

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 719**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2005 E 09100310 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2110439**

54 Título: **SENP1 como marcador para el cáncer**

30 Prioridad:

06.05.2004 US 569220 P
05.08.2004 US 599318 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

HOLCOMB, CHERIE;
HIGUCHI, RUSSELL y
SCHOENBRUNNER, NANCY

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 464 719 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

SENP1 como marcador para el cáncer

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona métodos de detección de células cancerosas detectando la cantidad de SENP1 y/o de telomerasa en una muestra.

10 Antecedentes de la invención

La mayoría de las células en el organismo humano adulto normal no se dividen. Sin embargo, las células cancerosas escapan de la regulación del crecimiento y se dividen de manera incontrolada. Para ello, deben copiar sus cromosomas incluyendo los extremos de estos cromosomas, denominados telómeros. La activación de la enzima telomerasa, que añade secuencias teloméricas a los extremos cromosómicos (revisado en Collins, K., Curr. Opin Cell Biol. 12 (2000) 378-383), puede superar esta senescencia. Véase, Bodnar, A.G., et al., Science 279 (1998) 349-352; revisado en De Lange, T., Science 279 (1998) 334-335). Las líneas celulares con telomerasa activa se transforman en inmortalizadas. *In vivo*, células previamente senescentes con telomerasa activa se convierten en tumores. La actividad telomerasa se ha detectado básicamente en todos los tipos principales de cáncer (Shay, J.W. y Bacchetti, S., Eur. J Cancer, 33 (1997) 787-791; Cong, Y.S., et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66 (2002) 407-425). Hanahan y Weinberg señalaron la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa como uno de los seis eventos clave comunes del cáncer (Cell 100 (2000) 57-70). La expresión de los genes que codifican la telomerasa (TERT y TERC) se ha propuesto como un marcador molecular para el diagnóstico, monitorización y pronóstico del cáncer.

25 El documento WO 2004/031412 desvela a SENP1 como uno de los 605 genes regulados negativamente en cáncer pancreático. El documento EP 1 108 789 desvela métodos para cuantificar la expresión del ARN de hTERT que es útil para el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

30 El documento WO 01/22920 desvela un alto número de secuencias de polinucleótidos (4277) relacionadas con cáncer de colon y colon; sin embargo, no proporciona indicaciones sobre cuáles de las 4277 secuencias de polinucleótidos es un polinucleótido relacionado con colon y cuales es un polinucleótido relacionado con cáncer de colon. Adicionalmente, en dicho documento no se indica la sensibilidad de detección o idoneidad como marcador para el cáncer de colon para ninguna de estas secuencias de polinucleótidos.

35 Sin embargo, no todos los tumores de un tipo de cáncer determinado contienen niveles detectables de actividad telomerasa. Véase, por ejemplo, Shay, J.W. y Bacchetti, S. Eur. J. Cancer, 33 (1997) 787-791); Yan, P. et al. Cancer Res. 59 (1999) 3166-3170. Por lo tanto es importante identificar marcadores moleculares que identifiquen tumores inmortalizados por un mecanismo independiente de telomerasa.

40 Breve resumen de la invención

45 La presente invención proporciona datos que demuestran que hay una asociación entre el cáncer de colon y la cantidad de expresión de SENP1. Por tanto, SENP1 proporciona un marcador útil para la detección de cáncer de colon.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente obtener la muestra biológica del individuo.

50 En algunas realizaciones, se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. En algunas realizaciones, el oligonucleótido marcado de manera detectable comprende un resto fluorescente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido marcado de manera detectable comprende un resto inactivador. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción RT-PCR es una reacción RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, la cantidad de polinucleótido se normaliza.

65 En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se determinada detectando un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polipéptido se detecta poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo.

En algunas realizaciones, SENP1 se detecta detectando la actividad SENP1.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente determinar la cantidad de telomerasa en la muestra biológica. En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando la actividad telomerasa. En algunas realizaciones, la actividad telomerasa se detecta detectando la elongación de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.

En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando un componente de telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el componente es proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana. En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando ARNm de proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana. En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido de SENP1 y un polinucleótido de telomerasa en una reacción de amplificación múltiple. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARNm de proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana. En algunas realizaciones, el método también comprende comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de telomerasa, respectivamente, en el que el patrón de SENP1 representa SENP1 en células no cancerosas y el patrón de telomerasa representa cantidades de telomerasa en células no cancerosas. En algunas realizaciones, los patrones son valores predeterminados.

En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar un pronóstico para el tratamiento del cáncer y/o para la supervivencia del individuo. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar la progresión del cáncer en el individuo.

La presente descripción también proporciona métodos para identificar un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula que exprese SENP1, en el que la célula no exprese telomerasa y la célula exprese un fenotipo neoplásico, y seleccionar un agente que inhiba un fenotipo neoplásico, identificando de este modo un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, la célula no expresa TERT. En algunas realizaciones, el método también comprende ensayar el efecto del agente seleccionado en células cancerosas seleccionadas del grupo que consiste en, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y cáncer de intestino delgado. En algunas realizaciones, el fenotipo neoplásico es crecimiento celular neoplásico. En algunas realizaciones, el fenotipo neoplásico es la expresión de un polipéptido o ARN asociado con crecimiento neoplásico. En algunas realizaciones, la célula expresa de manera endógena SENP1. En algunas realizaciones, la célula comprende un casete de expresión exógeno que codifica SENP1.

La presente descripción también proporciona métodos de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer. En algunas realizaciones, los métodos comprenden administrar a un ser humano una cantidad terapéutica de un antagonista de SENP1, en el que el individuo tiene un cáncer caracterizado por expresión aumentada de SENP1 en comparación con células no cancerosas. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático, y cáncer de intestino delgado. En algunas realizaciones, el antagonista se identifica por las etapas de: poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula que exprese SENP1, en el que la célula no exprese telomerasa y la célula exprese un fenotipo neoplásico y seleccionar un agente que inhiba un fenotipo neoplásico, identificando de este modo un antagonista de SENP1. En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de SENP1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones se proporciona un antagonista de SENP1 para su uso en medicina. En algunas realizaciones, se utiliza un antagonista de SENP1 en la fabricación de un medicamento o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado. Prefiriéndose particularmente cáncer de vejiga.

La presente descripción también proporciona inhibidores de actividad proteasa de SENP1. En algunas realizaciones, los inhibidores comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende Glu-Gln-Thr-Gly-Gly, o un mimético de la misma, en el que la Gly final termina en un aldehído. En algunas realizaciones, el inhibidor comprende una secuencia señal de localización nuclear. En algunas realizaciones, la secuencia señal de localización nuclear comprende Pro-Lys-Lys-Thr-Gln-Arg-Arg.

La presente invención también proporciona la determinación de la cantidad de SENP1 y telomerasa en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se detecta detectando un polinucleótido que codifica SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN.

