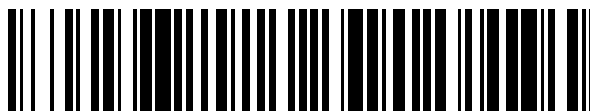


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 301**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2010 E 10765749 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2478117**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico precoz de carcinomas del cuello uterino**

30 Prioridad:

18.09.2009 EP 09011941

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

25.11.2013

73 Titular/es:

**ONCGNOSTICS GMBH (100.0%)
BioInstrumentezentrum Jena, Winzerlaer Strasse
2
07745 Jena, DE**

72 Inventor/es:

**DÜRST, MATTHIAS;
HANSEL, ALFRED y
STEINBACH, DANIEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 431 301 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

Procedimiento para el diagnóstico precoz de carcinomas del cuello uterino

5 El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico precoz de carcinomas del tipo de un carcinoma del
cuello uterino (= cérvix), así como de sus etapas precursoras. El procedimiento se basa en la determinación del
estado de metilación de unos segmentos de las regiones génicas de ASTN1 (el gen de astrotactina 1), y ZNF671 (el
10 gen de la proteína de dedo de zinc 671, un factor de la transcripción). Una metilación del ADN en unas regiones
ricas en guanina y citosina, las denominadas islas CpG, en la región de promotor y/o en la región 5' de por lo menos
uno de estos genes o respectivamente de los dos genes, es característica para unos carcinomas o unas etapas
precursoras de carcinomas de un carcinoma del cuello uterino. La detección de un ADN modificado
correspondientemente se utiliza en el diagnóstico. El presente invento se refiere además a unos estuches, que
permiten la realización del procedimiento de diagnóstico conforme al invento.

15 Un cáncer del cuello uterino (= carcinoma cervical) es mundialmente la segunda más frecuente enfermedad
cancerosa maligna en el caso de las mujeres. Éste se desarrolla como consecuencia de una infección con los
denominados papilomavirus humanos de alto riesgo (hr-HPV) a través de unas etapas precursoras, que se designan
como neoplasias cervicales intraepiteliales (CIN). La CIN1: (= la displasia ligera) se extiende desde la zona basal
hasta a lo sumo un tercio de la altura del epitelio; la CIN2 (= la displasia de grado medio) se extiende hasta dos
20 tercios del epitelio; la CIN3: (= la displasia de grado alto) atraviesa casi todo el epitelio. Las CIN2 y CIN3 se designan
como unas displasias severas. Las citadas en último lugar tienen un alto riesgo de transformarse en un carcinoma
del cuello uterino. En la presente solicitud, las CIN2 y CIN3 y el carcinoma del cuello uterino se recopilan bajo el
concepto de CIN2+. Junto a una infección causada por los hr-HPV, en la carcinogénesis cervical participan también
otros factores.

25 El ensayo existente de prevención para la detección de un carcinoma del cuello uterino y de sus etapas precursoras
(CIN) se basa en un procedimiento citomorfológico (el ensayo Pap). El ensayo Pap es sumamente susceptible a
errores, puesto que se tienen que reconocer microscópicamente unas pocas células sospechosas de cáncer o CIN
en un fondo de miles de células normales. Por lo demás, la evaluación de la morfología celular es extremadamente
30 subjetiva. Estas debilidades dan lugar a que la sensibilidad del ensayo Pap para la detección de las CIN2+, sea de
53 %, y la especificidad sea de 96,3 % (véase la cita de Cuzick y colaboradores, 2006; Int J Cancer, 119:1095-
1101).

35 Mediante ciertos procedimientos moleculares de ensayo se pudo mejorar esencialmente la prevención de un cáncer.
Puesto que, salvo unas pocas excepciones, todos los carcinomas del cuello uterino y sus etapas precursoras
contienen el ADN de los hr-HPV, éste se presenta como un marcador ideal para la prevención de un cáncer. En
diferentes estudios publicados se pudo mostrar, que el ensayo de ADN de los HPV (un procedimiento de PCR) tiene
una sensibilidad de 96,1 %, y una especificidad de 90,7 % para la detección de las CIN2+. No obstante, el valor
40 positivo de predicción de un ensayo de ADN de los HPV para las CIN2+, de solamente 20,3 %, es, conforme a lo
esperado, malo, puesto que muchas mujeres están infectadas solamente con los HPV, pero no tienen ninguna etapa
precursora cancerígena (Cuzick y colaboradores, 2006; Int J Cancer, 119:1095-1101). Por consiguiente, subsiste
una necesidad de un diagnóstico mejorado de carcinomas del tracto anogenital, en particular del carcinoma del
cuello uterino.

45 Wang y colaboradores, Cancer Res. 2008, 68(7), p. 2489 y siguientes, describen la identificación de unos nuevos
marcadores de la metilación en el caso de un carcinoma del cuello uterino.

50 Huang y colaboradores, Abstract #50, 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San
Diego, CA, EE.UU., abril 12-16, 2008, ISSN 0197-016X describen la hipermetilación de CIDEA y RXFP3 como unos
potenciales marcadores epigenéticos para un cáncer de ovario.

El presente invento se basa, por consiguiente, en la misión de poner a disposición un procedimiento con el cual el
carcinoma del cuello uterino y sobre todo sus etapas precursoras se puedan diagnosticar de una manera precoz y
fiable.

