el agente, que se une específicamente a la proteína o al péptido o a la parte del mismo es un anticuerpo que se une específicamente a la proteína o al péptido o a la parte del mismo.
- 5
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, en el que la monitorización de un tumor endometrial comprende determinar la regresión, el desarrollo o la aparición del tumor endometrial en una muestra del paciente.
- 10
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tumor endometrial es un tumor endometrial metastásico.

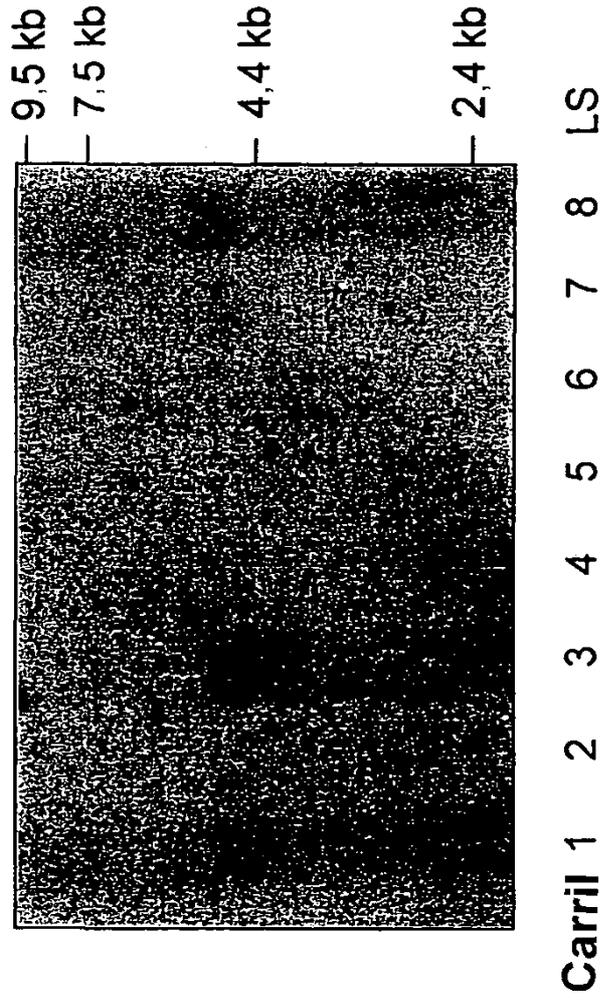


Fig. 1

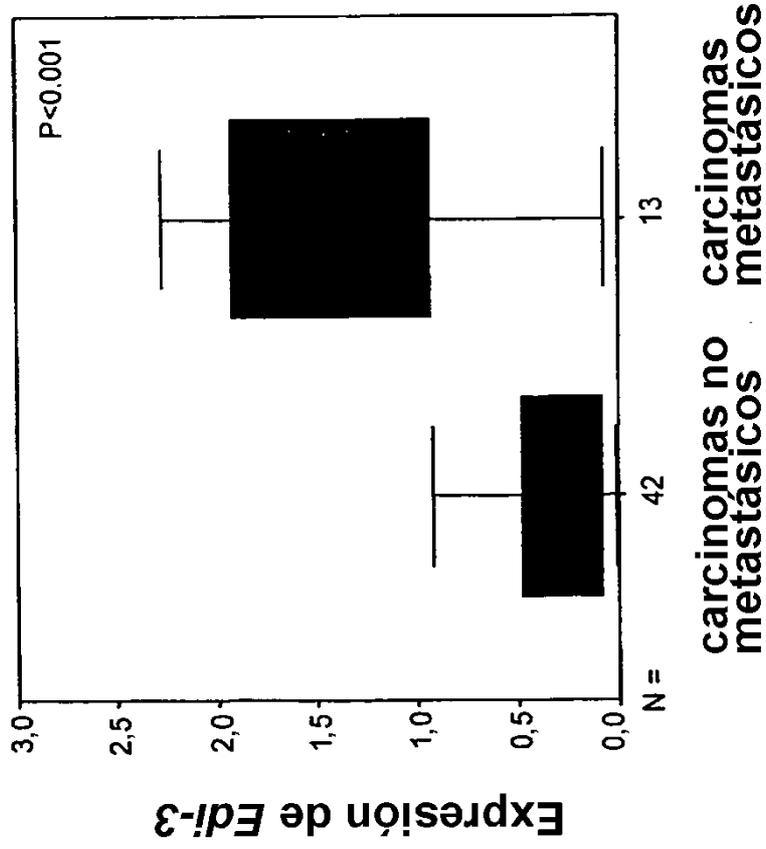


Fig.2

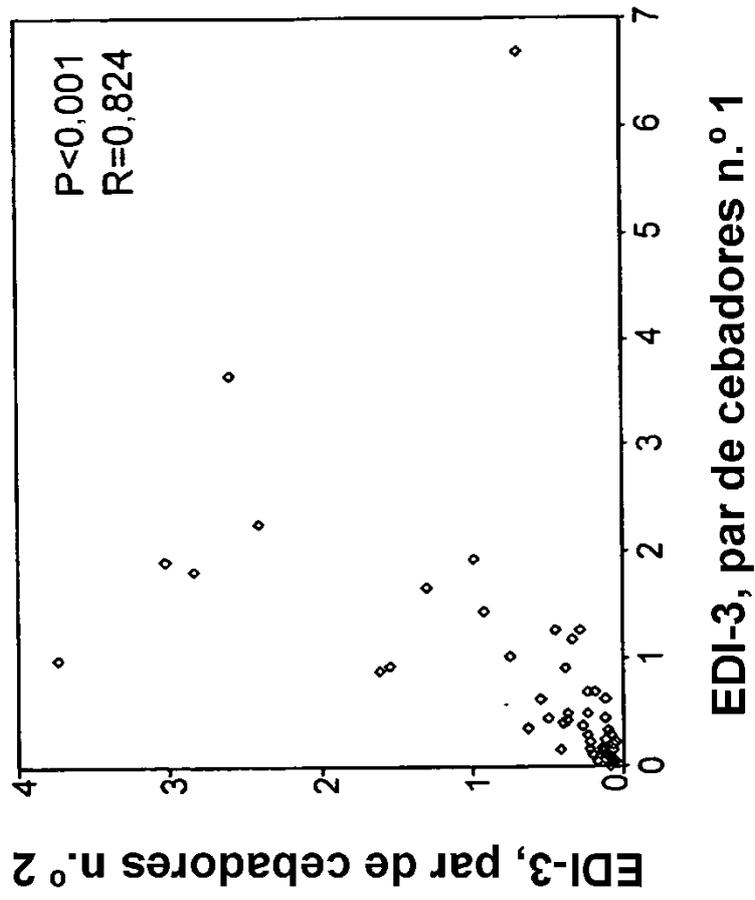