En algunas realizaciones, se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un

- 5 fragmento de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. En algunas realizaciones, el oligonucleótido marcado de manera detectable comprende un resto fluorescente. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable.
- 10 En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción RT-PCR es una reacción RT-PCR cuantitativa.
- En algunas realizaciones, la cantidad de polinucleótido se normaliza.
- 15 En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se determina detectando un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polipéptido se detecta poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo.
- En algunas realizaciones, SENP1 se detecta detectando la actividad de SENP1.
- 20 En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando la actividad telomerasa. En algunas realizaciones, la actividad telomerasa se detecta detectando la elongación de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.
- 25 En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando un componente de telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el componente es proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.
- 30 En algunas realizaciones, la telomerasa se determina detectando ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.
- 35 En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido de SENP1 y un polinucleótido de telomerasa en una reacción de amplificación múltiple. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.
- 40 En algunas realizaciones, los métodos también comprenden comparar la cantidad de SENP1 y telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de telomerasa que representa cantidades de SENP1 y de telomerasa en células no cancerosas. En algunas realizaciones, los patrones son valores predeterminados.
- 45 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.
- 50 En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende un fluido corporal. En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre. En algunas realizaciones, el fluido corporal es orina. En algunas realizaciones, la muestra es de una biopsia de tejido. En algunas realizaciones, el método también comprende obtener una muestra biológica del individuo.
- 55 En algunas realizaciones, el individuo tiene o se sospecha que tiene cáncer.
- 60 En algunas realizaciones, el método también comprende registrar un diagnóstico de la presencia o ausencia de cáncer en un individuo. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar un pronóstico para el tratamiento del cáncer y/o la supervivencia del individuo. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar la progresión del cáncer en el individuo.
- 65 La presente invención también proporciona kits para detectar una célula cancerosa en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, el kit comprende
- a) al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que cuando el oligonucleótido y un polinucleótido que comprenden la SEC ID N°: 1 se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido cebra la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1;
 - b) un oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma;
 - c) al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:
 - i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
 - ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;

iii) un complemento de TERC; o

iv) un complemento de TERT;

de tal manera que cuando el oligonucleótido y el ARNm de TERC o de TERT se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de al menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT; y

5 d) un oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:

- 10 i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
 ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;
 iii) un complemento de TERC; o
 iv) un complemento de TERT;

15 En algunas realizaciones, los kits comprenden al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma; de tal manera que cuando los oligonucleótidos y un polinucleótido que comprenden la SEC ID N°: 1 se someten a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1; y al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:

- 20 i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
 ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;
 iii) un complemento de TERC; o
 25 iv) un complemento de TERT;

de tal manera que cuando los oligonucleótidos y el ARNm de TERC o de TERT se someten a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT.

30 En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, el kit comprende adicionalmente una ADN polimerasa termoestable.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos marcados de manera detectable comprenden un resto fluorescente. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos marcados de manera detectable comprenden un resto inactivador.

35 La presente invención también proporciona mezclas de reacción. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende:

40 a) al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que cuando el oligonucleótido y un polinucleótido que comprenden la SEC ID N°: 1 se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1;

45 b) un oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma;

c) al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:

- 50 i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
 ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;
 iii) un complemento de TERC; o
 iv) un complemento de TERT;

de tal manera que cuando el oligonucleótido y el ARNm de TERC o de TERT se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de al menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT; y

55 d) un oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:

- 60 i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
 ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;
 iii) un complemento de TERC; o
 iv) un complemento de TERT;

65 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que cuando los oligonucleótidos y un polinucleótido que comprenden la

SEC ID N°: 1 se someten a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1; y al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de:

- 5 i) ARN de telomerasa (TERC) humana;
- ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana;
- iii) un complemento de TERC; o
- iv) un complemento de TERT;

10 de tal manera que cuando los oligonucleótidos y el ARNm de TERC o de TERT se someten a una reacción de amplificación, los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende adicionalmente una transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende adicionalmente una ADN polimerasa termoestable. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende adicionalmente los oligonucleótidos marcados de manera detectable que comprenden un resto fluorescente. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende adicionalmente los oligonucleótidos marcados de manera detectable que comprenden un resto inactivador.

La presente invención también proporciona la determinación de la cantidad de SENP1 y telomerasa en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se detecta detectando un polinucleótido que codifica SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polinucleótido es ARN.

En algunas realizaciones, se determina la secuencia del polinucleótido. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación cuantitativa. En algunas realizaciones, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. En algunas realizaciones, el oligonucleótido marcado de manera detectable comprende un resto fluorescente. En algunas realizaciones, el oligonucleótido marcado de manera detectable comprende un resto inactivador. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con la actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). En algunas realizaciones, la reacción RT-PCR es una reacción RT-PCR cuantitativa.

40 En algunas realizaciones, la cantidad de polinucleótido se normaliza.

En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se determinada detectando un polipéptido SENP1 en la muestra. En algunas realizaciones, el polipéptido se detecta poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo.

45 En algunas realizaciones, SENP1 se detecta detectando actividad SENP1.

En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando actividad telomerasa. En algunas realizaciones, la actividad telomerasa se detecta detectando elongación de un oligonucleótido que comprende dos o más repeticiones de TTAGG.

50 En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando un componente de telomerasa en la muestra. En algunas realizaciones, el componente es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el componente es proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.

55 En algunas realizaciones, la telomerasa se detecta detectando ARNm de proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.

En algunas realizaciones, el método comprende amplificar un polinucleótido de SENP1 y un polinucleótido de telomerasa en una reacción de amplificación múltiple. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARN de telomerasa (TERC) humana. En algunas realizaciones, el polinucleótido de telomerasa es ARNm de proteína telomerasa transcriptasa inversa (TERT) humana.

60 En algunas realizaciones, el método también comprende comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de telomerasa que representa cantidades de SENP1 y de telomerasa en células no cancerosas. En algunas realizaciones, los patrones son valores predeterminados.

En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

5 En algunas realizaciones, la muestra biológica comprende un fluido corporal. En algunas realizaciones, el fluido corporal es sangre. En algunas realizaciones, el fluido corporal es orina. En algunas realizaciones, la muestra es de una biopsia de tejido. En algunas realizaciones, el método también comprende obtener una muestra biológica del individuo.

En algunas realizaciones, el individuo tiene o se sospecha que tiene cáncer.

10 En algunas realizaciones, el método también comprende registrar un diagnóstico de la presencia o ausencia de cáncer en el individuo. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar un pronóstico para el tratamiento del cáncer y/o supervivencia del individuo. En algunas realizaciones, el método también comprende registrar la progresión de cáncer en el individuo.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa una curva operativa del receptor de SENP1 normalizada frente al gen constitutivo de la proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa (PP1CA).

20 Las Figuras 2A y 2B representan el nivel de expresión de SENP1 y TERT con respecto a la expresión de GAPDH ajustada en tejido normal de colon y en tejido tumoral de colon. Por conveniencia de la representación gráfica sobre el mismo eje, la expresión de TERT se ha multiplicado por un factor de 1×10^3 .

Definiciones

25 "SENP1" se refiere a un polipéptido de proteasa específico de sentrina/SUMO o a un polinucleótido que codifica el polipéptido. Los polinucleótidos SENP1 ejemplares incluyen, por ejemplo, el número de registro del Genbank NM_014554 (SEC ID N°: 1). Los polipéptidos SENP1 ejemplares incluyen, por ejemplo, el polipéptido representado en el número de acceso del Genbank NP_055369 (SEC ID N°: 2). "SENP1" pretende incluir variantes alélicas de aquellas secuencias específicamente proporcionadas en el presente documento, así como fragmentos y mutaciones de las mismas. Los polinucleótidos SENP1 generalmente serán al menos 90 %, 95 % o 99 % idénticos a la SEC ID N° 1: o 90 %, 95 % o 99 % idénticos a secuencias de ADN que codifican la SEC ID N°: 2. Los polinucleótidos SENP1 incluyen, por ejemplo, ARNm que codifica polipéptidos SENP1, así como secuencias de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifican polipéptidos SENP1. Los polipéptidos SENP1 serán generalmente al menos 90 %, 95 % o 99 % idénticos a la SEC ID N°: 2.

35 "Telomerasa" se refiere a un complejo de ribonucleoproteína que conserva los extremos de los cromosomas (telómeros) o los polinucleótidos que codifican componentes de la ribonucleoproteína. Véase, por ejemplo, Shippen-Lentz et al., Science 247 (1990) 546; Greiden et al., Nature 337 (1989) 331. La telomerasa incluye dos componentes principales: la proteína telomerasa transcriptasa inversa (codificada por el gen, *TERT*) y el componente de ARN de telomerasa (codificado por el gen, *TERC*). Los componentes humanos equivalentes se conocen como TERT (por ejemplo, secuencia de proteínas: NP_003210 (SEC ID N°: 3), codificada, por ejemplo, por la secuencia de nucleótidos: NM_003219 (SECQ ID N°: 4)) y TERC (NR_001566 (SEC ID N°: 5)). En esta definición pretenden incluirse las variantes de corte y empalme del ARN que codifican TERT.

