

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 617**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09732836 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 2283154**

54 Título: **Metilación de los promotores de MAL y de CADM1, marcador de diagnóstico molecular para cánceres cervicales invasivos inducidos por el VPH y sus lesiones precursoras de alto grado de malignidad**

30 Prioridad:

**14.04.2008 EP 08154496**

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

**16.10.2013**

73 Titular/es:

**VERENIGING VOOR CHRISTELIJK HOGER  
ONDERWIJS, WETENSCHAPPELIJK  
ONDERZOEK EN PATIËNTENZORG (100.0%)  
De Boelelaan 1105  
1081 HV Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**MEIJER, CHRISTOPHORUS JOANNES  
LAMBERTUS MARIA;  
SNIJDERS, PETRUS JOSEPHUS FERDINANDUS  
y  
STEENBERGEN, RENSKÉ DANIËLA MARIA**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 425 617 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

Metilación de los promotores de MAL y de CADM1, marcador de diagnóstico molecular para cánceres cervicales invasivos inducidos por el VPH y sus lesiones precursoras de alto grado de malignidad

5

## SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al sector de la prevención del cáncer y el diagnóstico médico; y se refiere a un marcador de diagnóstico molecular para cánceres invasivos inducidos por el virus del papiloma humano (VPH) y a lesiones precursoras de alto grado de malignidad de los mismos, tales como cáncer cervical invasivo y lesiones cervicales premalignas. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de la secuencia genómica y reguladora de MAL o los productos génicos de la misma como marcadores para lesiones premalignas inducidas por VPHhr con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por VPHhr.

10

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer del cuello uterino es el segundo cáncer más común en mujeres a nivel mundial y es responsable de aproximadamente 250.000 muertes por cáncer al año.

20

El desarrollo del carcinoma cervical de células escamosas se caracteriza por una secuencia de lesiones premalignas, denominadas neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que se clasifican de 1 a 3, refiriéndose a displasia leve (NIC 1), displasia moderada (NIC 2) y displasia/carcinoma *in situ* grave (NIC 3), respectivamente. La NIC 1 también se refiere como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado de malignidad (LSIL) y NIC2 y NIC 3 juntas como lesión intraepitelial escamosa de alto grado de malignidad (HSIL). Para el adenoma cervical, el adenocarcinoma *in situ* (ACIS) es una lesión precursora establecida. En principio, estas lesiones premalignas son reversibles, aunque cuanto más grave es la lesión, menores son las posibilidades de regresión espontánea. El cáncer cervical es considerado como una enfermedad prevenible, ya que las fases premalignas se pueden detectar mediante citología exfoliativa y tratarse fácilmente cuando sea necesario, con únicamente efectos secundarios menores. El cribado cervical está dirigido al diagnóstico precoz de lesiones cancerosas premalignas de alto grado de malignidad (es decir, NIC 2/3 y adenocarcinoma *in situ*) y tratables, reduciendo, de este modo, la mortalidad del cáncer cervical invasivo. La práctica médica general comprende el tratamiento de todas las mujeres con NIC 2, NIC 3 y adenocarcinoma *in situ*, confirmados morfológicamente, a efectos de prevenir el desarrollo del cáncer cervical.

25

30

35

Durante la última década se ha establecido que la carcinogénesis cervical se inicia mediante una infección con el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPHhr). Se ha observado que la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, que alteran los mecanismos supresores de los tumores p53 y Rb, respectivamente, es esencial tanto para la aparición de la oncogénesis como para el mantenimiento de un fenotipo maligno. Por lo tanto, el análisis del VPHhr parecía una herramienta atractiva de cribado primario. Sin embargo, en concordancia con un proceso de carcinogénesis de múltiples etapas, se necesitan alteraciones adicionales en el genoma de la célula huésped para la progresión de una célula infectada por VPHhr en una célula cancerosa invasiva. Sólo una pequeña proporción de las mujeres infectadas con VPH de alto riesgo desarrollarán lesiones cervicales premalignas de alto grado de malignidad (NIC 2/3) y, si no se tratan, cáncer cervical. En la mayoría de las mujeres con lesiones cervicales premalignas las lesiones experimentan regresión de manera espontánea. De las mujeres que participan en el cribado basado en la población, aproximadamente el 5-6% presentan un análisis positivo en VPHhr (Bulkmans y otros, Int J Cancer 2004,110: 94-101). Sin embargo, solo, como máximo, el 20% de ellas (el 1% de las mujeres participantes) presentan  $\geq$ NIC 2/3. Por lo tanto, el cribado primario mediante el análisis de VPHhr estará acompañado de un número sustancial de procedimientos de seguimiento redundantes y una ansiedad innecesaria entre las mujeres, a menos que se puedan aplicar marcadores a los frotis cervicales que permitan la estratificación de mujeres que dieron positivo en VPHhr para el riesgo de  $\geq$ NIC 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma *in situ*.

40

45

50

El objetivo principal es reducir el porcentaje de mujeres que dieron positivo en el análisis con respecto a aquellas que presentan lesiones clínicamente significativas. Un modo es utilizar la citología como un análisis secundario (denominado triaje) para las mujeres que dieron positivo en VPHhr. Aún así, esto deja un número sustancial de mujeres que dieron positivo en VPHhr con citología normal (3,5% de las mujeres en la población del cribado), de las cuales el 10% presentan o adquieren  $\geq$ NIC 3. Además, la citología no es una opción para muestras cervicovaginales tomadas por el propio individuo en casa, ya que éstas no son representativas del estado citológico del cuello uterino (Brink y otros, 2006, J. Clin. Microbiol. 44:2518-2523). Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas de triaje complementarias o alternativas para estratificar mujeres que dieron positivo en VPHhr en aquellas con y sin  $\geq$ NIC 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma *in situ*.

55

60

El documento WO 2004/087962 da a conocer un método de detección de la metilación del promotor de CADM1 en lesiones cervicales premalignas y malignas. El documento WO 2007/007205 da a conocer un método de detección de la metilación del promotor de MAL en lesiones cervicales premalignas y malignas.

## CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Los presentes inventores han desarrollado ahora un marcador de diagnóstico (molecular) basado en las alteraciones de MAL, en particular un ARNm y expresión proteica de MAL reducidos, así como la hipermetilación del promotor de MAL, para identificar lesiones precancerosas de alto grado de malignidad inducidas por el virus del papiloma humano (VPH), tales como lesiones cervicales premalignas de cáncer cervical invasivo, y lesiones precursoras inducidas por el virus de papiloma humano (VPH) de alto riesgo de cánceres no cervicales invasivos en material celular obtenido a través de un raspado, lavado o mediante otro medio y/o tejido. En particular, el presente documento se refiere a la utilización del gen de MAL (incluyendo su promotor) y los productos génicos del mismo, como marcadores de lesiones premalignas de alto grado de malignidad inducidas por VPH, que permiten la detección precoz y una mejor opción de tratamiento para el paciente individual.

De manera sorprendente, se ha descubierto ahora que el gen que codifica la proteína asociada a la maduración de linfocitos T, también conocida como proteína de diferenciación de células T (también referida como MAL; Acceso del Banco de genes NM\_002371) está implicado como gen supresor de tumores en la carcinogénesis cervical, y que un nivel bajo de expresión del gen MAL, causado principalmente por la metilación del promotor de MAL, es un factor determinante importante de la carcinogénesis cervical. De este modo, las secuencias genómicas y reguladoras de MAL y los productos génicos de las mismas proporcionan marcadores valiosos para diagnosticar el cáncer cervical invasivo y las lesiones precursoras de alto grado de malignidad del mismo. De manera particular, cuando se combina con el análisis de metilación de CADM1 (Identificación del Banco de genes NM\_014333.3), se consigue una sensibilidad elevada para el cáncer cervical invasivo y las lesiones precursoras de alto grado de malignidad del mismo, que supera a la hallada con una citología cervical. De manera adicional, el presente documento es adecuado para diagnosticar los cánceres invasivos asociados con VPHhr no cervicales y sus lesiones precursoras de alto grado de malignidad.