Fig. 3

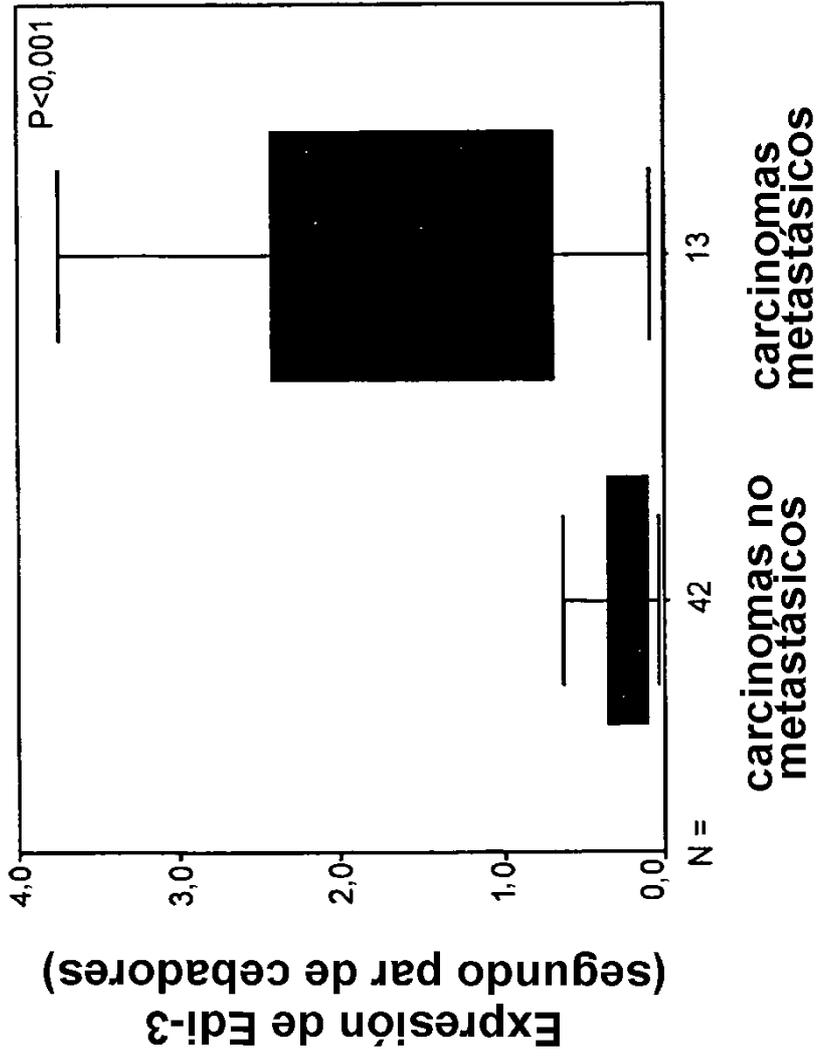


Fig. 4

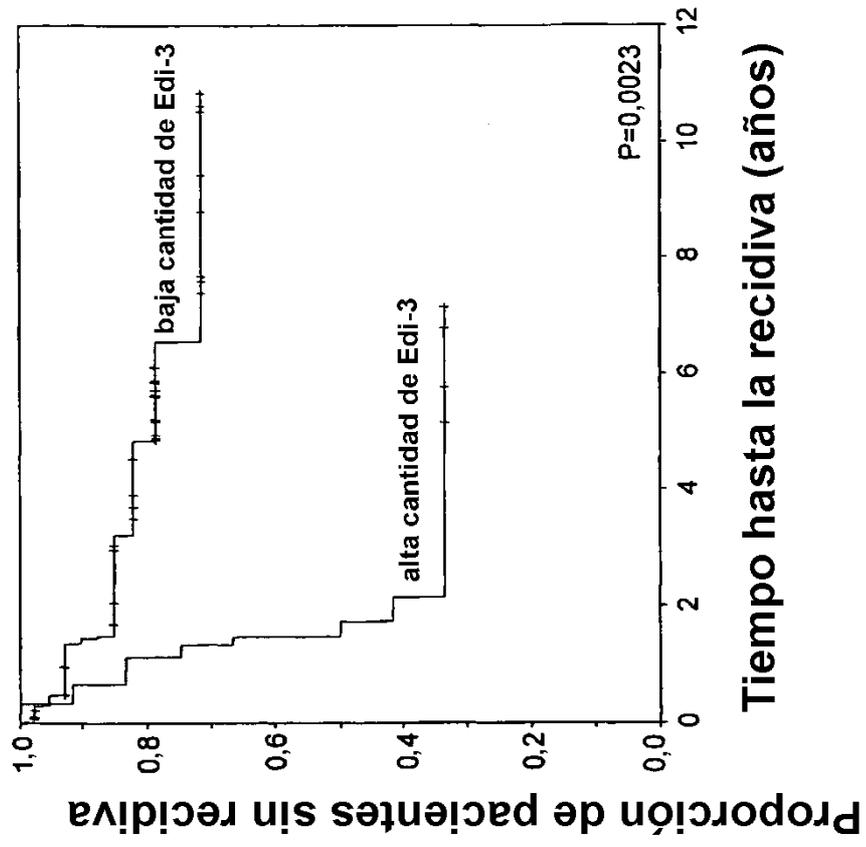


Fig. 5

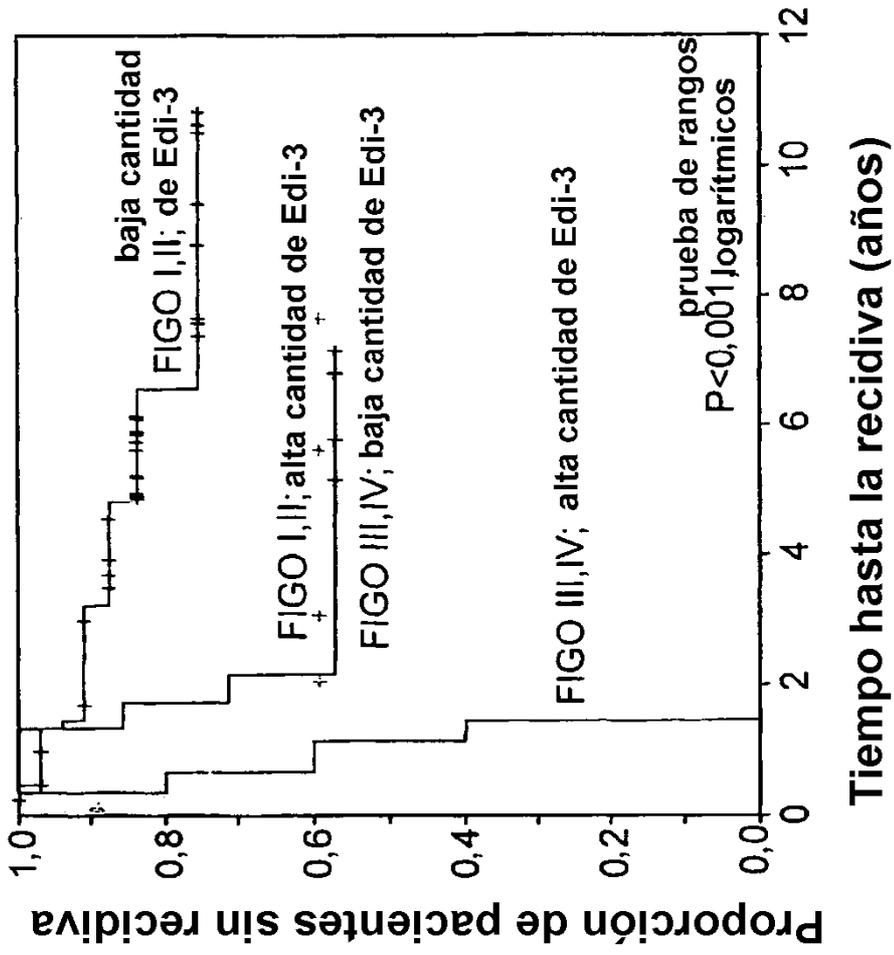


Fig. 6

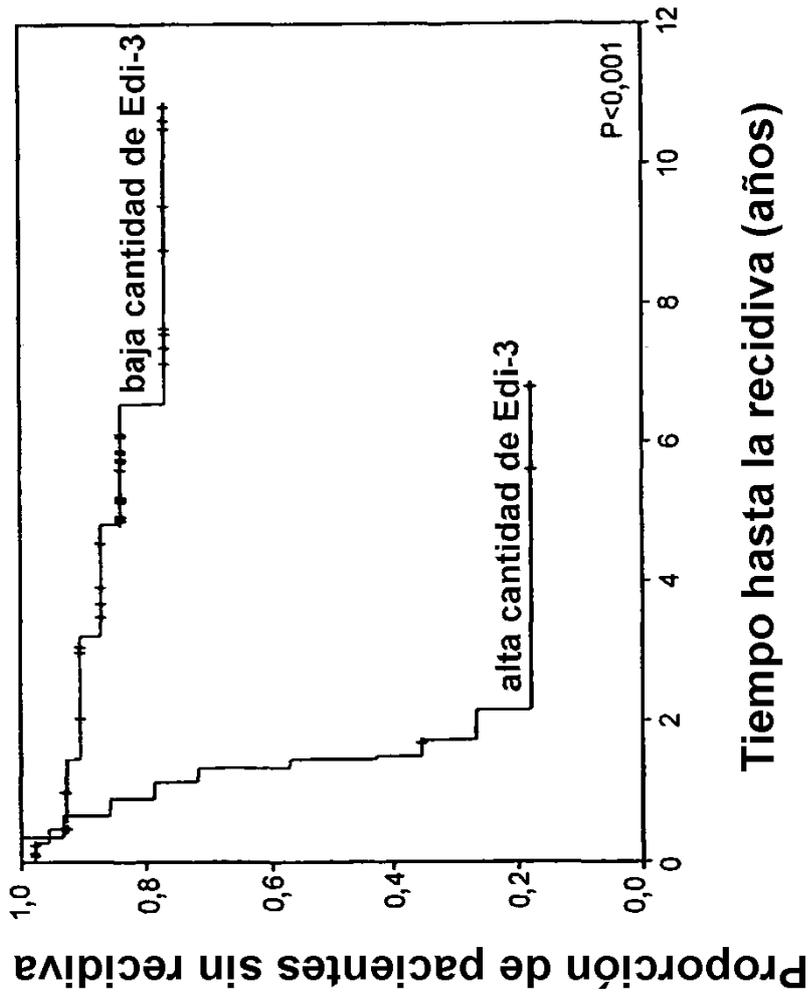


Fig. 7