45 "Poner en contacto una pluralidad de agentes con una célula" se refiere a poner en contacto al menos dos agentes con una célula o células. Aunque agentes múltiples pueden ponerse en contacto con una célula o conjunto de células, la frase también incluye poner en contacto un primer agente con una primera célula o conjunto de células y un segundo agente con una segunda célula o conjunto de células, de tal manera que, por ejemplo, cada célula o conjunto de células se pone en contacto con un solo agente.

50 "Determinar la cantidad de SENP1 o telomerasa" se refiere a utilizar cualquier técnica conocida por los expertos en la materia para cuantificar en una muestra la cantidad de polipéptido o polinucleótido (por ejemplo, ARN estructural, ARNm o ADNc) de SENP1 o telomerasa o la actividad SENP1 o telomerasa.

55 Un "fenotipo neoplásico" se refiere al fenotipo de una célula neoplásica. Los fenotipos ejemplares incluyen, por ejemplo, crecimiento celular en agar blando; independencia de anclaje; inhibición por contacto y/o limitación de densidad de crecimiento reducidas; proliferación celular; transformación celular; independencia de factor de crecimiento o suero; acumulación de niveles de marcadores específicos tumorales; invasividad en Matrigel; crecimiento tumoral y metástasis *in vivo*; patrones de expresión de ARNm y proteínas de células que experimentan metástasis; y otras características de células cancerosas.

60 Una "reacción de amplificación" se refiere a cualquier reacción (por ejemplo, química o enzimática) que dé como resultado copias aumentadas de una secuencia de ácido nucleico molde o señal aumentada que indica la presencia del ácido nucleico molde. "Amplificación selectiva" o "amplificar de manera selectiva" se refieren a amplificación de secuencias particulares en una población de secuencias.

65

- La expresión “muestra biológica” incluye diversos tipos de muestras obtenidos de un organismo y que pueden utilizarse en un ensayo de diagnóstico o monitorización. La expresión incluye muestras de orina, sedimento urinario, sangre, saliva y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tal como una muestra de ensayo de biopsia o cultivos de tejidos o células derivadas de los mismos y su progenie. La expresión incluye muestras que se han manipulado de cualquier manera después de su obtención, tal como por tratamiento con reactivos, solubilización, sedimentación o enriquecimiento con determinados componentes. La expresión incluye una muestra clínica, y también incluye células en cultivo celular, sobrenadantes celulares, lisado celulares, suero, plasma, fluidos biológicos y muestras de tejidos.
- Un “antagonista” se refiere a una molécula que, cuando se pone en contacto con una célula que expresa SENP1, inhibe la actividad o expresión de SENP1. Los antagonistas son compuestos que, por ejemplo, cuando se unen, bloquean parcial o totalmente la actividad, disminuyen, impiden, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan negativamente la actividad o expresión de SENP1.
- Como se usa en el presente documento, las expresiones “ácido nucleico”, “nucleótido”, “polinucleótido” y “oligonucleótido” se refiere a cebadores, sondas, fragmentos oligoméricos a detectar, controles oligoméricos y oligómeros de bloqueo no marcados y es genérico a polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-*D*-ribosa), a polirribonucleótidos (que contienen *D*-ribosa) y a cualquier otro *N*-glucósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimida modificadas.
- Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados que incluyen, pero sin limitación, enlaces fosfotriéster, fósforoamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato formando puentes, metileno fosfonato formando puentes, fósforotioato, metilfosfonato, fósforoditioato, fósforotioato formado puentes o enlaces sulfona, y combinaciones de dichos enlaces. Los términos incluyen ácidos péptidonucleicos (PNA) y ácidos nucleicos intercalantes (INA).
- Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases biológicamente naturales (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco bases biológicamente naturales. Estas bases pueden realizar diversas funciones, por ejemplo, estabilizar o desestabilizar la hibridación; promover o inhibir la degradación de sondas; o como puntos de unión para restos detectables o restos inactivadores. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de bases derivatizadas, modificadas, no convencionales, incluyendo, pero sin limitación, N⁶-metil-adenina, N⁶-*terc*-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-*D*-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-*D* manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-*N*-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases derivatizadas, modificadas, no convencionales pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.001.611, 5.955.589, 5.844.106, 5.789.562, 5.750.343, 5.728.525 y 5.679.785.
- Además, un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.
- No se pretende limitar la presente invención por la fuente de un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede proceder de un mamífero humano o no humano, o de cualquier otro organismo, o proceder de cualquier fuente recombinante, sintetizarse *in vivo* o por síntesis química. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido u oligonucleótido puede ser ADN, ARN, ADNc, ADN-ARN, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido péptidonucleico (PNA), un híbrido o cualquier mezcla de los mismos, y puede existir en una forma bicatenaria, monocatenaria o parcialmente bicatenaria. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen tanto ácidos nucleicos como fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, los genomas de material biológico, tales como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos y similares.
- No se pretende realizar distinciones en cuanto a la longitud entre los términos ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido y oligonucleótido, y estos términos se usarán indistintamente. Estos términos incluyen ADN mono y bicatenario, así como ARN mono y bicatenario. Aunque los oligonucleótidos pueden tener cualquier longitud, éstos pueden tener una longitud menor de 500 nucleótidos, por ejemplo, 5-100, 10-100, 10-30, 15-30 o 15-50 nucleótidos.
- Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno resto de

aminoácido o más es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintético, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que actúan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que la de los aminoácidos de origen natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que la de los aminoácidos de origen natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a la de un aminoácido de origen natural.

En el presente documento los aminoácidos pueden denominarse por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Del mismo modo, los nucleótidos pueden denominarse por sus códigos de una letra comúnmente aceptados.

La frase "se hibrida selectivamente (o específicamente) con" se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula predominantemente (por ejemplo, al menos 50 % de la molécula hibridizante) con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular total o de biblioteca). Los cebadores polinucleotídicos se hibridan específicamente con un molde polinucleotídico en una reacción de amplificación (por ejemplo, a una temperatura de hibridación de aproximadamente 60 °C) en la que los cebadores amplifican el molde en una mezcla de reacción que comprende una mezcla compleja de polinucleótidos (por ejemplo, aislada de una célula) para producir un producto de amplificación que es al menos el producto de amplificación más predominante y es preferentemente el único (representando, por ejemplo, en la muestra al menos el 90-95 % de todos los productos de amplificación) producto de amplificación significativo de la reacción.

La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará predominantemente con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una amplia orientación con respecto a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidos) a la cual el 50 % de las sondas complementarias con la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de iones sodio, típicamente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de iones sodio (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente de 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente de 60 °C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También pueden obtenerse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, opcionalmente 10 veces el fondo de hibridación. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50 %, 5 x SSC y SDS al 1 %, incubando a 42 °C, o, 5x SSC, SDS al 1 %, incubando a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC y SDS al 0,1 % a 65 °C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codones máxima permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos se hibridan típicamente en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Las "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en 1X SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Los expertos habituales en la técnica reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y de lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad similar.

Para la PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 36 °C para una amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para una amplificación PCR con alta rigurosidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud y de la especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo ejemplares para amplificaciones tanto de alta como de baja rigurosidad incluyen, pero sin

limitación, una fase de desnaturalización de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 2 minutos a 90 °C - 95 °C, una fase de hibridación de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 minutos a 50 °C - 70 °C, y una fase de extensión de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 70 °C.

5 “Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región marco conservada de un gen de inmunoglobulina o sus fragmentos, que se une a, y reconoce específicamente, un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como los genes de la región variable de ininidad de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

15 Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena defina una región variable de aproximadamente 100 a aminoácidos o más, principalmente responsable del reconocimiento antigénico. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

20 Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como diversos fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo bajo los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones moderadas para degradar el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpo en cuanto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* bien químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348 (1990) 552-554).