El cáncer cervical está casi exclusivamente asociado con la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Los virus del papiloma humano constituyen un grupo de más de 100 tipos de virus identificados por las variaciones en la secuencia de ADN. Los diversos VPH causan una variedad de enfermedades cutáneas y de las mucosas. Los VPH se clasifican de manera amplia en tipos de bajo riesgo y alto riesgo, en base a su capacidad de inducir cambios malignos en células infectadas. Los tipos de bajo riesgo de VPH, tales como 1, 2, 4, 6, 11, 13 y 32 están asociados principalmente con lesiones benignas o verrugas comunes, mientras que los tipos de alto riesgo, tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68 están principalmente asociados con lesiones epiteliales premalignas o malignas. Estos tipos de alto riesgo de VPH causan crecimientos que normalmente son lisos y casi invisibles, en comparación con las verrugas causadas por los tipos de bajo riesgo, por ejemplo, VPH-6 y VPH-11. Se ha descubierto que los tipos de alto riesgo de VPH causan un carcinoma invasivo del cuello uterino, así como un carcinoma invasivo en cualquier otra parte del tracto anogenital y/o la región de la cabeza y cuello. Por lo tanto, el presente documento no sólo es adecuado para detectar el cáncer cervical invasivo y las fases precursoras del mismo asociadas con la proteína asociada con la maduración de linfocitos T (MAL), sino que también otros cánceres invasivos y las correspondientes fases precursoras que son inducidas por el VPH, en particular del tipo de alto riesgo. De este modo, el presente documento da a conocer un método para la valoración del riesgo de cualquier lesión premaligna de alto grado de malignidad inducida por VPH o cáncer invasivo.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer métodos tal como se define en la reivindicación 1.

Las lesiones precursoras inducidas por VPH y cánceres invasivos muy adecuados en el contexto del presente documento son lesiones precancerosas cervicales y cánceres cervicales invasivos, pero también lesiones precursoras y cánceres invasivos inducidos por VPH de alto riesgo en otros tejidos, tales como la cavidad oral, orofaringe, ano, recto, pene, vulva, vagina, etc.

Una célula de prueba puede ser una célula (pre)neoplásica, una célula cervical proliferante o cualquier otra célula, en las que se detectará la presencia de una lesión precursora inducida por VPH con potencial invasivo y un cáncer invasivo inducido por VPH asociado con la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL).

El presente documento también da a conocer métodos de detección de una lesión precursora inducida por VPH con potencial invasivo o un cáncer invasivo inducido por VPH asociado con la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) en un individuo con necesidad del mismo, comprendiendo dicho método poner en contacto un componente celular diana de una célula de prueba con un reactivo que detecta MAL y detectar una alteración en MAL en comparación con la de una célula normal comparable, de manera preferente, en dicha detección se determina una metilación incrementada del promotor de MAL y secuencias intrónicas ricas en CpG en la célula de prueba y/o una producción reducida de MAL en las célula de prueba en comparación con la célula normal comparable.

En otro aspecto, el presente documento se refiere a la utilización de marcadores moleculares de diagnóstico, tal como se define en la reivindicación 13, para la detección de una lesión precursora de alto grado de malignidad inducida por VPH y un cáncer invasivo inducido por VPH asociada con la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL), en la que dicho marcador indica la metilación del promotor de MAL y/o la expresión de ARNm

asociado con la producción del polipéptido MAL. Mediante dicha utilización, se puede predecir la presencia de una lesión precancerosa de alto grado de malignidad o un cáncer invasivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La figura 1 muestra la región reguladora 5' de MAL, la secuencia codificante, la parte rica en CpG de la primera secuencia intrónica y las secuencias 3' no codificantes transcritas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10 "Expresión" se refiere a la transcripción de un gen en ARN estructural (ARNr, ARNt) o ARN mensajero (ARNm) y, si es aplicable, la posterior traducción en un polipéptido o una proteína.

15 El término "cáncer invasivo inducido por VPH" se refiere a un carcinoma inducido por VPH de alto riesgo, el cual invade el tejido circundante. Esto incluye todos los histotipos de carcinoma inducido por VPH, es decir, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas neuroendocrinos en órganos relevantes, tales como el cuello del útero, la cavidad oral, la orofaringe, el ano, el recto, el pene, la vulva, la vagina, etc.

20 El término "cáncer cervical invasivo" se refiere a un carcinoma cervical que invade el tejido circundante. Esto incluye todos los histotipos de carcinoma, es decir, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células adenoescamosas y carcinomas neuroendocrinos

25 Los términos "lesión premaligna" y "lesión precursora" se refieren a una fase en la evolución celular con múltiples etapas hacia el cáncer con una posibilidad fuertemente incrementada de progresar hacia un carcinoma. Con la morfología clásica, el patólogo es incapaz de predecir en el individuo cuál de estas lesiones progresará o experimentará regresión. La presente patente se refiere a un método que puede predecir un cáncer invasivo o una lesión precursora de alto grado de malignidad del mismo.

30 El término "lesión cervical premaligna de alto grado de malignidad" se refiere a una fase en la evolución celular con múltiples etapas hacia el cáncer cervical con una posibilidad fuertemente incrementada de progresar hacia un carcinoma cervical. El término "capaz de hibridarse de manera específica a" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos capaz de emparejarse con bases específicas con una secuencia de ácidos nucleicos complementaria y unirse a la misma para formar una doble cadena de ácidos nucleicos.

35 Un "complemento" o "secuencia complementaria" es una secuencia de nucleótidos que forma una doble cadena unida por hidrógeno con otra secuencia de nucleótidos según las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de bases complementarias para 5'-AAGGCT-3' es 3'-TTCCGA-5'.

40 El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sales, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan de manera empírica para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácidos nucleicos diana. Los términos, tal como se utilizan, incluyen la referencia a condiciones bajo las cuales una sonda o un cebador se hibridará a su secuencia diana hasta una grado superior de manera detectable en comparación con otras secuencias (por ejemplo, como mínimo, dos veces sobre la línea base). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan de manera específica a temperaturas más elevadas. En general, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico (T<sub>f</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>f</sub> es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana complementaria se hibrida a una sonda o cebador perfectamente emparejado. De manera habitual, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion Na, habitualmente aproximadamente una concentración de 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es, como mínimo, aproximadamente 30°C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y, como mínimo, aproximadamente 60°C para sondas o cebadores largos (por ejemplo, superiores a 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Entre las condiciones de baja rigurosidad o "condiciones de rigurosidad reducida" de ejemplo se incluyen la hibridación con una solución tampón de formamida al 30%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 2 x SSC a 40°C. Entre las condiciones de rigurosidad elevada de ejemplo se incluyen la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 0,1 x SSC a 40°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology ("Protocolos actuales en biología molecular"), John Wiley & Sons Inc., 1994.

65 El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros de nucleótidos (normalmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y aril fosfato, fosforotioato) o enlaces que no son de fósforo (por ejemplo, péptido, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos

modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil citosina) y grupos azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metil ribosilo, 2'-O-metoxietil ribosilo, 2'-fluoro ribosilo, 2'-amino ribosilo, y similares). Los oligonucleótidos pueden ser moléculas naturales o sintéticas de ADN de cadena doble y sencilla y ARN de cadena doble y sencilla con formas circular, ramificada o lineal y, de manera opcional, incluyendo dominios capaces de formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, las estructuras tallo y bucle y bucle-tallo-bucle).

El término "cebador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse ("annealing") a la diana de amplificación permitiendo que se una una ADN polimerasa, sirviendo, de este modo, como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se encuentra bajo condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario de una cadena de ácidos nucleicos, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (amplificación) es, de manera preferente, de cadena sencilla para una eficacia máxima en la amplificación. De manera preferente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen la temperatura y el origen del cebador. Los términos una "pareja de cebadores bidireccionales", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un cebador directo y a un cebador inverso, tal como se utiliza habitualmente en el sector de la amplificación de ADN, tal como en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de cadena sencilla que reconocerá y formará una doble cadena unida por hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito con secuencias de ácidos nucleicos diana o su derivado de ADNc.

El gen de *MAL* (proteína asociada a la maduración de linfocitos T) (Acceso del Banco de genes NM\_002371) ha sido identificado originalmente como un gen expresado de manera diferencial durante el desarrollo de células T (Alonso y Weisman 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1997-2001). *MAL* se codifica como una proteína de membrana integral de 17 kDa y es un componente de los microdominios o balsas de membrana enriquecidos en glicolípidos (Kim y otros 1995, J. Neurosci. Res., 42, 413-422). *MAL* tiene una función esencial como componente de la maquinaria proteica para el transporte atípico de proteínas de membrana y secretoras en células epiteliales polarizadas (Cheong y otros, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6241-6248).