55 Conforme al invento, esto se consigue mediante los objetos en las reivindicaciones.

El presente invento se basa en los reconocimientos, descritos más detalladamente a continuación, del solicitante, en
lo que respecta a la conexión entre el estado de metilación de determinados genes y el desarrollo de carcinomas del
60 tracto anogenital. En ciertos carcinomas y sus etapas precursoras, en comparación con el correspondiente tejido
normal, las islas CpG ricas en citosina y guanina son metiladas frecuentemente en unas regiones situadas secuencia
arriba, en las regiones de los promotores y en las regiones de exones cercanas a los promotores, de ciertos genes.
Esta metilación de genes no tiene lugar arbitrariamente, sino que depende de la respectiva entidad del tumor
(Esteller, 2007, Hum. Mol. Genet., 16: R50-R59). Dentro del marco del invento, se llevaron a cabo por lo tanto unos
65 análisis acerca de la metilación, con el objetivo de identificar a unos genes, que estaban metilados de manera
especialmente frecuente en un ADN procedente de los frotis de unas pacientes con una CIN3 confirmada

histopatológicamente así como de unas pacientes con un carcinoma del cuello uterino. Por lo demás, los genes en un ADN procedente de frotis del cuello uterino de unas mujeres no llamativas citológicamente, pero positivas para los hr-HPV, deberían estar desde muy raramente metilados hasta no metilados en absoluto. El análisis aquí expuesto muestra, por primera vez, que la metilación de determinadas regiones de los genes ASTN1 y/o ZNF671 constituye un valioso marcador para el reconocimiento de carcinomas del tracto anogenital (de manera preferida: de las CIN2+) en una muestra (véase la Figura 2). El presente invento pone a disposición, por lo tanto, unos métodos mejorados para la detección de un carcinoma del cuello uterino y de sus etapas precursoras de grado severo (las CIN2+) en una muestra (p.ej. un frotis de células del cuello uterino, o un enjuague cervical). A pesar de que la determinación del estado de metilación de los dos genes antes mencionados, como se ha demostrado por los autores del invento, ya es sumamente expresiva para la aseguración del diagnóstico en casos médicos excepcionales, puede ser útil determinar también el estado de metilación de uno o varios genes adicionales tales como el DLX1 (distal-less homeobox 1 = homeocaja 1 sin la parte distante, un factor de la transcripción), el EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 = repeticiones del tipo de EGF 3 y dominios similares a la discoidina I), el ITGA4 (α 4-Integrin = integrina α 4) y/o el RXFP3 (relaxin/insulin-like family peptide receptor 3 = receptor peptídico 3 de la familia similar a la relaxina y a la insulina).

El presente invento se basa en una detección (directa o indirecta) del estado de metilación de los ASTN1 y ZNF671. De manera preferida, se detecta si las regiones de promotores de los genes ASTN1 y ZNF671 están hipermetiladas. Puesto que la metilación tiene lugar en la mayoría de los casos en las regiones de promotores de genes, los métodos destinados a la detección de la metilación de los genes relevantes se concentran en la mayoría de los casos en estas regiones. No obstante, también pueden estar metilados ciertos genes en otras regiones distintas de la región de promotor, puesto que las islas CpG ricas en GC no solo se encuentran allí. La detección de una metilación en tales otras regiones puede tener también una utilidad para diagnóstico y es por consiguiente también un objeto del presente invento.

En el presente invento se detecta el estado de metilación de los genes ASTN1 y ZNF671 de manera preferida en las regiones de promotores. En esta caso se investiga si unas determinadas citosinas han sido modificadas para dar 5-metil-citosina, es decir si éstas están metiladas o no. En el ADN procedente de una muestra de una mujer con una infección causada por los hr-HPV sin ninguna modificación clínica detectable, la metilación en las correspondientes posiciones del ADN es desde raramente detectable hasta no detectable en absoluto. En el caso de unas mujeres con las CIN2+, la probabilidad de una metilación en los restos de citosina escogidos es, por el contrario, alta.

La detección específica de la metilación de genes, que se presenta durante la carcinogénesis, en comparación con un tejido normal, puede complementar la detección del ADN de los HPV y, por lo tanto, puede reemplazar al ensayo Pap. La especificidad del ensayo de los HPV para la detección de las CIN2+ se puede mejorar considerablemente mediante unos análisis de la metilación realizados paralelamente (véanse las Figuras 1 y 2). Como material de partida para la detección de la metilación del ADN sirve el mismo material de frotis procedente de las personas que deben de ser ensayadas, al igual que hasta ahora para el ensayo Pap y la detección de los HPV.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Metilación del ADN en diferentes frotis Representación gráfica de la frecuencia de metilación de los genes ASTN1, DLX1, EDIL3, ITGA4, RXFP3 y ZNF671 así como de la frecuencia de metilación de en cada caso por lo menos uno de los genes en un ADN procedente de unos frotis de unas mujeres negativas para los HPV, no llamativas (n=77), de unas mujeres positivas para los HPV, histopatológicamente no llamativas (n=90), de unas pacientes con una CIN3 histopatológicamente confirmada (n=48) y de unas pacientes con un carcinoma del cuello uterino (n=65).

Figura 2: Metilación del ADN en diferentes frotis Representación gráfica de la frecuencia de metilación de los genes ASTN1 y ZNF671 así como de la frecuencia de metilación de en cada caso por lo menos uno de los genes en un ADN procedente de unos frotis de mujeres negativas para los HPV, no llamativas (n=77), de unas mujeres positivas para los HPV, histopatológicamente no llamativas (n=90), de unas pacientes con una CIN3 histopatológicamente confirmada (n=48) y de unas pacientes con un carcinoma del cuello uterino (n=65).

Por consiguiente, el presente invento se refiere a un procedimiento para la detección de un cáncer del cuello uterino o de unas etapas precursoras de éste en una muestra, que comprende la determinación del estado de metilación del ASTN1 (el gen de astrotactina 1) y del ZNF671 (el gen de la proteína de dedo de zinc 671), constituyendo una metilación detectable de uno o ambos genes un indicio acerca de un cáncer anogenital o de una etapa precursora de éste.