35 Para la preparación de anticuerpos monoclonales o policlonales, puede utilizarse cualquier técnica conocida en la materia (véase, por ejemplo, Kohler & Milstein, *Nature* 256 (1975) 495-497; Kozbor et al., *Immunology Today* 4 (1983) 72; Cole et al., págs. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (1985)). Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención. Además, pueden utilizarse ratones transgénicos, u otros organismos, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Como alternativa, puede utilizarse tecnología de presentación de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348 (1990) 552-554; Marks et al., *Biotechnology* 10 (1992) 779-783).

45 La frase “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “inmunorreacciona específica (o selectivamente) con”, cuando se hace referencia a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinativa de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros componentes biológicos. Por tanto, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa con otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir que se seleccione un anticuerpo con respecto a su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales suscitados contra SENP1 para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con SENP1 y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas y alelos de SENP1. Esta selección puede realizarse sustrayendo anticuerpos que reaccionen en cruzado con moléculas SENP1 de otras especies y que reaccionan en cruzado con proteínas que no son SENP1. Para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo. Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína pueden utilizarse rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar inmunoreactividad específica). Típicamente una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o interferencia y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

60 Las expresiones “idénticas” o “100 % de identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas secuencias. Dos secuencias son “sustancialmente idénticas” o tienen un porcentaje de identidad determinado si dos secuencias tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, 60 % de identidad, opcionalmente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de identidad sobre una región específica, o cuando no es específica, sobre la secuencia completa), cuando se comparan y se alinean para una máxima correspondencia

65

sobre una ventana de comparación, o región indicada, medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. La invención proporciona oligonucleótidos que son sustancialmente idénticos a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos contiguos de polinucleótidos de SENP1 o polinucleótidos de telomerasa o complementos de los mismos.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se asignan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se asignan parámetros de programa del algoritmo de secuencia. Pueden utilizarse parámetros de programa por defecto, o como alternativa pueden asignarse parámetros. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia basándose en los parámetros del programa.

Como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación", incluye referencia a un segmento de una cualquiera de los números de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 5 a 600, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 100, más normalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que alinear las dos secuencias óptimamente. Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 (1970) 482c, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 (1970) 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (complemento 1995)).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y la similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25 (1977) 3389-3402, y en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410, respectivamente. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que corresponden o cumplen alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., citado anteriormente). Estos aciertos iniciales en palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, por ejemplo, secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos emparejados; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos con emparejamiento erróneo; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. Las extensiones de los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su máximo valor conseguido; la puntuación acumulativa llega a cero o a un valor menor, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros W , T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1989) 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas. Cualquier programa se procesa con el filtro de complejidad inferior "desactivado".

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5873-5787). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001

Descripción detalla de la invención

I. Introducción

5 No todos los tumores de un tipo de cáncer determinado contienen niveles detectables de actividad telomerasa. Véase, por ejemplo, Shay, J.W. y Bacchetti, S. Eur. J. Cancer, 33 (1997) 787-791; Yan, P. et al. Cancer Res. 59 (1999) 3166-3170. En general, el 50-100 % de los tumores de tipos diferentes tienen actividad telomerasa medible (Bryan, T.M., Nature Medicine 3 (1997) 1271-1274; Kim, N.W. et al. Science 266 (1994) 2011-2015; Bacchetti, S. and Counter, C.M. Int. J. Oncology 7 (1995) 423-432). Por tanto, aunque este fallo en detectar la actividad
10 telomerasa puede deberse a una imposibilidad para medir bajos niveles, es más probable que la expresión de la telomerasa pueda ser suficiente para producir cáncer, aunque no necesariamente. Es decir, algunos tumores pueden no expresar telomerasa activa. De hecho, se ha descubierto que algunas líneas celulares inmortalizadas y tumores pueden conservar telómeros sin telomerasa. Véase, por ejemplo, Bryan, et al. Nature Medicine 3 (1997) 1271-1274; Scheel, C. y Poremba, C. Virchows Arch 440 (2002) 573-582; McEachern, M.J., et al. Annu. Rev. Genet.
15 34 (2000) 331-358). Este alargamiento alternativo de los telómeros (ALT), al menos en algunos casos, se produce por recombinación homóloga (Dunham, M.A. et al., Nature Genetics 26 (2000) 447-450). Las células epiteliales parecen estar inmortalizadas por ALT mucho menos frecuentemente que los fibroblastos (Bryan, T.M., et al. Nature Medicine 3 (1997) 1271-1274); Mehle, C., et al., Oncogene 13 (1996) 161-166).

20 Cabe destacar, que los cánceres son mayormente epiteliales en origen, lo que explicaría los porcentajes generalmente altos de tumores que son positivos a telomerasa. Sin embargo, si los telómeros de tumores en algunas poblaciones de pacientes se conservan por un mecanismo independiente de telomerasa, esto establece el límite superior de sensibilidad que puede obtenerse para cualquier ensayo basado en telomerasa diseñado para diagnosticar o monitorizar la recurrencia de un cáncer. Determinados tumores escaparían de la detección usando
25 telomerasa como único marcador del cáncer.

Los inventores reconocen una necesidad de un método de detección de tumores que no expresan telomerasa. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la expresión aumentada de SENP1 es un
30 marcador útil para identificar cánceres que no tienen niveles de telomerasa detectables. Por tanto, detectando tanto SENP1 como telomerasa en una muestra, es posible detectar un número de cánceres significativo. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de detección de la presencia de células de cáncer de colon en una muestra biológica determinando la cantidad de SENP1 y TERT o TERC en la muestra.

Además, la presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la expresión aumentada de SENP1 es
35 un marcador útil para identificar el cáncer de colon. Adicionalmente, los inventores han demostrado que el uso tanto de SENP1 como de TERT o TERC como marcadores puede permitir una mayor sensibilidad y especificidad para detectar cánceres de colon en lugar de utilizar cualquier marcador en solitario. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos de detección de la presencia de células cancerosas de colon en una muestra biológica determinando la cantidad de SENP1 y TERT o TERC en la muestra. Por tanto, en algunas realizaciones de
40 la invención, se detecta tanto SENP1 como TERT o TERC, donde un aumento de cualquier marcador indica la presencia de cáncer de colon.

La presente invención se basa en técnicas rutinarias en el campo de genética recombinante. Los textos básicos que describen los métodos de uso general en la presente invención incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A
45 Laboratory Manual (3ª ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols en Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 2002).

II. Detección y cuantificación de SENP1 y/o telomerasa

50 La presente invención proporciona cualquiera de los métodos de cuantificación de polinucleótidos de SENP1 y/o TERT o TERC (incluyendo ARNm de SENP1, ADNc de SENP1, ARNm de TERT, ADNc de TERT, ARN de TERC, ADNc de TERC, etc.) y/o polipéptidos de SENP1 y/o TERT o TERC y/o la actividad de SENP1 y/o TERT o TERC conocidos por los expertos en la técnica de manera secuencial o simultánea en uno o múltiples ensayos. Estrategias
55 ejemplares para detectar SENP1 o TERT o TERC incluyen, por ejemplo, (a) detección de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa, incluyendo el uso de ensayos basados en hibridación de polinucleótidos y/o en reacción de amplificación; (b) detección de proteínas SENP1 o telomerasa, incluyendo el uso de ensayos basados en agentes de afinidad que implican un agente que se une específicamente a un polipéptido o polinucleótido de SENP1 o de telomerasa; y/o (c) detección de la actividad de SENP1 o de telomerasa. Todos estos métodos permiten la cuantificación posterior directa o indirecta de las dianas detectadas, es decir, SENP1 y telomerasa.