Se ha detectado la expresión de *MAL* reducida en un conjunto diverso de cánceres humanos, que incluyen el cáncer de esófago, gástrico y colorrectal (Mimori y otros, 2003, Oncogene, 22, 3463-3471; Mimori 2007 y otros, Ann. Surg. Oncol., 14, 1670-1677).

En el cáncer colorrectal, la regulación por descenso de *MAL* se ha asociado con la hipermetilación del promotor (Mori y otros, 2006, Gastroenterology, 131, 797-808; Lind y otros, 2007 Gastroenterology, 132, 1631-1632).

El papel funcional de *MAL* actuando como gen supresor de tumores se demostró mediante la reexpresión del gen de *MAL* en células de cáncer de esófago, dando lugar a supresión de la motilidad, invasión y tumorigenicidad, a la vez que se aumenta la apoptosis (Mimori y otros, 2003, Oncogene, 22, 3463-3471).

Los presentes inventores han establecido ahora que las alteraciones en *MAL*, incluyendo la metilación del promotor de *MAL* y la expresión reducida de *MAL*, es un suceso frecuente en carcinomas cervicales de histotipos del carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinoma y carcinoma neuroendocrino, y sus lesiones precursoras de alto grado de malignidad. Los estudios *in vitro* revelaron una implicación funcional de la inactivación de *MAL* en el desarrollo del cáncer cervical, ya que la sobreexpresión de *MAL* en células de la línea celular de cáncer cervical SiHa que contiene VPH 16 reducía la proliferación y suprimía el crecimiento independiente del anclaje. De forma más destacada, los presentes inventores han demostrado que no sólo la hipermetilación del promotor de *MAL*, sino que, de manera destacada, la expresión reducida del ARNm se puede detectar en muestras de raspado cervical y predecir la presencia de una lesión de NIC de alto grado de malignidad o carcinoma invasivo. Además, la metilación del promotor de *MAL* se podía detectar en muestras cervicovaginales recogidas por el propio individuo y se observó que estaban asociadas con la presencia de una lesión de NIC de alto grado de malignidad o cáncer cervical invasivo subyacentes.

De manera destacada, mediante la combinación del análisis de la metilación de *MAL* con sólo una región promotora recientemente seleccionada de *CADM1* (Identificación del Banco de genes NM\_014333.3), se consigue una sensibilidad elevada para  $\geq$  NIC 2 que supera la de la citología. Además, a diferencia de la citología, el análisis de metilación para ambos genes también se puede realizar de manera satisfactoria en muestras cervicales, vaginales y vulvares tomadas por el propio individuo.

Estos resultados indican que la detección de la metilación del promotor de *MAL*, ya sea o no en combinación con una expresión reducida de *MAL* o la metilación del promotor de *CADM1*, en raspados cervicales y muestras cervicovaginales tomadas por el propio individuo, pueden predecir una enfermedad de NIC de alto grado de malignidad o cáncer cervical.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer métodos, tal como se define en la reivindicación 1, de detección de lesiones precancerosas de alto grado de malignidad inducidas por VPH y cánceres invasivos inducidos por VPH asociados con la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) en un individuo con necesidad de los mismos, o indicativo de los mismos, comprendiendo dicho método poner en contacto un componente celular de una célula de prueba del individuo con un reactivo que detecta el nivel del componente celular en la célula de prueba y determinar una modificación en el nivel del componente celular en la célula de prueba en comparación con una célula sana comparable, en el que el componente celular indica el nivel de MAL en la célula y la modificación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por VPH con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por VPH.

La célula de prueba del individuo puede comprender una célula de una muestra de células de las mucosas, tales como células cervicales, y también otros tejidos, tales como la cavidad oral, orofaringe, pene, vulva, ano, recto y otros tejidos, en la que se detectará una lesión precursora o cáncer asociado con VPH. Todas estas muestras se pueden utilizar como muestra en un método del presente documento. Una muestra de una célula del paciente para utilizar en el método de la presente invención comprende células cervicales como células de prueba. Las células cervicales se pueden presentar, por ejemplo, como una muestra histológica o citológica. Las muestras citológicas comprenden raspados cervicales convencionales, así como preparaciones en capa fina de muestras cervicales y muestras cervicovaginales o vaginales recogidas por el propio individuo.

Un método de la presente invención es particularmente adecuado para la detección de lesiones precancerosas cervicales de alto grado de malignidad y cánceres invasivos asociados con la proteína de maduración de linfocitos T (MAL) que son inducidos por VPH de alto riesgo. Por consiguiente, se puede relacionar un método de detección de lesiones precancerosas de alto grado de malignidad inducidas por VPH y cánceres invasivos inducidos por VPH asociados con la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) con la medición de la expresión de MAL, tal como en forma de medición de los transcritos del gen de MAL y/o las proteínas posteriores traducidas a partir de dichos transcritos. Además, un método de detección de lesiones precancerosas de alto grado de malignidad inducidas por VPH con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por VPH puede comprender medir la metilación del promotor de MAL como una indicación de la capacidad de expresión de MAL y/o la capacidad de producción de la proteína MAL.

La figura 1 muestra la región promotora rica en CpG y la primera secuencia intrónica rica en CpG del gen de MAL, así como la secuencia codificante y la secuencia 3' no codificante transcrita. La metilación de las secuencias ricas en CpG, en particular en la región promotora, dará lugar a una transcripción disminuida de manera brusca o incluso el bloqueo completo de la transcripción. Por lo tanto, la región promotora dispone una secuencia marcadora positiva para la potencial expresión de este gen. De manera alternativa, la expresión del gen MAL se puede detectar mediante la medición de los transcritos génicos. Como tal, la región de codificación para la proteína MAL en este gen proporciona una secuencia marcadora para detección de transcritos del gen. En aún otra alternativa, la expresión del gen MAL se puede detectar mediante la medición directa de la proteína MAL.

De este modo, el componente celular de prueba puede ser un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, de manera preferente ARNm, o proteína. Cuando el componente celular es una proteína, el reactivo es habitualmente un anticuerpo contra MAL. Cuando el componente es un ácido nucleico, el reactivo es habitualmente una sonda de ácidos nucleicos (ADN o ARN) o un cebador de ácidos nucleicos (PCR). Mediante la utilización de dichas sondas o cebadores, se pueden detectar, por ejemplo, productos de expresión génica, tales como ARNm. De manera alternativa, cuando el componente es un ácido nucleico, el reactivo también puede ser una endonucleasa de restricción, de manera preferente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para la detección de la presencia de grupos metilo en el ácido nucleico de la célula de prueba, de manera preferente, siendo entonces dicho ácido nucleico de la célula de prueba ADN.

El componente celular de prueba se puede detectar de manera directa *in situ* o se puede aislar a partir de otros componentes celulares mediante métodos habituales conocidos por los expertos en la materia antes de contactar con el reactivo (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology" ("Protocolos actuales en biología molecular"), Ausubel y otros 1995. 4ª edición, John Wiley and Sons; "A Laboratory Guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis" ("Una guía de laboratorio para el ARN: aislamiento, análisis y síntesis"), Krieg (ed.), 1996, Wiley-Liss; "Molecular Cloning: A laboratory manual" ("Clonación molecular: un manual de laboratorio"), J. Sambrook, E.F. Fritsch. 1989. 3 Volúmenes, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Los métodos de detección incluyen análisis, tales como análisis de transferencia Southern y Northern, protección de ARNasa, inmunoensayos, hibridación *in situ*, PCR (Mullis 1987, patente de Estados Unidos No. 4.683.195, 4.683.202, y 4.800.159), LCR (Barany 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193; solicitud de patente europea No., 320.308), 3SR (Guatelli y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), SDA (patente de Estados Unidos Nos. 5.270.184 y 5.455.166), TAS (Kwoh y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi y otros, 1988, Bio/Technology 6:1197), Rolling Circle Amplication ("Amplificación por círculo rodante") (RCA) u otros métodos para la amplificación de ADN. En un método alternativo, el ARN se puede detectar mediante métodos, tales como NASBA (L. Malek y otros, 1994, Meth. Molec. Biol. 28, Ch. 36, Isaac PG, ed., Humana Press, Inc., Totowa, N.J.) o TMA.