Opcionalmente, en el caso de unos hallazgos ambiguos, se puede determinar adicionalmente todavía el estado de metilación de uno o varios de los genes DLX1 (distal-less homeobox 1, un factor de la transcripción), EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3), ITGA4 (α 4-Integrin) o RXFP3 (relaxin/insulin-like family peptide receptor 3).

El ASTN1 (el gen de astrotactina 1: número de acceso NM_004319.1, NM_207108 contenido en NC_000001.9) es una proteína de adhesión, que desempeña un cometido importante en el caso de la migración de células neuronales. El ZNF671 (número de acceso NM_024883, contenido en NC_00019.9) es un factor de la transcripción con un típico motivo de dedo de zinc. El DLX1 (distal-less homeobox1; números de acceso NM_178120, NM_001038493, contenido en NC_000002.11) es un factor de la transcripción e influye sobre la diferenciación celular. El EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3; número de acceso NM_005711, contenido en NC_000005.8) es un ligando de integrina y desempeña un cometido esencial en el caso de la angiogénesis. Él podría ser importante en el caso de la reestructuración y del desarrollo de las paredes vasculares. Además el EDIL3 favorece la adhesión de las células endoteliales. El ITGA4 (gen de α -4-Integrina; número de acceso NM_000885, contenido en NC_000002.10) pertenece a la familia de las α -integrinas, que aparecen en común con en cada caso una β -integrina como unas proteínas integrales de las membranas. Ellas sirven como receptores para la fibronectina y desempeñan por consiguiente un cometido esencial en el caso de la adhesión celular. El RXFP3 (relaxin/insulin-like family peptide receptor 3; número de acceso NM_016568, contenido en NC_000005.8) sirve como un receptor para la relaxina 3 acoplado con la proteína G.

La expresión aquí utilizada de "cáncer anogenital" comprende todos los tipos de cáncer del tracto anogenital, por lo tanto en las regiones genital, perineal, anal y perianal, en especial éste es un carcinoma del cuello uterino.

La expresión aquí utilizada de "etapas precursoras" se refiere a unas etapas precursoras de grado severo y abarca las CIN2 y CIN3

La expresión aquí utilizada de "muestra" comprende cualquier tipo de muestras corporales, en las que se puede detectar una metilación de ADN. Ejemplos de tales muestras corporales son sangre, frotis, esputos, orina, heces, fluidos corporales, bilis, secreciones gastrointestinales, líquido linfático, médula ósea, materiales de punciones de órganos y biopsias. En particular, los frotis y las biopsias son recomendables cuando se trate de la detección de carcinomas anogenitales, p.ej. de un carcinoma del cuello uterino. Un experto en la especialidad conoce unos procedimientos y agentes auxiliares adecuados para la extracción de las muestras. Un experto en la especialidad conoce también unos procedimientos y unos reactivos para el aislamiento del ADN a partir de la muestra, p.ej. una extracción con fenol/cloroformo o mediante unos estuches comerciales.

La expresión aquí utilizada de "estado de metilación" se refiere a la hipermetilación del ADN genómico en la región de los sitios de fijación de cebadores de los pertinentes genes, de manera preferida en unas islas CpG ricas en GC en la región 5' y en la región de promotor.

El procedimiento de diagnóstico conforme al invento se utiliza para el diagnóstico de un cáncer del cuello uterino (= carcinoma cervical) y de sus etapas precursoras (en común CIN2+).

En el procedimiento conforme al invento se determina la metilación de los genes ASTN1 y ZNF671. El concepto aquí utilizado de "metilación" es sinónimo del concepto de "hipermetilación" que es habitual en la biología molecular. Él designa la metilación que se desvía del estado normal, dentro de un segmento de ADN por lo general rico en guanina y citosina y especialmente en dinucleótidos de CG, es decir una denominada isla CpG. De manera preferida, en el caso de la muestra utilizada para el procedimiento conforme al invento se trata de un frotis del cuello uterino, que proporciona unos resultados muy fiables.

En otra forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento se determina el estado de metilación de la región de promotor así como de la región 5' y de las regiones de exones cercanas a un promotor de un gen. Estas regiones son particularmente reveladoras.

De manera preferida, se detecta la metilación de un ADN, después de una precedente modificación de las citosinas no metiladas mediante el método del bisulfito por medio de una denominada PCR (reacción en cadena de la polimerasa) específica para la metilación (MSP) mediante utilización de unos adecuados pares de cebadores. En el caso del método del bisulfito, las citosinas no metiladas son transformadas en uracilo, y las citosinas metiladas (5-metilcitosina) son protegidas frente a esta transformación. El uracilo tiene otras propiedades de emparejamiento distintas de las de la citosina, es decir que se comporta como la timina. La MSP es una técnica establecida y consagrada para la detección de la metilación de ADN. LA MSP se basa en unos cebadores y eventualmente en unas sondas, que permiten realizar una diferenciación entre un ADN metilado y otro no metilado, es decir que la formación de un producto de amplificación indica la presencia de una metilación, y corresponde consiguientemente a un hallazgo positivo.

El diseño de los cebadores para la detección del estado de metilación depende de la localización y de la secuencia de las regiones de metilación de ASTN1 y ZNF671 así como de las regiones de metilación de DLX1, EDIL3, ITGA4 y/o RXFP3, en el caso de que se deba de determinar opcionalmente también el estado de metilación de estos genes.