60 Típicamente, los polinucleótidos o polipéptidos de SENP1 asociados al cáncer detectados en el presente documento serán al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idénticos a la SEC ID N°: 1 o a aquellos polinucleótidos que codifican la SEC ID N°: 2 o a una o más de las secuencias de SENP1 disponibles, por ejemplo, en el GenBank (véase, por ejemplo, la secuencia de ARNm de SENP1 en NM_014554 y el polipéptido de SENP1 en NP_055369). De manera similar, los polinucleótidos (por ejemplo ARN de
65 TERT o TERC) o polipéptidos (por ejemplo, TERT) de telomerasa detectados en el presente documento serán al

menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idénticos a un polinucleótido o polipéptido de telomerasa. Los polinucleótidos o polipéptidos de SENP1 o de telomerasa detectados pueden representar formas funcionales o no funcionales de polinucleótido o polipéptido asociado al cáncer, o cualquier variante, derivado o fragmento de los mismos. Típicamente, en una muestra biológica se detectará el nivel y/o la presencia de polinucleótidos o polipéptidos asociados al cáncer.

Los métodos de detección de expresión de telomerasa pueden incluir los mismos métodos tipo a los usados para detectar SENP1 (por ejemplo, se detectan polinucleótidos tanto de telomerasa como de SENP1) o métodos diferentes (por ejemplo, se detecta la actividad telomerasa y polipéptidos de SENP1). Sin embargo, a conveniencia del usuario, puede ser deseable utilizar el mismo ensayo de detección tanto para la telomerasa como para SENP1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, pueden utilizarse reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) múltiple cuantitativa para cuantificar en una muestra la expresión tanto de SENP1 como de telomerasa. En algunas realizaciones, se realiza RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

A. Detección de expresión de ARNm

Los ensayos de detección pueden llevarse a cabo en preparaciones que contengan ARNm o ADNc generados a partir de ARNm aislado de una manera que refleje los niveles relativos de transcritos de ARNm en la muestra. Se han descrito métodos de detección de ARN de telomerasa y generalmente pueden adaptarse para detectar SENP1. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 6.582.964; 5.846.723; 6.607.898; la Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2002/0012969; y Angelopoulou et al., *Anticancer Res.* 23 (2003) 4821-4829.

1. Ensayos basados en amplificación

a. Métodos de detección

En algunas realizaciones, los niveles de ARN pueden determinarse usando reacciones de amplificación, tal como PCR. Por ejemplo, pueden utilizarse uno o más cebadores oligonucleotídicos para amplificar una región de un polinucleótido de SENP1 (por ejemplo, un ADNc de SENP1 o de telomerasa). Las reacciones de amplificación útiles para la presente invención incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, las Patentes de Estados Unidos Nos 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., ed., (1990)), amplificación con desplazamiento de cadena (SDA) (Walker, et al. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 1691-1696; Walker, *PCR Methods Appl* 3 (1993) 1-6), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, et al., *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 834-841; Vuorinen, et al., *J. Clin. Microbiol.* 33 (1995) 1856-1859), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton, *Nature* 350 (1991) 91-92), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12 (1999) 75-99); Hatch et al., *Genet. Anal.* 15 (1999) 35-40) amplificación de señal de ADN ramificado (bADN) (véase, por ejemplo., Iqbal et al., *Mol. Cell Probes* 13 (1999) 315-320) y Q-Beta Replicasa (Lizardi et al., *Bio/Technology* 6 (1988) 1197).

Aunque puede usarse cualquier tipo de reacción de amplificación, en algunas realizaciones, se usa la PCR para amplificar moldes de ADN. Los cebadores de la PCR se diseñarán típicamente para hibridarse específicamente con el polinucleótido SENP1, por ejemplo, en condiciones utilizadas en una reacción de PCR. Por ejemplo, los cebadores típicamente se hibridarán en tampones para PCR convencionales (tales como, pero sin limitación, aquellos que contienen bicina 50 mM, pH 8,0, acetato potásico 115 mM, glicerol al 8 %, acetato de manganeso 3 mM, 200 uM de cada uno de desoxiadenosina trifosfato, desoxicitidina trifosfato, desoxiguanosina trifosfato y 500 uM de desoxiuridina trifosfato, 2 Unidades de uracil *N*-glucosilasa (UNG), 10 Unidades de ADN polimerasa, 200 nM de cada cebador, directo e inverso, y opcionalmente una sonda polinucleotídica) a aproximadamente 60 °C. Generalmente, los cebadores se diseñan y/o se ensayan para impedir homología o hibridación significativa con otros polinucleótidos probablemente encontrados en la muestra biológica (por ejemplo, en el genoma humano). También se han descrito y pueden emplearse métodos de amplificación alternativos (por ejemplo, LCR, SDA, RCA, Q-Beta, etc.).

En algunas realizaciones, el ARN de SENP1 o de telomerasa puede detectarse usando reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de RT-PCR (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 2002)).

Los métodos de amplificación empleados para detectar polinucleótidos de SENP1 pueden implicar una metodología PCR cuantitativa tal como, por ejemplo, PCR en tiempo real, incluyendo RT-PCR cuantitativa. Los métodos de amplificación cuantitativa se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.180.349; 6.033.854; y 5.972.602, así como, por ejemplo, en Gibson et al., *Genome Research* 6 (1996) 995-1001; DeGraves, et al., *Biotechniques* 34 (2003) 106-110, 112-115; Deiman B. et al., *Mol Biotechnol.* 20 (2002) 163-179). Para cuantificar la cantidad de ARN específico en una muestra, puede generarse una curva patrón a partir de la transcripción no iniciada de un plásmido que contiene el gen de interés. Pueden generarse curvas patrón usando los valores de umbral (Ct) determinados en la PCR en tiempo real, que están relacionados con la concentración de ADNc inicial utilizada en el ensayo. Además, puede generarse una curva patrón para un polinucleótido patrón (por ejemplo, una secuencia previamente cuantificada). Esto permite estandarizar el contenido de ARN inicial de una muestra biológica

con la cantidad de patrón con fines comparativos. Véase, por ejemplo, *The PCR Technique: Quantitative PCR*, J. Larrick (ed.) 1997.

Un método para la detección de productos de amplificación es el ensayo PCR con 5' nucleasa (utilizando, por ejemplo, COBAS TaqMan 48 Analyzer™ (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA)). Véase, por ejemplo, Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7276-7280; Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761-3766; las Patentes de Estados Unidos Nos 6.214.979; 5.804.375; 5.487.972; y 5.210.015. Este ensayo detecta la acumulación de un producto específico de la PCR por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica puede consistir en un oligonucleótido (por ejemplo, que se hibrida con un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa o con su complemento) marcado con un colorante indicador fluorescente y un colorante inactivador. Durante la PCR, esta sonda se escinde por la actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa si, y solo si, se hibrida con el segmento que va a amplificarse. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante indicador.

En algunas realizaciones, las enzimas con actividad 5' nucleasa son polimerasas de ácido nucleico termoestables y termoactivas. Dichas polimerasas termoestables incluyen, pero sin limitación, formas naturales y recombinantes de polimerasas de una diversidad de especies de los géneros de eubacterias *Thermus*, *Thermatoga* y *Thermosipho*. Por ejemplo, polimerasas de especies de *Thermus* que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de especies de *Thermus* Z05 (Z05), ADN polimerasa de *Thermatoga marítima*, ADN polimerasa de *Thermatoga neapolitana* y especies de *Thermus* sps17 (sps17), como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 5.618.711, 5.674.738 y 5.795.762.