Las sondas, cebadores y anticuerpos de ácidos nucleicos se pueden marcar, de manera detectable, por ejemplo, con un isótopo radioactivo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico, una enzima o una estructura de unión biológicamente relevante, tal como biotina o digoxigenina. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para la unión a los reactivos o serán capaces de determinarlos utilizando experimentación de rutina.

Entre otros métodos para la detección se incluyen análisis, tales como los que se puedan realizar con chips ("arrays") de ácidos nucleicos (véase, entre otros, Chee y otros, 1996, Science 274 (5287): 610-614). Por ejemplo, se pueden utilizar chips de ADN para la detección de ácidos nucleicos, según la presente invención. Dichos chips comprenden oligonucleótidos con secuencias capaces de hibridarse en condiciones rigurosas al componente celular con el ácido nucleico del que se detecta el nivel en un método de la presente invención.

Dado que el presente documento muestra que un nivel disminuido de transcripción de *MAL* es a menudo el resultado de la hipermetilación del gen *MAL*, a menudo resulta deseable determinar de manera directa si el gen *MAL* está hipermetilado. En particular, las áreas ricas en citosina denominadas "islas de CpG", que están situadas principalmente en las regiones reguladoras 5' de los genes, normalmente no están metiladas. El término "hipermetilación" incluye cualquier metilación de citosina en una posición que normalmente no está metilada en la secuencia del gen *MAL* (por ejemplo, el promotor de *MAL*, primer exón y primera secuencia intrónica, véase la figura 1). La hipermetilación se puede detectar, por ejemplo, mediante el tratamiento con endonucleasas de restricción del polinucleótido (gen) *MAL* y análisis de transferencia Southern. Por lo tanto, en un método de la invención, es preferente el análisis con endonucleasas de restricción para detectar la hipermetilación del gen *MAL*. Se puede utilizar cualquier endonucleasa de restricción que incluya CG como parte de su sitio de reconocimiento y que se inhiba cuando la C está metilada. Las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, tales como BssHII, MspI, NotI o HpaII, utilizadas solas o combinadas, son ejemplos de dichas endonucleasas. Otras endonucleasas de restricción sensibles a la metilación serán conocidas por los expertos en la materia.

Otros métodos para la detección de la hipermetilación del promotor de *MAL* implican la modificación con disulfito del ADN, en la que las citosinas no metiladas se convierten en un uracilo, mientras que las citosinas metiladas están protegidas de la modificación química. La amplificación por PCR y secuenciación posteriores revelarán si las citosinas en las islas de CpG se mantienen en el caso de la metilación o son sustituidas por un uracilo en el caso de un estado no metilado. Otro método implica el tratamiento de un producto amplificado por PCR generado a partir de ADN modificado con disulfito con una endonucleasa de restricción que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento.

Un medio alternativo para analizar las secuencias metiladas es la PCR específica de metilación, la cual también se basa en la modificación con disulfito del ADN, seguido de reacciones específicas de PCR que reconocen secuencias ricas en CpG.

Para los objetivos del presente documento, se puede utilizar un anticuerpo (es decir, un anticuerpo contra *MAL*) o una sonda de ácidos nucleicos específica para *MAL* para detectar la presencia del polipéptido *MAL* (utilizando el anticuerpo) o el polinucleótido *MAL* (utilizando la sonda de ácidos nucleicos) en fluidos biológicos o tejidos. Los cebadores de oligonucleótidos basados en cualquier región de secuencia codificante y cualquier región de secuencia reguladora en la secuencia de *MAL* son útiles para amplificar ADN, por ejemplo, mediante PCR.

Cuando se utilizan cebadores de PCR, sondas de ácidos nucleicos o endonucleasas de restricción, se analizan la región 5' reguladora, la primera secuencia intrónica y la secuencia codificante de la secuencia de *MAL* (tal como se especifica en la figura 1).

Se puede utilizar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de polinucleótido *MAL* o antígeno de polipéptido *MAL*. El ácido nucleico también se puede analizar mediante métodos *in situ* de ARN que son conocidos por los expertos en la materia, tales como la hibridación *in situ*. Entre las muestras preferentes para el análisis, según los métodos de la presente invención, se incluyen muestras, tales como raspados (cervicales o vaginales), lavados o frotis cervicovaginal, y/o biopsias (cervicales) y similares. Aunque el individuo puede ser cualquier mamífero, de manera preferente, el individuo es un ser humano.

Los métodos dados a conocer pueden utilizar anticuerpos inmunorreactivos con el polipéptido *MAL*, la secuencia de aminoácidos prevista del cual está disponible como el Acceso del Banco de genes No. NP\_002362.1, y 3 transcritos alternativos NP\_071883.1, NP\_071884.1, NP\_071885.1, o fragmentos inmunorreactivos de los mismos. Se puede utilizar un anticuerpo que consiste, de manera esencial, en anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Los anticuerpos monoclonales se producen a partir de fragmentos de la proteína que contienen el antígeno mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (Kohler, y otros, Nature, 256: 495,1975).

El término anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, significa que incluye moléculas intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab y F(ab')<sub>2</sub>, que son capaces de unirse a un determinante epitópico

en MAL. El anticuerpo, tal como se utiliza en el presente documento, también se referirá a otras moléculas proteicas o no proteicas con especificidad de unión a antígeno, tales como minianticuerpos, peptidomiméticos, antialcalinos, etc.

5 Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales en los métodos de diagnóstico dados a conocer, por ejemplo, en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un portador en fase sólida. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos se pueden marcar de forma detectable de varias maneras. Entre los ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la presente invención se encuentran inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Entre los ejemplos de  
10 dichos inmunoensayos se encuentran el radioinmunoensayo (RIA) y en el ensayo en sándwich (inmunométrico). La detección de los antígenos utilizando anticuerpos monoclonales de la presente invención se puede realizar utilizando inmunoensayos que se desarrollan en los modos directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos o inmunocitoquímicos en las muestras fisiológicas. Los expertos en la materia conocerán, o podrán discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin una gran experimentación.

15 Los anticuerpos monoclonales pueden estar unidos a muchos portadores diferentes y pueden utilizarse para detectar la presencia de MAL. Entre los ejemplos de portadores bien conocidos se incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los objetivos de la presente invención. Los expertos en la  
20 materia conocerán otros portadores adecuados para unirse a anticuerpos monoclonales o serán capaces de determinar los mismos utilizando experimentación de rutina.

25 En la realización de los ensayos puede ser deseable incluir ciertos "bloqueadores" en el medio de incubación (normalmente se añaden con el anticuerpo soluble marcado). Los "bloqueadores" se añaden para asegurar que las proteínas, proteasas o inmunoglobulinas antiheterofílicas no específicas a las inmunoglobulinas contra MAL presentes en la muestra experimental no se reticulen o destruyan los anticuerpos en el soporte en fase sólida, o el anticuerpo indicador marcado radioactivamente, produciendo resultados falsos positivos o falsos negativos. Por lo tanto, la selección de "bloqueadores" puede aumentar sustancialmente la especificidad de los ensayos descritos en la presente invención. Como "bloqueadores" se puede utilizar un conjunto de anticuerpos no relevantes (es decir, no  
30 específicos) de la misma clase o subclase (isotipo) que los utilizados en los ensayos (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgM, etc.). La concentración de los "bloqueadores" (normalmente 1-100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) puede ser importante, a efectos de mantener la sensibilidad correcta, a la vez que inhibiendo cualquier interferencia no deseada por proteínas que mutuamente reaccionan de forma natural y cruzada en la muestra.

35 Entre los métodos de diagnóstico para la detección de la producción de MAL, la expresión del gen *MAL* o los trastornos en los mismos, se incluyen métodos en los que se dispone una muestra para el análisis, cuya muestra comprende una preparación celular de tejido cervical u otro tejido. De manera preferente, dichas muestras se disponen como raspados u otras muestras citológicas.