Los cebadores específicos para una metilación utilizables en este invento para ASTN1 y ZNF671 se fijan durante el procedimiento de ensayo al ADN de una muestra, que está modificado con un bisulfito, solamente cuando éste

estaba metilado en determinadas citosinas situadas en los sitios de fijación de los cebadores. Si estas regiones no estaban metiladas antes del tratamiento con un bisulfito, entonces los cebadores tampoco se fijarán, y no resultará ningún producto de reacción. Así, la presencia de un producto de reacción apunta a una metilación de la región de ADN del respectivo gen, y por consiguiente a la posible presencia de p.ej. una CIN2+ en el caso del ADN procedente de unos frotis del cuello uterino.

Se prefiere especialmente un procedimiento de PCR en tiempo real (QMSP), que no sólo permite una determinación cuantitativa de la metilación, sino también una cuantificación de los segmentos de ADN metilados. Esta MSP se puede llevar a cabo en un procedimiento en tiempo real basado en la fluorescencia, en el que se vigila la formación del producto específico de la metilación mediante la incorporación de un colorante fluorescente, p.ej. el SYBR-Green. Con los dos procedimientos (MSP y QMSP) se puede detectar la metilación de unos genes marcadores en un fondo alto de ADN no metilado (Shames y colaboradores, 2007, Cancer Lett. 251:187-98). Los métodos basados en una PCR se pueden utilizar también en unos procedimientos con alto caudal de realización, y son por lo tanto especialmente adecuados para la prevención de un cáncer.

Se prefiere todavía más una QMSP basada en la técnica "MethyLight", utilizándose unas sondas fluorescentes para los respectivos segmentos génicos, que deben de ser investigados en cuanto a una metilación. La sonda lleva el colorante fluorescente situado junto al extremo 5' y un agente extintor situado junto al extremo 3'. Ella se fija al producto de reacción de PCR entre los dos cebadores específicos. El colorante fluorescente es liberado tan pronto como la sonda se haya degradado, después de una fijación a la secuencia diana, por medio de la actividad de 5'-3'-exonucleasa de la polimerasa de ADN. La fluorescencia medida refleja la cantidad del producto formado. Mediante el empleo de varios/as oligonucleótidos y sondas en una denominada reacción multiplex, se puede disminuir correspondientemente el número de las reacciones que se deben de llevar a cabo para las muestras que deben de ser investigadas en este procedimiento (Shames y colaboradores, 2007, Cancer Lett. 251:187-98). Unos colorantes fluorescentes adecuados y unos agentes extintores son conocidos para un experto en la especialidad, p.ej. como Fluorophor FAM, HEX[™], NED[™], ROX[™], Texas Red[™] etc., y como agente extintor TAMRA o BHQ.

En una forma especialmente preferida de realización, el procedimiento del presente invento se lleva a cabo como un experimento multiplex. Un tal experimento multiplex permite la detección de, p.ej., una CIN2+ mediante el análisis del estado de metilación de varios genes, que está en conexión, como es sabido, con la presencia de una CIN2+, en una tanda individual por cada muestra. El procedimiento multiplex ofrece algunas ventajas, puesto que el estado de metilación del conjunto de genes que debe de ser ensayado, se puede determinar en una o dos reacciones por cada muestra. Esto da lugar a un considerable ahorro de tiempo, del material de las muestras y de costes de material. En el experimento multiplex se emplean los cebadores específicos para una metilación para hasta cinco genes que deben de ser ensayados. Adicionalmente, para cada gen se emplea otro oligonucleótido específico, esto es una denominada sonda. Esta sonda lleva un colorante fluorescente junto a un extremo y está modificada de tal manera, que la fluorescencia se presente solamente cuando la sonda se haya fijado específicamente a los productos de reacción que resultan durante el experimento. Las sondas llevan diferentes grupos fluorescentes, de tal manera que todos ellos pueden ser detectados simultáneamente. El procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo también mediante la tecnología de los microconjuntos (en inglés "Microarray").

Para un experto en la especialidad son conocidos otros métodos para la determinación del estado de metilación, p.ej. los que se basan en una determinación directa de la cantidad del producto específico mediante fluorescencia. Así, para el procedimiento de diagnóstico conforme al invento se puede utilizar también la tecnología de señal molecular (en inglés "molecular beacon"). Las señales moleculares son unos oligonucleótidos, que están acoplados tanto con un fluoróforo reportero como también con un agente extintor. Los nucleótidos situados junto al extremo 5' de la sonda son complementarios con los que están situados junto al extremo 3', de tal manera que se puede formar una estructura secundaria característica para las señales moleculares. En este estado, designado como estructura de horquilla de pelo, el reportero no muestra ninguna fluorescencia, debido a su pequeña distancia al agente extintor. Mediante un adosamiento de la región de bucle a la secuencia complementaria de ADN entre los cebadores durante un ciclo de PCR, se aumenta la distancia entre el agente extintor y el reportero. Por consiguiente, se puede observar la fluorescencia del reportero

Otro método adecuado para la realización del procedimiento conforme al invento es la tecnología de escorpión (en inglés "Scorpion"). Las sondas de escorpión son unos oligonucleótidos complejos, que reúnen las propiedades de las sondas de PCR en tiempo real y de los cebadores de PCR en una molécula (Uni-Scorpion) o dos moléculas (Bi-Scorpion). De un modo parecido a las señales moleculares, ellas poseen una estructura secundaria característica con una región de vástago autocomplementaria, cuyos extremos habían sido modificados con un fluoróforo reportero y un agente extintor. Adicionalmente, estas sondas llevan junto al extremo 3' un cebador de PCR. Durante un ciclo de PCR, con una concentración creciente de ADN se puede observar una fluorescencia del reportero mediante un adosamiento de la región de bucle a una secuencia complementaria de ADN y, por consiguiente, una distancia aumentada entre el agente extintor y el reportero. Para la detección de la fijación de las diversas sondas, éstas son acopladas con unas moléculas de colorantes fluorescentes.