Otro método de detección de productos de amplificación que se basa en el uso de transferencia de energía es el método de "sondas de baliza molecular" descrito por Tyagi y Kramer (*Nature Biotech.* 14 (1996) 303-309), que también es objeto de las Patentes de Estados Unidos Nos 5.119.801 y 5.312.728. Este método emplea sondas de hibridación oligonucleotídicas que pueden formar estructuras en horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (el extremo 5' o el extremo 3'), existe un fluoróforo donador, y en el otro extremo, un resto aceptor. En el caso del método de Tyagi y Kramer, este resto aceptor es un inactivador, es decir, el aceptor absorbe energía liberada por el donador, pero entonces no emite fluorescencia por sí mismo. Por tanto, cuando la baliza está en la conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donador es detectable, mientras que cuando la baliza está en una conformación en horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donador se extingue. Cuando se emplea en PCR, la sonda de baliza molecular, que se hibrida con una de las cadenas del producto de la PCR, está en "conformación abierta" y la fluorescencia se detecta, mientras que las que quedan sin hibridar no emitirán fluorescencia (Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnol.* 14 (1996) 303-306). Como resultado, la cantidad de fluorescencia aumentará a medida que aumenta la cantidad de producto de la PCR, y por tanto puede usarse como una medida del avance de la PCR. Los expertos habituales en la técnica reconocerán que también se encuentran disponibles otros métodos de amplificación cuantitativa. Otros tipos de sondas útiles para los métodos de PCR en tiempo real incluyen sondas Scorpion™, que se encuentran disponibles en formatos "uni-marcados" y "bi-marcados" de Proligo, C (Boulder, CO). Véase también, Bates et al., *Mol. Plant Pathol.* 2 (2001) 275-280.

En otro ejemplo adicional, pueden utilizarse dos cebadores y una sonda de la invención para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana usando amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). En algunos métodos NASBA, se utilizan tres enzimas, que incluyen, la transcriptasa inversa, la ARN polimerasa de T7 y la RNasa H. El producto de amplificación final es ARN monocatenario con una polaridad opuesta a la del ácido nucleico a detectar. El producto de ARN amplificado puede detectarse en algunas realizaciones mediante el uso de una sonda de captura específica de diana unido a partículas magnéticas junto con una sonda detectora marcada con rutenio y un instrumento (lector NucliSens; bioMérieux) capaz de medir la electroquimioluminiscencia (ECL). De manera alternativa, el ARN amplificado por NASBA puede detectarse específicamente en tiempo real incluyendo sondas de baliza molecular en la reacción de amplificación, como se ha descrito anteriormente. Una orientación adicional sobre el uso de cebadores y sondas de la invención puede encontrarse en los artículos de Compton, *Nature* 350 (1991) 91-92 y Kievits et al., *J. Virol. Methods* 35 (1991) 273-286.

Otro ejemplo de métodos que utilizan un cebador de ácido nucleico y una sonda para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana implica el uso de nanopartículas. En dichos métodos, dos oligonucleótidos, tal como una sonda o un cebador de la invención, que pueden hibridarse en diferentes regiones de un ácido nucleico a detectar, se unen mediante enlace covalente con una nanopartícula. Las nanopartículas se ponen en contacto con un ácido nucleico diana en condiciones de hibridación. Si el ácido nucleico está presente, el ácido nucleico se unirá a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas, produciendo un complejo de peso molecular grande que puede detectarse. El complejo puede detectarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación. En determinadas realizaciones, el complejo se detecta por precipitación del complejo. Puede encontrarse orientación adicional sobre los métodos de uso de nanopartículas junto con los cebadores y sondas de la invención en Taton et al., *Science* 289(2000) 1757-1760 y en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.506.564, 6.495.324, 6.417.340, 6.399.303 y 6.361.944.

En otro ejemplo adicional, puede usarse la amplificación por círculo rodante ("RCA") como parte de un método para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana. En determinadas realizaciones de métodos RCA, un círculo de ADN se amplifica mediante extensión con polimerasa de un cebador complementario. Cualquiera de los cebadores o sondas de la invención pueden usarse en dichos métodos. Los métodos de circularización de ADN son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ligamiento de los extremos de una molécula de ADN en condiciones que favorezcan el ligamiento intramolecular. Después, el producto concatémico monocatenario puede detectarse por cualquier método de detección de un ácido nucleico conocido por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, el producto concatémico puede detectarse usando una sonda de la invención marcada de manera detectable. En el presente documento se describen ampliamente otros ejemplos de métodos de detección de un ácido nucleico de secuencia conocida. En otras realizaciones de RCA, puede usarse un segundo cebador que es complementario al producto concatémico. Este cebador permite la amplificación exponencial de las secuencias presentes en el molde de ADN circular. Los productos de la amplificación pueden incluso detectarse, por ejemplo, usando una sonda de la invención marcada de manera detectable. En las Patentes de Estados Unidos Nos 6.344.329, 6.350.580, 6.221.603, 6.210.884, 5.648.245 y 5.714.320 y en el documento WO95/35390, puede encontrarse orientación adicional sobre el uso de cebadores y sondas de la invención en métodos de RCA para detectar un ácido nucleico diana.

En otro ejemplo de dichos métodos, un ácido nucleico diana puede detectarse y cuantificarse usando Amplificación con Desplazamiento de Cadena ("SDA"). En dichos métodos, los ácidos nucleicos amplificados se detectan por incorporación de un cebador monocatenario que comprende un resto fluorescente, un resto inactivador y un sitio de restricción modificado genéticamente que separa los dos restos. Un experto en la materia puede reconocer fácilmente cómo modificar cualquiera de los cebadores y sondas de la invención para uso en SDA.

En una primera reacción de amplificación usada en SDA, el cebador se usa para amplificar un ácido nucleico diana en presencia de, por ejemplo, tio-dCTP, incorporando así el cebador en el producto de amplificación. Después, puede usarse una endonucleasa de restricción para romper el sitio de restricción en el cebador. La endonucleasa de restricción no puede cortar los dos extremos del producto de amplificación debido a la incorporación de tio-dCTP en el producto de amplificación. Finalmente, el extremo 3' del cebador creado por la rotura puede usarse para cebar una nueva reacción de polimerización, desplazando así la parte de la cadena 3' a la rotura de la cadena molde. El desplazamiento de la cadena separa el resto fluorescente del resto inactivador, impidiendo así la extinción de la fluorescencia emitida por el resto fluorescente. Por lo tanto un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa puede detectarse y/o cuantificarse midiendo la presencia y/o la cantidad de fluorescencia. En Little et al., Clin. Chem. 45 (1999) 777-784 y en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.528.254 y 6.528.632 puede encontrarse orientación adicional sobre la selección y modificación de cebadores y sondas para su uso en SDA.

En otro ejemplo, un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa puede detectarse y cuantificarse usando amplificación mediada por transcripción ("TMA"). La TMA es un sistema de amplificación de transcripción de ARN que utiliza la ARN polimerasa y la transcriptasa inversa para amplificar los ácidos nucleicos a detectar. En el método, se utiliza un cebador de la invención con un promotor para la ARN polimerasa para cebar la transcripción inversa de un ARN diana. Después, la actividad RNasa de la transcriptasa inversa degrada el molde de ARN, liberando la cadena de ADNc. La síntesis de la segunda cadena se ceba con un segundo cebador de la invención y se cataliza a través de la transcriptasa inversa. Después, la ARN polimerasa reconoce el promotor sintetizado en la segunda cadena y cataliza múltiples ciclos de transcripción de ARN de la segunda cadena. El producto de ARN puede después detectarse o puede servir como un molde para otra ronda de amplificación.