40 De manera adecuada, se trata previamente una muestra de células o tejido obtenida de un mamífero, de manera preferente un ser humano, para permitir el contacto entre un componente celular diana de una célula de prueba comprendida en dicha muestra con un reactivo que detecta MAL y la detección de la reducción en el MAL en comparación con el de una célula normal comparable. Las muestras se pueden montar en un soporte adecuado para permitir la observación de células individuales. Entre los ejemplos de materiales de soporte conocidos se incluyen  
45 vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, poliuretano, dispuestos, de manera opcional, en capas para mejorar la adhesión celular y la inmovilización de la muestra, tales como capas de poli-L-lisina o silano. Los raspados o biopsias cervicales se pueden preparar, por ejemplo, para la prueba de Papanicolaou (Pap) o cualquier modificación adecuada de la misma conocida por el experto en la materia, y se pueden fijar mediante procedimientos que permiten el acceso adecuado del reactivo al componente diana. En ciertas realizaciones de la presente  
50 invención, las muestras citológicas se disponen como muestras de raspado convencionales o preparaciones en capa fina de células cervicales o muestras de citología de base líquida o cualquier otro tipo de preparación conocida por los expertos en la materia. Si se necesita su almacenamiento, los procedimientos de rutina utilizan formalina tamponada para la fijación, seguido de un baño en parafina, lo cual proporciona una infraestructura de tejido bien conservado. A efectos de permitir una tinción inmunohistoquímica o inmunofluorescente, debe recuperarse o  
55 desenmascararse la antigenicidad del material de muestra. Un método de recuperación de la antigenicidad de proteínas reticuladas en formaldehído implica el tratamiento de la muestra con enzimas proteolíticas. Este método da lugar a un digesto (parcial) del material y los anticuerpos pueden acceder a más fragmentos de las proteínas originales.

60 Otro método para recuperar la inmunoreactividad de los antígenos reticulados con formaldehído implica el procesado térmico utilizando un tratamiento térmico o de energía elevada de las muestras. Dicho método se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 5.244.787. Aún otro método para recuperar antígenos de tejidos fijados a formaldehído es la utilización de una olla a presión, ya sea en combinación con un microondas o en forma de un autoclave, tal como se describe, por ejemplo, en Norton, 1994. J. Pathol. 173(4): 371-9 y Taylor y otros  
65 1996. Biotech Histochem 71(5): 263-70.

Se pueden utilizar varias alternativas al formaldehído, tal como etanol, metanol, butanol, methacarn o glioxal, acetona con citrato, o se pueden utilizar fijadores combinados. De manera alternativa, la muestra se puede secar al aire antes del procesamiento posterior.

5 A efectos de permitir la detección con sondas de ácidos nucleicos, el material de muestra debe extraerse o desenmascararse en el caso de que el material esté fijado a formalina y bañado en parafina. Un método implica el tratamiento con enzimas proteolíticas y una fijación posterior con paraformaldehído. La digestión proteolítica puede estar precedida por una etapa de desnaturalización en HCl. Este método da lugar a un digesto (parcial) del material que permite la entrada de sondas a la diana. No se necesitan procedimientos específicos de desenmascarado en el caso de un material no fijado con formalina, por ejemplo, material congelado. Antes de la hibridación, las muestras se pueden acetilar mediante el tratamiento con tampón de trietanolamina.

15 A continuación, las sondas de ácidos nucleicos o anticuerpos se ponen en contacto con el material de muestra en un tampón adecuado y se permite que se hibriden o se unan de manera específica a sus ácidos nucleicos o proteínas diana. Después de la unión específica de las sondas de ácidos nucleicos o anticuerpos a los componentes diana, se pueden detectar las sondas y/o anticuerpos marcados mediante métodos, tales como la microscopía confocal láser de barrido, microscopía de campo brillante, citometría de flujo, de manera opcional, combinados con la clasificación de células asociadas con fluorescencia, o modificaciones de estas técnicas, que son bien conocidas por el experto en la materia.

20 En una realización de un método del presente documento, se detecta una metilación incrementada del promotor de *MAL* en la célula de prueba y/o una producción reducida de *MAL* en la célula de prueba en comparación con la célula normal comparable.

25 La presente invención también da a conocer un kit de partes tal como se define en la reivindicación 4.

Dicho kit puede comprender, de manera adecuada, un cepillo o espátula para realizar un raspado (cervical) junto con un recipiente lleno de un medio de recogida para recoger las células de prueba. De manera alternativa, se incluirá un dispositivo para muestras que consiste en una jeringa de irrigación, un catéter para orina femenina desechable y un recipiente con fluido de irrigación para recoger células cervicales mediante un lavado cervicovaginal. Un kit, según la presente invención, comprende cebadores y/o sondas para la detección de la metilación del promotor de *MAL*. Un kit, según el presente documento, puede comprender anticuerpos y reactivos para la detección de la expresión de la proteína *MAL* en raspados o muestras de tejido cervical.

35 Un kit de partes, según la presente invención, comprende medios para la detección de la metilación del promotor de *MAL*, enzimas de restricción sensibles a la metilación, o sondas o cebadores capaces de hibridarse a la secuencia de nucleótidos de la figura 1.

40 En un kit del presente documento, los medios para la detección de la metilación del promotor de *MAL* o la expresión de *MAL* pueden combinarse con medios para la detección de la infección por VPH, de manera preferente, para la detección de la infección por VPH del tipo de alto riesgo. Dichos medios pueden comprender cebadores o sondas específicos de VPH, marcadores de proteínas para la infección por VPH o incluso marcadores sustitutos para la infección por VPH tal como se conocen en el sector. En un kit de la presente invención, los medios para la detección de la metilación del promotor de *MAL* se combinan con medios para la detección de la metilación del promotor de *CADM1* (Identificación del Banco de genes NM 014333.3). La detección de la metilación del promotor de *CADM1* se realiza con métodos similares a los utilizados con la detección de la metilación del promotor de *MAL*, tal como se ha descrito anteriormente.

50 A continuación, se ilustrará la presente invención mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Silenciamiento de *MAL* en carcinomas cervicales y lesiones precursoras de alto grado de malignidad

55 Mediante el análisis de la expresión por microchips de carcinomas cervicales, se identificó *MAL* como uno de los genes regulados por descenso más significativos en carcinomas cervicales en comparación con muestras epiteliales de control normales.

60 El posterior análisis de la PCR cuantitativa con transcriptasa (qRT-PCR) en un grupo de validación independiente de carcinomas cervicales confirmó la regulación por descenso de la expresión de ARNm de *MAL* en estos tumores. La expresión reducida de ARNm de *MAL* se detectó en el 100% de los carcinomas cervicales (n = 12) y el 93% de las lesiones NIC de alto grado de malignidad (n = 15), en comparación con el 8% de los controles normales (n = 12). Los estudios *in vitro* revelaron una implicación funcional de la inactivación de *MAL* en el desarrollo del cáncer cervical, ya que la sobreexpresión ectópica de *MAL* en la línea celular SiHa del carcinoma cervical que contenía VPH 16 daba lugar a una reducción de la proliferación y la supresión del crecimiento independiente del anclaje.

Ejemplo 2: Papel funcional del silenciamiento del gen de MAL en carcinogénesis cervical

Para determinar el potencial papel funcional de MAL en la carcinogénesis cervical, se transfectaron de forma estable células de la línea celular SiHa de cáncer cervical que contenía VPH 16 con un vector de expresión de MAL (SiHa\_MAL) o un vector de control vacío (SiHa (-)). La expresión ectópica de MAL en los transfectantes de SiHa\_MAL se confirmó mediante RT-PCR. Ambos transfectantes se examinaron por su velocidad de proliferación, capacidad de migración y capacidad de crecimiento en agarosa blanda. Los transfectantes de SiHa\_MAL mostraron una reducción del 43% en la velocidad de proliferación en comparación con las células de SiHa (-), lo que indica que la expresión ectópica de MAL tiene un efecto antiproliferativo *in vitro*. Utilizando un ensayo de rascado se observó que la migración era fuertemente inhibida en los transfectantes de SiHa\_MAL. Además, las células de SiHa\_MAL mostraron una reducción del 53% en el crecimiento independiente de anclaje en comparación con los transfectantes de SiHa que contenían el vector vacío.

Considerados conjuntamente, estos datos demuestran que el silenciamiento del gen MAL es un suceso biológico esencial en el desarrollo del cáncer cervical y que la reexpresión de MAL en las células de cáncer cervical reprime de manera eficaz las características bien establecidas de células tumorales, tales como la proliferación, la migración y el crecimiento independiente del anclaje.