Además de esto, en el caso de la realización del procedimiento conforme al invento se pueden amplificar concomitantemente unos genes testigos positivos y/o negativos, p.ej. un gen testigo no metilado.

Es conocido el hecho de que la metilación de genes frecuentemente está en conexión con un bloqueo de la transcripción y de esta manera con una traducción ausente. Por consiguiente, el procedimiento conforme al invento abarca también la determinación indirecta del estado de metilación mediante una determinación de la concentración del correspondiente ARN o respectivamente de la proteína. Su detección se puede efectuar mediante unos procedimientos usuales, p.ej. (para un ARN) mediante un análisis de borrón de transferencia Northern, una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) etc., y (para proteínas) mediante unos procedimientos basados en anticuerpos o mediante unos procedimientos, que se basan en la determinación de una actividad biológica de la proteína.

El procedimiento conforme al invento puede basarse por ejemplo en las siguientes etapas:

(a) A partir de un frotis de células de la persona que debe de ser ensayada, se aísla el ADN de acuerdo con un procedimiento clásico, p.ej. con el estuche QiaAmp DNA-Mini Kit, según la prescripción del fabricante (QIAGEN, Hilden, Alemania);

(b) De manera preferida, en una segunda etapa se investiga si la muestra que debe de ser analizada contiene el ADN de los hr-HPV. Esta detección se efectúa con un procedimiento ya establecido, tal como p.ej. el procedimiento de GP5+/6+-PCR EIA (Jacobs y colaboradores, 1995, J Clin Microbiol 33:901-905). Todos los tipos de hr-HPV (HPV16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82) deberían ser determinados. Mediante la detección de un gen doméstico, p.ej. el de la β -globina o la β -actina, se asegura que en la muestra esté presente una cantidad suficiente de ADN con una calidad suficiente, que sea también amplificable;

(c) En el caso de una muestra negativa para los HPV, la presencia de una CIN2+ puede ser excluida casi en un 100 % (Cuzick y colaboradores, 2006; Int. J. Cancer. 119:1096-1101). Por lo tanto, estas muestras no tienen que ser investigadas ulteriormente. La diferenciación entre unas mujeres con un hallazgo positivo para los hr-HPV con o sin una CIN2+ se efectúa entonces a través de la determinación del estado de metilación de los genes ASTN1 y ZNF671;

(d) Para esto, el ADN de las muestras positivas para los hr-HPV se convierte químicamente según el método del bisulfito, p.ej. mediante un estuche comercial (p.ej. el estuche Methylation Gold Kit, de Zymo Research, Orange, CA, EE.UU). En este caso, mediante un tratamiento con bisulfito de sodio y una subsiguiente hidrólisis en condiciones alcalinas, todas las citosinas no metiladas de la muestra de ADN son transformadas en uracilos;

(e) El ADN relevante es amplificado mediante unos cebadores específicos para la forma metilada de los respectivos segmentos del genoma mediante una PCR, y es analizado;

(f) Para la detección de la metilación de los genes ASTN1 y ZNF671 en una PCR específica para una metilación o una QMSP se pueden emplear los siguientes cebadores específicos de la metilación:

ASTN1_F	CGTAAGCGTTGTTAGCGTAGC
ASTN1_R	CGCGAAATCGAAACGAAAACG
ZNF671_F	CGGAGGACGTAGTATTTATTCGC
ZNF671_R	CTACGTCCCCGATCGAAACG

No obstante, el procedimiento de diagnóstico conforme al invento no está restringido al empleo de estos cebadores para la detección de la metilación de los genes ASTN1 y ZNF671. Él comprende también unos cebadores con otras secuencias distintas, que pueden servir para la detección de la metilación de los dos genes.

(g) Para la detección de la metilación de los genes ASTN1 y ZNF671 mediante un análisis MethylLight, adicionalmente a los cebadores precedentemente mencionados, se emplean unas sondas fluorescentes:

ASTN1	GTAATTCGTTTGTTCGTAAGTTGTTG
ZNF671	CGTGGGCGCGGACAGTTGTCGGGAGCG

Las sondas, según sea el uso, son acopladas con unos correspondientes colorantes fluorescentes. Sin embargo, el invento no está restringido al empleo de estas sondas para la detección de la metilación de los genes ASTN1 y ZNF671. Él comprende también unas sondas con otras secuencias distintas, que pueden servir para la detección de la metilación de los dos genes.

No es obligatorio realizar ninguna cuantificación de la metilación de los genes marcadores. Es decisivo el hecho de que, p.ej. mediante una MSP o QMSP, se puede detectar por lo menos una célula con un(os) gen(es) marcador(es) metilado(s) en un fondo de 1.000 células sin gen(es) marcador(es) metilado(s).

En otra forma especialmente preferida de realización del procedimiento conforme al invento se cuantifica adicionalmente el ADN de los HPV en la muestra. Esto hace posible una estimación del número de las células

positivas para los HPV en el ADN modificado mediante el tratamiento con un bisulfito mediante una PCR con unos cebadores de oligonucleótidos específicos para los hr-HPV, adaptados correspondientemente a la modificación con un bisulfito. Los cebadores permiten de manera preferida la amplificación en la región L1 conservada del genoma de los HPV y pueden comprender, por ejemplo, las siguientes secuencias:

5

HPV-F	GGTTATAATAATGGTATTTGTTGGG
HPV_R	TAAAAAATAAACTATAAATCATATTCC

En otra forma preferida de realización se comprueba la metilación de uno o varios de los genes DLX1, EDIL3, ITGA4 y/o RXFP3. Unos cebadores utilizables para esto son:

DLX1_F	TATCGGGATTCGCGTTTGTAC
DLX1_R	CGACCGAACTAAAACCTCAACTCG
EDIL3_F	GTTTTCGGCGGTTTCGTTTC
EDIL3_R	CGAACGCTCGACTATCGC
ITGA4_F	CGAATTCGGTTTTCGAAGGGTC
ITGA4_R	CACGACCGAATAACCGAACAAAC
RXFP3_F	ATTTGGAAAGCGTTTTTCGC
RXFP3_R	CTACGTCTCTCCGCGATTATC

10

Para la detección de la metilación de los genes DLX1, EDIL3, ITGA4 y RXFP3 mediante un análisis MethyLight, adicionalmente a los cebadores precedentemente descritos, se emplean unas sondas fluorescentes:

DLX1	CGTAAACGTTAGCTGTTCTGGAAACCG
EDIL3	TCGTAGTCGTCGCGCGGAGAATA
ITGA4	TTCGATCGGTCGTTTTTATAACG
RXFP3	GCGTTTTGGGATTACGTATGTTTTTGG

15

Las sondas, según sea su utilización, son acopladas con unos correspondientes colorantes fluorescentes.

Otro objeto del presente invento es un estuche para le realización de un procedimiento conforme al invento. Un tal estuche abarca unos cebadores o pares de cebadores específicos para ciertos genes con el fin de realizar la determinación del estado de metilación de ASTN1 (el gen de astrotactina 1) y ZNF671 (el gen de una proteína de dedo de zinc, un factor de la transcripción), de manera preferida los cebadores o respectivamente los pares de cebadores precedentemente definidos de manera más detallada. En otra forma de realización, el estuche puede contener adicionalmente unos cebadores o pares de cebadores específicos para ciertos genes con el fin de realizar la determinación del estado de metilación de DLX1 (distal-less homeobox 1), EDIL3 (EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3), ITGA4 (α 4-Integrin) y/o RXFP3 (relaxin/insulin-like family peptide receptor 3), de manera preferida los cebadores o respectivamente pares de cebadores precedentemente definidos de manera más detallada.

El estuche puede contener adicionalmente también una sonda tal como la que se ha descrito precedentemente de manera más detallada y/o un par de cebadores para la detección de una infección causada por los HPV.

Finalmente, el estuche puede contener, en unos recipientes separados, adicionalmente por lo menos uno de los siguientes componentes:

- 35 (a) reactivos para el aislamiento de ADN;
- (b) enzimas para la amplificación de ADN;
- (c) bisulfito de sodio;
- (d) uno o varios tampones.

De los componentes individuales del estuche pueden presentarse uno o varios representantes.

5 Con el presente invento es posible, por consiguiente, diagnosticar precozmente unos carcinomas del cuello uterino. En particular, se pueden reconocer precozmente unas etapas precursoras de estos carcinomas. Se ha de resaltar que se puede diferenciar entre unas mujeres positivas para los hr-HPV con o sin (ning)una modificación clínicamente relevante de tejidos, p.ej una CIN2+. Además, es característico el hecho de que los resultados conseguidos mediante un procedimiento conforme al invento no están sujetos a una evaluación subjetiva, con lo que se pueden evitar los resultados falsamente negativos o bien falsamente positivos de un ensayo de Pap. Por lo demás, el presente procedimiento de diagnóstico conforme al invento se distingue por una rápida y sencilla manipulación, con lo cual se adecua para unas grandes medidas técnicas de escrutinio, en particular también en los países del tercer mundo. Por consiguiente, el presente invento proporciona una importante aportación al diagnóstico moderno de un carcinoma del cuello uterino o de sus etapas precursoras.

15 En este contexto se ha de resaltar el hecho de que, mediante la combinación conforme al invento de la determinación del estado de metilación de ASTN1 y ZNF671, se puede conseguir una sobresaliente seguridad diagnóstica del reconocimiento de lesiones provocadas por una CIN2+, que va más allá de la determinación individual de otros genes. Así, por ejemplo, el RXFP3 (Huang y colaboradores) es un marcador peor en más de 10 % que los ASTN1 y ZNF671 (véase la Fig. 1). La determinación antes mencionada del estado de metilación de los otros genes marcadores es necesaria todavía adicionalmente, por lo tanto, sólo en casos excepcionales, y ella se lleva a cabo conforme al invento para el aseguramiento del diagnóstico.

El invento se ilustra mediante el siguiente Ejemplo.

25 **Ejemplo 1**

Metilación de ADN en unos frotis

30 Se investigaron (1) unos frotis de 77 mujeres negativas para los HPV, (2) unos frotis de 90 mujeres positivas para los hr-HPV, en cuyos casos no hubo ningún indicio (histopatológico) de una modificación de tejidos; (3) unos frotis de 48 mujeres positivas para los hr-HPV con una CIN3 asegurada histopatológicamente y (4) unos frotis de 65 mujeres positivas para los hr-HPV con un carcinoma del cuello uterino asegurado histopatológicamente.

35 Los resultados se han representado en la Figura 2. La Fig. 2 muestra la frecuencia de metilación de los genes ASTN1 y ZNF671 en los conjuntos individuales. Una metilación de por lo menos uno de los genes apareció en un 87 % de las muestras de CIN3 y en un 90 % de las muestras de carcinoma del cuello uterino, por el contrario ésta apareció solamente en un 3 % de las mujeres negativas para los hr-HPV y en un 5 % de las mujeres positivas para los hr-HPV, sin modificaciones de los tejidos. Mediante la combinación de los dos genes se puede conseguir por consiguiente una seguridad del diagnóstico de casi un 100 %. Este hecho pone de manifiesto la fiabilidad del procedimiento conforme al invento.