El producto ARN de la TMA puede después detectarse y cuantificarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. En determinadas realizaciones, el producto de ARN puede detectarse con una sonda de la invención. En otras realizaciones, el producto ARN puede detectarse con una sonda de la invención que se ha marcado con un marcador de éster de acridina (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA). Dichos marcadores pueden eliminarse químicamente de sondas no hibridadas mientras que los marcadores sobre sondas hibridadas permanecen inalterados. Por tanto, en dichas realizaciones, la presencia de un ácido nucleico diana puede detectarse detectando la presencia de un marcador de éster de acridina. Una orientación adicional en cuanto al uso de los cebadores y sondas de la invención en los métodos basados en TMA puede encontrarse en Arnold et al., Clin. Chem. 35 (1989) 1588-1594; Miller et al., J. Clin. Microbiol. 32 (1994) 393-397; y en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.335.166 y 6.294.338. En otras realizaciones, cualquier ensayo conocido por un experto en la técnica que utilice un cebador o una sonda de ácido nucleico sencillo que pueda hibridarse con un ácido nucleico para detectar el ácido nucleico puede usarse para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa. Por ejemplo, un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa puede detectarse usando un cebador para iniciar una reacción de extensión con cebador. La extensión satisfactoria del cebador por una polimerasa de ácido nucleico indica la presencia del polinucleótido de SENP1 o de telomerasa. En las Patentes de Estados Unidos Nos 6.440.707, 6.379.888, 6.368.803, 6.365.724, 6.361.944, 6.352.827, 6.326.145, 6.312.906, 6.268.128, 6.261.784, 6.177.249, 6.140.055, 6.130.047, 6.124.090, 6.121.001, 6.110.677, 6.054.279, 6.022.686, 5.981.176, 5.958.700, 5.945.283, 5.935.791, 5.919.630, 5.888.739, 5.888.723, 5.882.867, 5.876.924, 5.866.336, 5.856.092, 5.853.990, 5.846.726, 5.814.447, 5.808.036, 5.800.989, 5.795.718, 5.792.614, 5.710.028, 5.683.875, 5.683.872, 5.679.510, 5.641.633, 5.597.696, 5.595.890, 5.571.673, 5.547.861, 5.525.462, 5.514.546, 5.491.063, 5.437.977, 5.294.534, 5.118.605, 5.102.784, 4.994.373, 4.851.331, 4.767.700 pueden encontrarse otros ejemplos de métodos de detección con

cebador o sonda sencillos que describen métodos que pueden usarse, como se describe o adaptarse por un experto en la técnica para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa.

b. Cebadores de la invención

Los cebadores oligonucleotídicos ejemplares pueden comprender una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 u otra cantidad de nucleótidos contiguos de polinucleótidos de SENP1 o polinucleótidos de telomerasa (por ejemplo, TERC o TERT) o complementos de los mismos.

La longitud y composición de la sonda puede seleccionarse para proporcionar estabilidad termodinámica suficiente para garantizar la hibridación de la sonda con el ácido nucleico molde en las condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección a realizar. Por ejemplo, sondas con nucleótidos derivatizados, modificados, no convencionales pueden ser más largas o más cortas que aquellas con nucleótidos convencionales teniendo al mismo tiempo propiedades de hibridación termodinámica similares. Ejemplos de dichas bases no convencionales pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.320.005, 6.174.998, 6.001.611 y 5.990.303. Como otro ejemplo, sondas con secuencias ricas en G/C pueden hibridarse con secuencias diana a temperaturas más elevadas que una sonda de similar longitud con secuencias ricas en A/T.

c. Sondas de la invención

Las sondas oligonucleotídicas ejemplares, marcadas de manera detectable, pueden comprender una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 u otra cantidad de nucleótidos contiguos de polinucleótidos de SENP1 o polinucleótidos de telomerasa (por ejemplo, TERC o TERT) o complementos de los mismos.

Además de la secuencia de nucleótidos sonda como se describe en el presente documento, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otros restos que no inhiban los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otros restos que faciliten los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la sonda puede bloquearse en su extremo 3' para impedir que la sonda cebe la polimerización no deseada de ácido nucleico. Además, en la sonda puede haber restos que estabilicen o desestabilicen la hibridación de la sonda o fragmentos de la sonda con la secuencia de nucleótidos. Las sondas de la invención también pueden comprender nucleótidos derivatizados, modificados, no convencionales, como se ha definido anteriormente.

En determinadas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquier resto detectable conocido por un experto en la técnica sin limitación. Además, el resto detectable puede detectarse mediante cualquiera de los medios conocidos por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, el resto detectable puede detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos o químicos.

En la técnica se conocen diversos restos detectables que pueden usarse para detectar las sondas de la invención, así como métodos para su unión con la sonda, e incluyen, aunque sin limitación, enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante) y sustratos enzimáticos, restos radioactivos, restos fluorescentes, cromóforos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, tales como Origin™ (Igen, Rockville, MD), ligandos que tienen compañeros de unión específicos, o cualquier otros marcadores que puedan interactuar entre sí para potenciar, alterar o disminuir una señal. Por supuesto, si se realiza una reacción 5' nucleasa usando una ADN polimerasa termoestable a elevadas temperaturas, en algunas realizaciones, el resto detectable no se degrada o, de otra manera, se vuelve no detectable por dichas temperaturas elevadas. En determinadas realizaciones, el resto detectable puede ser un resto fluorescente. El resto fluorescente puede ser cualquier resto fluorescente conocido por un experto en la técnica sin limitación. En algunas realizaciones, se utilizan restos fluorescentes con amplios cambios de Stokes, lo que permite el uso de fluorómetros con filtros en lugar de monocromómetros y aumentar la eficacia de la detección. En determinadas realizaciones, el resto fluorescente puede seleccionarse del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la coumarina (Molecular Probes, Inc., Eugene, Or), colorantes de la familia de la rodamina (Integrated DNA Technologies, Inc.), colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la esquaraina, colorantes de la familia de lantánidos quelados y colorantes de la familia BODIPY® (Molecular Probes, Inc.). En algunas realizaciones, el resto fluorescente es 6-carboxifluoresceína (FAM™) (Integrated DNA Technologies, Inc.). Otros ejemplos de restos fluorescentes que pueden usarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.406.297, 6.221.604, 5.994.063, 5.808.044, 5.880.287, 5.556.959 y 5.135.717. En otras realizaciones, el resto detectable puede ser un resto detectable distinto de un resto fluorescente. Entre los restos radioactivos, se prefieren los compuestos marcados con ³²P. Cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación puede usarse para introducir ³²P en una sonda. Por ejemplo, una sonda puede marcarse con ³²P marcando el extremo 5' con una quinaso o por inserción al azar por traducción por

rotura. Los restos detectables que son enzimas pueden detectarse típicamente por su actividad. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina puede detectarse midiendo la fluorescencia producida por la acción de la enzima sobre compuestos de sustratos apropiados. Cuando se utiliza un miembro de compañeros de unión específicos como resto detectable, la presencia de la sonda puede detectarse detectando la unión específica de una molécula con el miembro del compañero de unión específico. Por ejemplo, un antígeno que puede unirse a la sonda, y un anticuerpo monoclonal específico para ese antígeno pueden usarse para detectar la presencia del antígeno y por lo tanto la sonda. Otros compañeros de unión específicos que pueden usarse como restos detectables incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A y numerosas otras parejas receptor-ligando bien conocidas en la técnica. Otros ejemplos más de restos detectables que no son restos fluorescentes pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.525.465, 5.464.746, 5.424.414 y 4.948.882.

La descripción anterior de restos detectables no pretende clasificar los distintos marcadores en distintas clases, ya que el mismo marcador puede actuar en distintos modos diferentes. Por ejemplo, puede actuar como un resto radioactivo o como un reactivo con densidad electrónica. La peroxidasa de rábano picante puede actuar como una enzima o como un antígeno para un anticuerpo monoclonal. Además, pueden combinarse diversos restos detectables para un efecto deseado. Por ejemplo, podría marcarse una sonda con biotina y detectar su presencia con avidina marcada con ^{125}I , o con un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con peroxidasa de rábano picante. Otras permutaciones y posibilidades serán obvias fácilmente para los expertos habituales en la técnica y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

El método de unión o conjugación del resto detectable con la sonda depende, por supuesto, del tipo de resto o restos detectables usados y de la posición del resto detectable en la sonda.