Ejemplo 3: El silenciamiento de MAL resultante de la hipermetilación de promotores es un suceso frecuente en lesiones NIC de alto grado de malignidad, carcinomas cervicales de células escamosas, carcinomas adenoescamosos, adenocarcinomas y carcinomas neuroendocrinos

El hecho de que el gen de MAL se localiza en 2q11-13, una región cromosómica en la que no se hallaron deleciones cromosómicas recurrentes en el cáncer cervical, provocó la búsqueda de una potencial regulación epigenética de la transcripción. El tratamiento de líneas celulares de cáncer cervical y líneas celulares inmortalizadas de VPH con inhibidores de la metilación y de la desacetilación de histonas dio lugar a una fuerte regulación por incremento de la expresión de ARNm de MAL, lo que indicaba que la regulación por descenso de MAL era de hecho dependiente de los mecanismos de control epigenéticos.

A continuación, se analizó la metilación del promotor de MAL en muestras de tejido cervical mediante PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP) que reconocía dos regiones en el promotor de MAL (es decir, de -680 a -573 y de -92 a -7, en relación al primer ATG; referidas como M1 y M2, respectivamente). Se eligió el gen constitutivo de  $\beta$ -actina (ACTB) como referencia para la medición de la entrada de ADN total. Para todas las muestras, se dividió la cantidad de ADN metilado medido por la cantidad de ACTB, y se clasificaron como positivas las muestras con proporciones por encima de un corte predefinido (por ejemplo, control normal de proporción promedio + 2,58 x desviación estándar).

Se observó que la metilación de ambas regiones M1 y M2, en lo sucesivo referida como metilación densa, no era detectable en ninguna de las muestras cervicales de control normales (n = 22), era detectable en el 32% de las lesiones NIC 1 (n = 66), el 80% de las lesiones NIC 3 (n = 64) y el 94% de los carcinomas cervicales de células escamosas (n = 94).

Junto con los carcinomas cervicales de células escamosas, también se analizó la metilación del promotor de MAL en los adenocarcinomas cervicales. Los adenocarcinomas, que constituyen hasta un 20% de los carcinomas cervicales, son de particular interés ya que la incidencia del adenocarcinoma cervical ha permanecido igual o incluso se ha incrementado en países con un programa de cribado cervical a nivel nacional. Esto indica que el adenocarcinoma cervical y su lesión precursora glandular, es decir, el adenocarcinoma *in situ* (ACIS), a menudo no se observa mediante cribado basado en citología. En base a estudios genéticos y epigenéticos comparativos entre los carcinomas cervicales de células escamosas y los adenocarcinomas cervicales, se ha descubierto que ambos histotipos de tumores se desarrollan a través de distintos mecanismos carcinogénicos (Dong y otros, 2001, Kang y otros, 2005, Wilting y otros, 2006, Henken y otros, 2007). Consecuentemente, la mayoría de biomarcadores que permiten la detección del carcinoma cervical de células escamosas no detectan necesariamente el adenocarcinoma cervical. Un ejemplo bien estudiado es el marcador de metilación CADM1, que muestra metilación en el 83% de los carcinomas de células escamosas, pero sólo el 23% del adenocarcinoma (Overmeer y otros, 2008). Un segundo ejemplo proviene del estudio de metilación de 9 genes (APC, DAPK1, CDH1, HLTF, hMLH1, p16, RASSF1A, THBS1 y TIMP3) que muestra una metilación más frecuente de CDH1 y DAPK1 en carcinomas de células escamosas, mientras que HLTF, TIMP3, RASSF1A y APC se metilaban más a menudo en el adenocarcinoma (Kang y otros, 2005). Se obtuvieron resultados similares en un estudio que analizaba la metilación de p16, APC, HIC1, DAPK, MGMT y CDH1, en el que se descubrió que APC y HIC1 se metilaban de manera significativa más a menudo en adenocarcinomas, mientras que, por otro lado, p16 y DAPK se metilaban de manera predominante en carcinomas de células escamosas (Dong y otros, 2001).

De manera destacada, la metilación del promotor de MAL parecía ser una excepción, ya que, a diferencia de la mayoría de marcadores conocidos, detectaba adenocarcinomas cervicales a una frecuencia similar a la de los carcinomas de células escamosas, es decir, el 93% (26/28) de los adenocarcinomas mostraron metilación del

promotor de MAL en ambas regiones M1 y M2. Se han obtenido resultados similares para carcinomas adenoescamosos cervicales y carcinomas neuroendocrinos.

5 Por lo tanto, la metilación del promotor de MAL parece ser un marcador de metilación universal para todos los histotipos de carcinoma cervical.

Ejemplo 4. Detección de la expresión reducida de ARNm de MAL y metilación del promotor de MAL en raspados cervicales

10 Utilizando un diseño de control de casos localizados de mujeres que participaban en una prueba de cribado basada en la población, se estudiaron raspados cervicales de mujeres que dieron positivo en VPHhr en que se diagnosticó  $\geq$  NIC 2 (incluyendo carcinoma 1) dentro de los 18 meses de seguimiento (es decir, casos) frente a mujeres que dieron positivo en VPHhr a las que se diagnosticó, como máximo, NIC 1 dentro de un periodo de seguimiento de 18 meses (es decir, controles). Los raspados cervicales de referencia de estas mujeres se recogieron en medio de  
15 conservación en el que se conservan el ARN y el ADN.

La aplicación de qRT-PCR a ARN aislado de un subgrupo de estos raspados mostró una expresión reducida de MAL en el 71% de los casos en comparación con el 28% de los controles. Además, la expresión reducida de MAL sólo se halló en el 13% (3/21) de las mujeres con raspados negativos en VPHhr.

20 Según el conocimiento de los presentes inventores, éstos son los primeros en mostrar la detección de la regulación por descenso del ARNm en raspados cervicales. Hasta ahora, el análisis de expresión en raspados cervicales se ha limitado a genes regulados por incremento y, de manera principal, al análisis de la expresión de las proteínas implicadas en lugar de el análisis de la expresión de ARNm, siendo p16 un ejemplo bien estudiado.

25 A continuación, se realizó el análisis de metilación en una serie amplia de raspados cervicales de mujeres que dieron positivo en la PCR de GP5+/6+ de VPHhr que participaron en el cribado cervical basado en la población en el que se diagnosticó  $\geq$  NIC 2 dentro de los 18 meses de seguimiento (Bulkman y otros, 2007; Hesselink y otros, 2006). Éstas incluían mujeres con citología anormal (es decir, discariosis límite o peor) y citología normal en el punto de partida, éstas últimas se descubrieron únicamente mediante una prueba de VPHhr positiva. Además, se incluyeron las mujeres de control que dieron positivo en VPHhr con una citología normal y NIC 1 o mejor dentro del periodo de seguimiento de 18 meses. La metilación en una o ambas regiones de MAL variaron desde el 31% en mujeres de control que dieron positivo en VPHhr con citología normal hasta el 65% y el 84% en mujeres con  $\geq$  NIC 2 que presentaban una citología normal y anormal en el punto de partida, respectivamente. Mediante la combinación de los  
30 dos últimos grupos, se observó la metilación de MAL en el 79% de mujeres con  $\geq$  NIC 2.

Ejemplo 5: Metilación del promotor de MAL en muestras tomadas por el propio individuo

35 Posteriormente se analizaron las muestras cervicovaginales tomadas por el propio individuo recogidas utilizando un VibaBrush (Rovers Medical Devices, Oss, Holanda) o un muestreador Pantarhei (Pantarhei Devices, Zeist, Holanda) durante el transcurso de un estudio prospectivo en el que un total de 45.000 paquetes para tomar muestras por el propio individuo fueron enviadas a mujeres que, incluso después de un segundo recordatorio, no respondieron a la invitación para un cribado cervical regular (véase [www.trialregister.nl](http://www.trialregister.nl), Prueba no. NTR962 (prueba PROTECT)). Aproximadamente un tercio de estas mujeres devolvieron las muestras tomadas por el propio individuo al laboratorio. Estas muestras son adecuadas para el análisis por PCR de VPH (es decir, positivas en PCR para beta-globina) y el análisis mediante PCR de GP5+/6+ de VPHhr produce, como mínimo, las mismas lesiones  $\geq$  NIC 2 en esta población que las que se encuentran mediante el cribado regular en una población coincidente de mujeres que respondieron (Bais y otros, Int J Cancer: 2007, 120: 1505-1510).