45 La PCR para la detección tanto de una infección causada por los HPV como también para la detección de los genes metilados es muy sensible. El presente invento se basa en la respectiva determinación cualitativa del estado en cuanto a los HPV y del estado de metilación de los genes marcadores. Mediante una determinación cuantitativa del ADN de los HPV se puede definir un valor límite, que corresponde a un número mínimo de células positivas para los HPV en la muestra. De esta manera se puede aumentar ulteriormente la especificidad de la PCR específica para una metilación destinada a la detección de una CIN2+.

50 **Bibliografía**

Cuzick y colaboradores; 2006; Int J Cancer 119:1095-1101
 Esteller, 2007, Hum. Mol. Genet. 16: R50-R59
 Jacobs y colaboradores, 1995, J Clin Microbiol 33:901-905
 Shames y colaboradores, 2007, Cancer Lett. 251:187-98
 55 Yu y colaboradores, 2007, Clin Cancer Res 13: 7296 - 7304
 Wentzensen y colaboradores, 2009; Gynecologic Oncology 112, 293-299
 Huang y colaboradores, Abstract #50, 99th AACR Annual Meeting, april 12-16, 2008, San Diego

LISTADO DE LAS SECUENCIAS

<110> Universitätsklinikum Jena Körperschaft des öffentlichen Rechts und Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller
 Universität Jena
 5 <120> Procedimiento para el diagnóstico precoz de carcinomas del tracto anogenital
 <130> D 2538EP
 10 <140> EP09011941
 <141> 2009-09-18
 <160> 20
 15 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador ASTN1_F
 25 <400> 1
 cgtaagcgtt gttagcgtag c 21
 <210> 2
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de ASTN1_R
 35 <400> 2
 cgcgaaatcg aaacgaaaac g 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador de DLX1_F
 45 <400> 3
 tatcgggatt cgcgttgta c 21
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55 <220>
 <223> cebador de DLX1_R
 <400> 4
 cgaccgaact aaaactcaac tcg 23
 60 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 65

<220>
 <223> cebador de EDIL3_F

 <400> 5
 5 gtttcggcg gttcgttc 18

 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de EDIL3_R

 <400> 6
 15 cgaacgctcg actatcgc 18

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de ITGA4_F

 <400> 7
 25 cgaattcggg tttcgaagg tc 22

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 30 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de ITGA4_R

 <400> 8
 35 cacgaccgaa taaccgaaca ac 22

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de RXFP3

 <400> 9
 45 atttcggaaa gcgttttcg c 21

 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de RXFP3_R

 <400> 10
 55 ctacgtctct ccgcgattat c 21

 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 65

ES 2 431 301 T3

<220>
 <223> cebador de ZNF671_F

 <400> 11
 5 cggaggacgt agtatttatt cgc 23

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de ZNF671_R

 <400> 12
 15 ctacgtcccc gatcgaaacg 20

 <210> 13
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de ASTN1
 25
 <400> 13
 gtaattcgtt tgtttcgtaa gttgttcg 28

 <210> 14
 30 <211> 27
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 35 <223> sonda de DLX1

 <400> 14
 cgtaaacgtt agctgttctg gaaaccg 27

 <210> 15
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 45 <223> sonda de EDIL3

 <400> 15
 50 tcgtagtcgt cgcgcggaga ata 23

 <210> 16
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> sonda de ITGA4

 <400> 16
 60 ttcgatcgtt cgttttata acg 23

 <210> 17
 <211> 28
 <212> ADN
 65 <213> secuencia artificial

ES 2 431 301 T3

<220>
 <223> sonda de RXFP3

 <400> 17
 5 gcgttttggg attacgtatg tttttgg 28

 <210> 18
 <211> 27
 <212> ADN
 10 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sonda de ZNF671

 <400> 18
 15 cgtgggcgcg gacagttgc gggagcg 27

 <210> 19
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de HPV_F
 25
 <400> 19
 ggtataata atggtattg ttggg 25

 <210> 20
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador de HPV_R
 35
 <400> 20
 taaaaaataa actataaatc atattcc 27

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de un cáncer anogenital o de sus etapas precursoras en una muestra, que comprende la determinación del estado de metilación del ASTN1 (el gen de astrotactina 1) y del ZNF671 (el gen de una proteína de dedo de zinc, un factor de la transcripción), realizándose que el ASTN1 y/o el ZNF671 están metilados en una muestra positiva, y realizándose que el cáncer anogenital es el cáncer del cuello uterino.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, realizándose que la muestra es un frotis del cuello uterino.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, realizándose que se determina el estado de metilación de la región de promotor.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 3, realizándose que el estado de metilación de los genes se determina mediante una PCR específica para la metilación (MSP), realizándose que de manera preferida la MSP es una MSP cuantitativa (QMSP).
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, realizándose que la MSP cuantitativa se basa en la técnica MethyLight.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 5, realizándose que el procedimiento es un procedimiento multiplex.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, 5 o 6, realizándose que se utilizan unos pares de cebadores, que comprenden la siguiente secuencia:
 - (a) CGTAAGCGTTGTTAGCGTAGC (ASTN1_F) y CGCGAAATCGAAACGAAAACG (ASTN1_R);
 - (b) CGGAGGACGTAGTATTTATTCGC (ZNF671_F) y CTACGTCCCCGATCGAAACG (ZNF671_R).
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, realizándose que se utiliza(n) un par de cebadores o varios pares de cebadores definido(s) tal como en la reivindicación 7, y adicionalmente se utiliza por lo menos una sonda, que comprende una de las siguientes secuencias:
 - (a) GTAATTCGTTTGTTCGTAAGTTGTTTCG (ASTN1);
 - (b) CGTGGGCGCGGACAGTTGTCTGGGAGCG (ZNF671).
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 8, que comprende adicionalmente la detección de una infección causada por los HPV, realizándose que la detección de HPV se efectúa de manera preferida mediante una PCR.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, realizándose que en el caso de la PCR se utiliza un par de cebadores, que comprende las siguientes secuencias:
 - (a) GGTTATAATAATGGTATTTGTTGGG (HPV-F); y
 - (b) TAAAAAATAAACTATAAATCATATTCC (HPV_R).
11. Estuche destinado a la utilización para la detección de un cáncer anogenital o de sus etapas precursoras en una muestra, que comprende
 - unos cebadores o pares de cebadores para la determinación del estado de metilación del ASTN1 (el gen de astrotactina 1) y del ZNF671 (el gen de una proteína de dedo de zinc, un factor de la transcripción), realizándose que los cebadores se fijan específicamente a la forma metilada de unas muestras de ADN tratadas anteriormente con el método de bisulfito, y realizándose que el cáncer anogenital es un cáncer del cuello uterino.
12. Estuche de acuerdo con la reivindicación 11, que contiene los cebadores/pares cebadores que se han definido en la reivindicación 7.
13. Estuche de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, que contiene adicionalmente una sonda tal como se ha definido en la reivindicación 8.
14. Estuche de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 hasta 13, que contiene adicionalmente un par de cebadores para la detección de una infección causada por los HPV, realizándose que el par de cebadores es de manera preferida el par de cebadores que se ha definido en la reivindicación 10.
15. Estuche de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 hasta 14, que contiene, en unos recipientes separados, adicionalmente por lo menos uno de los siguientes componentes:

- (a) unos reactivos para el aislamiento de ADN;
 - (b) unas enzimas para la amplificación del ADN;
 - (c) bisulfito de sodio;
 - (d) uno o varios tampones.
- 5

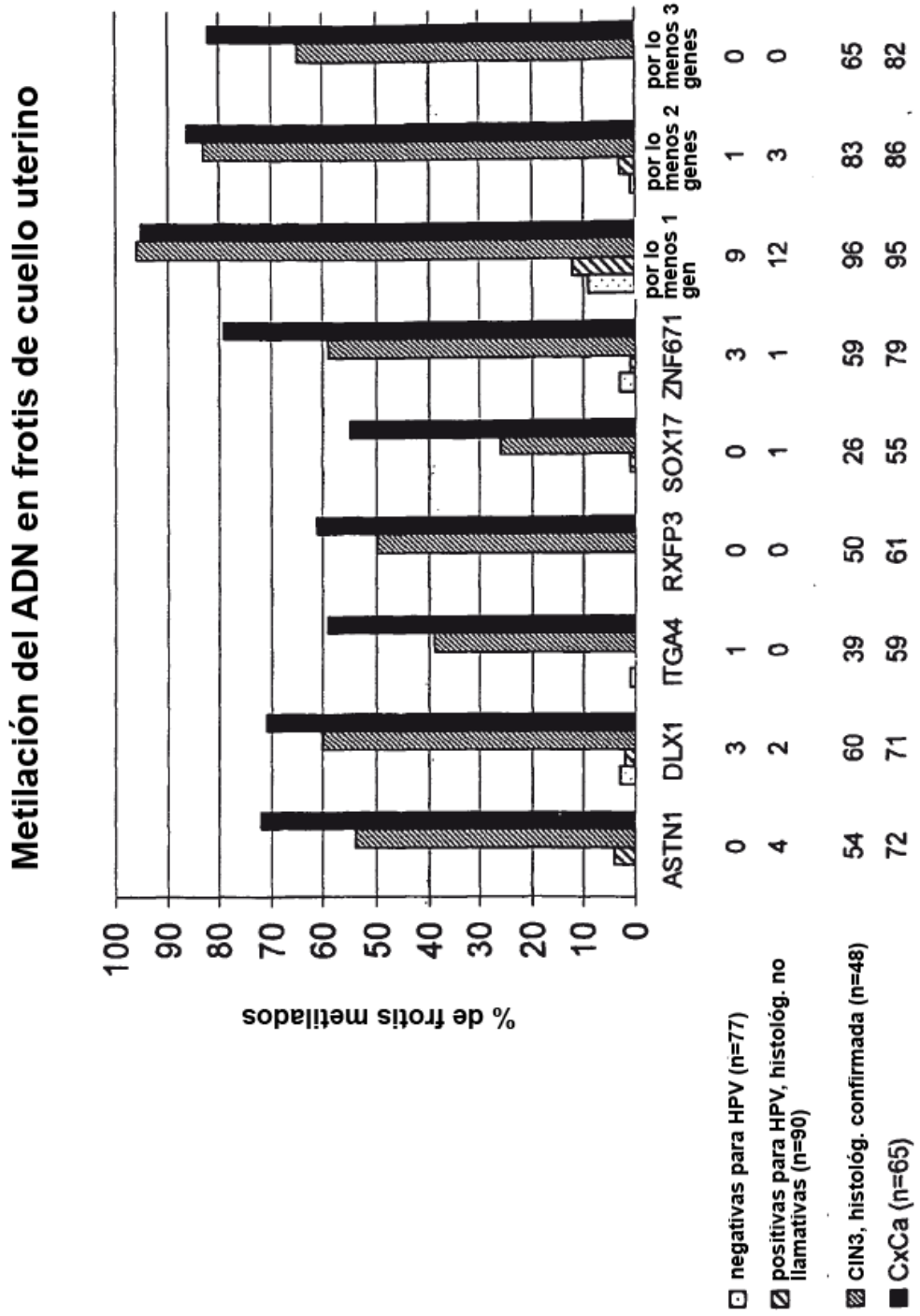


Figura 1