50 Se analizaron un total de 186 mujeres que dieron positivo en VPHhr sin evidencias de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento y 68 mujeres con un frotis de seguimiento anormal y una lesión subyacente  $\geq$  NIC 3 mediante qMSP para ambas regiones promotoras M1 y M2 de MAL. El 62% de las muestras tomadas por las propias mujeres que después fueron diagnosticadas con  $\geq$  NIC 3 dieron positivo para una o ambas regiones promotoras de MAL, en comparación con sólo el 28% de mujeres sin evidencias de enfermedad clínicamente significativa en el  
55 seguimiento. Estos datos demuestran que el análisis de metilación del promotor de MAL en materiales de muestras tomadas por el propio individuo es viable y mejorará la detección de la enfermedad cervical de alto grado de malignidad subyacente.

Ejemplo 6: Adición de la detección de la metilación del promotor de CADM1 al análisis de metilación de MAL en biopsias y raspados cervicales y muestras tomadas por el propio individuo

60 Con el objetivo de incrementar la sensibilidad para  $\geq$  NIC 2, se analizó el valor añadido de un segundo marcador de metilación, es decir CADM1 (Identificación del Banco de genes NM\_014333; véase también el ejemplo 3), que se observó previamente que también estaba implicado, de manera funcional, en la carcinogénesis cervical (Steenbergen y otros, 2004; Overmeer y otros, 2008).

- 5 Mediante la combinación del análisis de metilación de las dos regiones promotoras de MAL con una región promotora de CADM1, el número de lesiones de NIC de alto grado de malignidad positivas en metilación se incrementó del 80% al 91% (se valoró como positivo en el caso de un resultado positivo, como mínimo, para una de estas regiones). En cambio, la adición del análisis de esta región de CADM1 no influyó en los positivos en cuellos de útero normales y lesiones de NIC de bajo grado de malignidad. La adición de los datos de metilación de otros genes no incrementó de manera destacada los valores de la sensibilidad. Por lo tanto, se concluyó que esta combinación proporciona un panel óptimo de marcadores para  $\geq$  NIC 2/3.
- 10 Mediante la adición del análisis de metilación de CADM1 (Identificación del Banco de genes NM 014333) a los raspados cervicales, se detectaron el 5% más de lesiones  $\geq$  NIC 2 en mujeres con una citología anormal, dando lugar a una tasa de detección global de  $\geq$  NIC 2 del 83%.
- 15 El posterior análisis combinado de metilación de MAL y CADM1 en muestras tomadas por el propio individuo dio lugar a un 69% de positivos en estas muestras de mujeres que dieron positivo en VPHhr que posteriormente fueron diagnosticadas con  $\geq$  NIC 3. En cambio, sólo aproximadamente un tercio de las mujeres que dieron positivo en VPHhr sin evidencias de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento, mostraron metilación en alguno o ambos marcadores.
- 20 Después de la combinación de los datos de metilación con los datos de genotipado de VPHhr, resultó que el 84% de las mujeres diagnosticadas con  $\geq$  NIC 3 presentaban metilación de CADM1, metilación de MAL y/o presencia de VPH 16, mientras que el número de mujeres que dieron positivo en VPHhr con marcador positivo sin evidencias de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento no cambió de forma destacada.
- 25 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patiëntenzorg Meijer, Christo-phorus J.L. Nijders, Petrus J.F. Steenbergen, Renske D.M.
- 30 <120> MAL, un marcador de diagnóstico molecular para cánceres invasivos inducidos por VPH y sus lesiones precursoras de alto grado de malignidad
- <130> P84375PC00
- 35 <150> EP 08154496.7  
<151> 2008-04-14
- <160> 1
- 40 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1  
<211> 2904  
<212> ADN
- 45 <213> Homo sapiens  
<400> 1

ES 2 425 617 T3

	gactcgggcg	gatttcaggc	ttcagtgttt	gtaggaggaa	acacagcaat	cacactatta	60
	atagtaaatt	aaaataaatg	ggcaactgct	gcatggtaat	actttttttt	ttaaggcaaa	120
5	aaataaaaaa	tagtgaaaca	gagaaacaaa	acatgaaaca	ccggcagtca	acaggcaggc	180
	aaagaacctg	ggggtggggg	tagcagcggg	cccaccctca	aaaggcccgg	gctgcccaga	240
10	ccaagagaaa	gcgatgaatc	tcttctggta	acgtcccttc	ctgtcgcgatg	gattcaaggc	300
	cgacctgcc	cagcaccacc	accagcagcc	ttctgctggg	gccggcacag	ctgggagcaa	360
15	cctcctactc	tcaggcagac	gcgcagcacc	aagcagagag	gcccggtgca	ggatcccagc	420
	gccgaaccag	cgccggctca	gtggacgcgg	aaggggccgg	cggccgcggc	cggtcccatac	480
20	ccccactgca	gacccccagc	ctgtggcggg	ggtccagttc	cgccaggaaa	ccgccgcctg	540
	gagctgtggg	tcgcgcacat	taacgcatcc	agcggaaaaa	tgaaggagac	ccaaattcaa	600
	agttaaagta	atggtgaccc	gagaggtgcc	ttgatgagaa	ggtttggggg	cccggttaact	660
25	gatggttatac	attcttacga	gatgctggtc	acctacgaag	ggagaaaggc	acgaggagcg	720
	cctgaccaaa	gtggttttgc	cctgcttccc	gcaagaggtg	gcaccacagg	ctggaacgca	780
30	ggagtacagac	ccacagtccc	cagctctgga	cgcccgcagc	ggggcctcga	agaggttcag	840
	ggcgggtgcc	gcggcgctcg	ggccgggtct	cccggggcgt	ggggcggggg	gcggggttgg	900
35	gcggcgggcg	gggctcctcc	ctcttctgcc	ccgggctccc	ctgctcttaa	cccgcgcgcg	960
	ggggcgccca	ggcactggg	ctccgcggag	ccagcgagag	gtctgcgcgg	agtctgagcg	1020
40	gcgctcgtcc	cgtcccaagg	ccgacgccag	cacgccgtca	tggccccgcg	agcggcgacg	1080

ES 2 425 617 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

gggggcagca ccttgcccag tggcttctcg gtcttcacca ccttgcccga cttgctcttc 1140  
 atctttgagt ttgtgagtgg ctctggccg ggggaaggac ggggtgggct gagccgtgcg 1200  
 ctctctcggg cgcccagcac agctgtcggg cgggatccgc tagctgcgca ggttctggga 1260  
 gcatcggggc agcaggcgca gggcggggac taagccaggg aagtcccctc ccacctccgg 1320  
 tcctttgtgc ctttctagac caacagaatg aggggaacag tctacaggac tatggaggaa 1380  
 aaactggggt cccaactggg gtcagatgta ggcagcgggg caggggggga cggctcttgg 1440  
 ttcgctggtc ccaaagctgc gcgcggggcc cacttgacgc gcgcagcgc accgaagctc 1500  
 ccgccgcgct ttgcgcggtt gggtagaagt gcgcagcttt tacaaggag aaggtttcgt 1560  
 taaaaaagaa aaaaaaatca gcaagagaaa cattagtatt accaaccgag atttgagat 1620  
 gagagggagc tgaatccggt ttatcttctt ctggcctttt aaagtttctg gcgagggaac 1680  
 gtatttgca ccaattcgat ctggaaatga ggccatcgtt tgcttgccg cagtccttct 1740  
 gccccgtgtg cggggtgggg gtggaggaga tggggggtgg ggggtggggg gtggcggcga 1800  
 gagcgatccg cgcgcctcga ctgaccttgg gcagcccgg ggctctgca cctgcggtcg 1860  
 gtcccgcctt gcacgcacgg tctctgcctg aggctgcagg aaagcgcttc ctactgagaa 1920  
 ctctgataa gcgctcacgg tgtcgcgaag ccgaagtgc ctccctcagc ctcaactccc 1980  
 cgggggcccgc tggccttcac atcttcgggg gcctggtgtg gatcctggtg gcctcctccc 2040  
 tggtgccctg gccctgtgtc cagggctggg tgatgttctg gtctgtgttc tgcttcgtgg 2100  
 ccaccaccac cttgatcatc ctgtacataa ttggagccca cgggtggagag acttcctggg 2160  
 tcaccttggg cgcagcctac cactgcaccg ctgccctctt ttacctcagc gcctcagtec 2220  
 tggaggccct ggccaccatc acgatgcaag acggcttcac ctacaggcac taccatgaaa 2280  
 acattgctgc cgtggtgttc tctacatag ccaactctgt ctacgtggtc catgcggtgt 2340  
 tctctttaat cagatggaag tcttcataaa gccgcagtag aacttgagct gaaaaccag 2400  
 atggtgttaa ctggcggccc cactttcggg cataactttt tagaaaacag aaatgccctt 2460  
 gatggtggaa aaaagaaaac aaccaccccc ccaactgcca aaaaaaaaaag ccctgccctg 2520  
 ttgctcgtgg gtgctgtgtt tactctcccg tgtgccttcg cgtccggggtt gggagcttgc 2580  
 tgtgtotaac ctccaactgc tgtgctgtct gctagggtea cctcctgttt gtgaaagggg 2640  
 accttcttgt tcgggggtgg gaagtggcga ccgtgacctg agaaggaaag aaagatcctc 2700  
 tgctgacccc tggagcagct ctcgagaact acctgttggg attgtccaca agctctcccg 2760  
 agcgccecat cttgtgcat gttttaagtc ttcattgatg ttctgcatgt catggggact 2820  
 aaaactcacc caacagatct ttccagaggt ccatggtgga agacgataac cctgtgaaat 2880  
 actttataaa atgtcttaat gttc 2904

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para la detección de una lesión premaligna cervical inducida por VPH que presenta un grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC)  $\geq 2$  en un individuo con necesidad del mismo mediante la detección de metilación incrementada del promotor de CADM1 y la detección de metilación incrementada del promotor de MAL en células cervicales.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha lesión premaligna cervical inducida por VPH es una lesión premaligna cervical inducida por VPH de alto riesgo.
3. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la metilación incrementada se detecta utilizando una endonucleasa de restricción, de manera preferente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación.
- 15 4. Kit de partes para utilizar en un método de detección de una lesión premaligna cervical inducida por VPH que presenta un grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC)  $\geq 2$  en células de prueba de un individuo, comprendiendo dicho kit
- 20 - medios para la detección de la metilación del promotor de MAL, en el que dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para la secuencia de nucleótidos de MAL de la figura 1; y
- medios para la detección de la metilación del promotor de CADM1, en el que dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para CADM1; y
- de manera opcional, medios para la detección de la infección por VPH, en el que dichos medios comprenden sondas y cebadores específicos para VPH.
- 25

**Figura 1: Promotor de MAL, secuencia codificante, secuencia rica en CpG del intrón 1 y 3'UTR**

Obtenida de UCSC genome bioinformatic (www.genome.ucsc.edu)  
Referencia: hg18\_knownGene\_uc002stx.1 rango = chr2:95054206-95083462

El inicio de la transcripción se indica en negrita.  
La secuencia codificante está en mayúsculas.  
La parte del intrón 1, que contiene las secuencias ricas en CpG y que es parte de una isla de CpG más grande que empieza en el promotor (nt375), está marcada por \* y subrayada.

```

gactcgggocggatttcaggccttcagtggtttagtaggaggaaacacagcaat
cacactattaatagtaaattaaaataaatgggcaactgctgcatggtaat
acttttttttttaaggcaaaaaataaaaaatagtgaaacagagaaacaaa
acatgaaacaccggcagtcacagggcaggcaaagaacctgggggtggggg
tagcagcgggtcccacctcaaaaaggcccgggctgccagaccaagagaaa
gcgatgaatctcttctggtaacgtcccttctctgctcgcatggattcaaggc
cgacctgccccagcaccaccaccagcagccttctgctggggccggcacag
ctgggagcaacctcctactctcaggcagacgcgcagcaccagcagagag
gcccgggtgcaggatcccagcgcgaaccagcgcgggctcagtggaacgag
aaggggcccggcggcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctgtggcgggtggtccagttccgcaggaaccgcgcgctggagctgtggg
tcgcgcacattaacgcatccagcggaaaaatgaaggagaccacaaattcaa
agttaaagttaatggtagcccgagaggtgectgatgagaaggtttggggt
cccggttactgatgggttatcattcttacgagatgctggtcacctacgaag
ggagaaaggcacgaggagcgcctgaccaaaagtgggtttgcccctgcttccc
gcaagaggtggcaccacgggctggaacgcaggagtcagaccacagctccc
cagctctggacgcccgcagcggggcctcgaagaggttcaggggcgggtgcc
gcccgcctcgggcccgggtctcccggggcgtggggcggggggcgggggttg
gcccgcggcgggggtcctcctctctgcccgggctcccctgctcttaa
cccgcgcgcggggggcggcccaggccactgggctccgcggagccagcagag
gtctgcgcggagctctgagcggcgcctcgtcccgtccaaggccgacgccag
cacgcgcgtcATGGCCCCCGCAGCGGGCGACGGGGGGCAGCACCTGCCAG
TGGCTTCTCGGTCTTACCACCTTGCCCCGACTTGCTCTTCATCTTTGAGT
TT*gtgagtggtcctggcccggggaagggacgggggtgggctgagccgtgcg
ctctctcgggcccagcacagctgtcggacgggatccgctagctgcgca
gggtctcgggagcatcggggcagcagggcgggggactaagccaggg
aagtcccctcccacctccggctcctttgtgcccttctagaccaacagaatg
aggggaacagctctacaggactatggaggaaaaactgggttcccactggg
gtcaqatgtaggcagcggggcaggggggacgggctctgggttcgctggtc
ccaaagctgcgcgcggggcccacttgacgcgcgcagcgcaccaggaagctc
ccgcgcgcgtttgcgcgggttgggtagaagtgcgcaacttttacaaggag
aaggttccggttaaaaaagaaaaaaaatcagcaagagaaacattagttatt
accaaccgagatttggagatgagagggagctgaatccgggtttatctctt
ctggccttttaaagtttctggcaggggaacgtatcttgcgaccaattcgat
ctqgaaatgaggccatcgtttgcttggccgcagtccttctgcccgcgtgtg
cgggggtgggggtggagggagatgggggggtgggggggtgggggggtggcggcga
gagcgtaccgcgcgcctcgactgacctggggcaggcccggggcctctgca
cctgcgggtcgggtcccgccttgcaacgcacgggtctctgctgaggtgcagg
aaagcgccttctactgagaactcctgataagcgcctcacgggtgtcgcgaag
ccgaagtgcacctcccagcctcaactccccggggggcgcgtggccttcac*
ATCTTCGGGGGCCTGGTGTGGATCCTGGTGGCCTCCTCCCTGGTGCCC
TGGCCCCCTGGTCCAGGGCTGGGTGATGTTTCGTGTCGTGTTCTGCTTCGT
GGCCACCACCACCTTGATCATCCTGTACATAAATTGGAGCCCACGGTGGAG
AGACTTCTGGGTCACCTTGGACGCAGCCTACCACTGCACCGCTGCCCTC

```

TTTTACCTCAGCGCCTCAGTCCTGGAGGCCCTGGCCACCATCACGATGCA  
AGACGGCTTCACCTACAGGCACTACCATGAAAACATTGCTGCCGTGGTGT  
TCTCCTACATAGCCACTCTGCTCTACGTGGTCCATGCGGTGTTCTCTTA  
ATCAGATGGAAGTCTTCATAAagccgcagtagaacttgagctgaaaacc  
agatggtgtaactggccgccccactttccggcataacttttagaaaac  
agaaatgcccttgatggtggaaaaaagaaaacaaccacccccccactgcc  
caaaaaaaaaagccctgccctggtgctcgtgggtgctgtgtttactctcc  
cgtgtgccttcgcgtccgggttgggagcttgctgtgtctaacctccaact  
gctgtgctgtctgctagggtcacctcctgtttgtgaaaggggaccttctt  
gttcgggggtgggaagtggcgaccgtgacctgagaaggaaagaaagatcc  
tctgctgaccctggagcagctctcgagaactacctggttggtattgtcca  
caagctctcccgagcgcgcccatcttgtgccatgttttaagtcttcatgga  
tggtctgcatgtcatggggactaaaactcacccaacagatctttccagag  
gtccatggtggaagacgataaccctgtgaaatactttataaaatgtctta  
atgttc