El resto detectable puede unirse a la sonda directa o indirectamente mediante diversas técnicas. Dependiendo del tipo exacto de resto detectable utilizado, el resto detectable puede localizarse en el extremo 5' o 3' de la sonda, localizarse internamente en la secuencia de nucleótidos de la sonda, o unirse a brazos espaciadores de diversos tamaños y composiciones para facilitar interacciones de señal. Utilizando reactivos de fósforoamidita disponibles en el comercio, pueden producirse oligonucleótidos que contengan grupos funcionales (por ejemplo, tioles o aminas primarias) en cualquier extremo mediante una fósforoamidita protegida apropiadamente y pueden unirse a un resto detectable del mismo usando protocolos descritos, por ejemplo, en Innis et al. (eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990).

En la Patente de Estados Unidos N° 4.914.210 se describen métodos para introducir reactivos funcionalizadores de oligonucleótidos para introducir uno o más restos sulfhidrilo, amino o hidroxilo en la secuencia sonda de oligonucleótidos, típicamente en el extremo 5'. Puede introducirse un grupo fosfato en 5' como un radioisótopo usando polinucleótido quinasa y [gamma- ^{32}P] ATP para proporcionar un grupo indicador. Puede añadirse biotina en el extremo 5' haciendo reaccionar un resto de aminotimidina o un conector de alquilamino, introducido durante la síntesis, con un éster *N*-hidroxisuccinimida de biotina. En la Patente de Estados Unidos N° 5.118.802 pueden encontrarse otros métodos para unir un resto detectable, incluyendo un resto fluorescente, con la sonda.

También es posible unir un resto detectable en el extremo 3' de la sonda empleando, por ejemplo, polinucleótido transferasa terminal para añadir un resto deseado, tal como, por ejemplo, cordicepina ^{35}S -dATP y dUTP biotinilado. Los derivados de oligonucleótidos son también restos detectables que pueden usarse en las sondas, métodos y kits de la presente invención. Por ejemplo, eteno-dA y eteno-A son nucleótidos de adenina fluorescentes conocidos que pueden incorporarse en una sonda de oligonucleótidos. De manera similar, el eteno-dC es otro análogo que podría usarse en la síntesis de sondas. Las sondas que contienen dichos derivados de nucleótidos pueden degradarse para liberar mononucleótidos que son mucho más fuertemente fluorescentes que la sonda intacta mediante, por ejemplo, una polimerasa con actividad 5' a 3' nucleasa.

En determinadas realizaciones de la invención, una sonda puede marcarse con más de un resto detectable. En dichas realizaciones determinadas, cada resto detectable puede unirse individualmente a bases diferentes de la sonda. En otras realizaciones, más de un resto detectable puede unirse a la misma base de la sonda.

En determinadas realizaciones, el resto detectable puede unirse al extremo 5' de la sonda. En otras realizaciones, el resto detectable puede unirse a la sonda en un resto que está entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40 u otro número de restos desde el extremo 5' de la sonda. El resto detectable puede unirse a cualquier parte de un resto de la sonda. Por ejemplo, el resto detectable puede unirse a un resto de azúcar, fosfato, o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, el resto detectable puede unirse entre dos restos de la sonda.

En determinadas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender un resto fluorescente y un resto inactivador. En dichas realizaciones el resto fluorescente puede ser cualquier resto fluorescente conocido por un experto en la técnica, como se ha descrito anteriormente. Además, el resto inactivador puede ser cualquier resto inactivador conocido por un experto en la técnica sin limitación. En determinadas realizaciones, el resto inactivador puede seleccionarse del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la coumarina

colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la esquaraina, colorantes de la familia de lantánidos quelados, colorantes de la familia BODIPY® y colorantes inactivadores no fluorescentes. En determinadas realizaciones, el resto inactivador no fluorescente puede ser un colorante de la familia BHQ™, Iowa Black™ o Dabcyl (Integrated DNA Technologies, Inc.) Otros ejemplos de restos inactivadores específicos incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, TAMRA (*N,N,N',N'*-tetrametil-6-carboxirodamina) (Molecular Probes, Inc.), DABCYL ácido (4(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), Iowa Black™ (Integrated DNA Technologies, Inc.), Cy3™ (Integrated DNA Technologies, Inc.) o Cy5™ (Integrated DNA Technologies, Inc.). En una realización preferida, el resto inactivador es Cy5™. Otros ejemplos de restos inactivadores que pueden usarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.399.392, 6.348.596, 6.080.068 y 5.707.813.

En determinadas realizaciones, el resto inactivador puede unirse al extremo 3' de la sonda. En otras realizaciones, el resto inactivador puede unirse a la sonda en un resto que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40 u otro número de restos a partir del extremo 5' de la sonda. En una realización preferida, el resto fluorescente está unido al extremo 5' de la sonda y el resto inactivador está unido a un resto que está dentro de aproximadamente 9 restos del extremo 5' de la sonda. El resto inactivador puede estar unido a cualquier parte del resto de la sonda. Por ejemplo, el resto inactivador puede estar unido a un resto de azúcar, fosfato o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, el resto inactivador puede unirse entre dos restos de la sonda.

Aunque sin pretender quedar vinculado a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se piensa que cuando la sonda está intacta, puede absorberse un fotón emitido por el resto fluorescente y por tanto inactivarse por el resto inactivador. Después, el resto inactivador puede liberar la energía del fotón como un fotón de longitud de onda diferente o como calor. Por tanto, el resto inactivador también puede ser un resto fluorescente. Como se ha descrito anteriormente, este fenómeno se denomina transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"). La escisión de la sonda entre el resto fluorescente y el inactivador produce una reducción en la extinción de la fluorescencia emitida por el resto fluorescente mediante el resto inactivador.

Generalmente, la transferencia de energía entre el resto fluorescente y el resto inactivador depende de la distancia entre el resto fluorescente y el resto inactivador y de la distancia de transferencia crítica del par resto fluorescente-resto inactivador particular. La distancia de transferencia crítica es tanto característica como constante para un resto fluorescente determinado emparejado con un resto inactivador determinado. Además, la relación espacial del resto fluorescente en referencia al resto inactivador puede determinarse de manera más sensible cuando la distancia de transferencia crítica del par resto fluorescente-resto inactivador está próxima a la distancia entre el resto fluorescente y el resto inactivador. Por consiguiente, el experto en la técnica puede seleccionar el resto fluorescente y el resto inactivador para que haya una distancia de transferencia crítica que sea próxima a la distancia que separa el resto fluorescente del resto inactivador en la sonda. Las distancias de transferencia críticas de pares particulares de resto fluorescente-resto inactivador son bien conocidas en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en un artículo de Wu y Brand, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 1-13.

Otros criterios de selección de pares particulares de resto fluorescente-resto inactivador incluyen, por ejemplo, el rendimiento cuántico de emisión fluorescente por el resto fluorescente; la longitud de onda de fluorescencia emitida por el resto fluorescente; el coeficiente de extinción del resto inactivador; la longitud de onda de fluorescencia, si hubiera, emitida por el resto inactivador; y el rendimiento cuántico de emisión fluorescente, si hubiera, por el resto inactivador. Además, si el resto inactivador también fuese un resto fluorescente, el resto inactivador y el resto fluorescente podrían seleccionarse de tal manera que la fluorescencia emitida por uno pudiese diferenciarse fácilmente de la fluorescencia emitida por el otro. Una orientación adicional sobre la selección de pares particulares de resto fluorescente-resto inactivador puede encontrarse en un artículo de revisión de Klostermeier y Millar, *Biopolymers* 61 (2002) 159-179.

Combinaciones ejemplares de restos fluorescentes y restos inactivadores que pueden usarse en este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitación, el resto fluorescente rodamina 590 y el resto inactivador cristal violeta. Una combinación preferida de restos fluorescentes e inactivadores es el resto fluorescente 6-carboxifluoresceína y el resto inactivador Cy5™. Otros ejemplos de pares de resto fluorescente-resto inactivador que pueden usarse en las sondas, métodos y kits de la invención pueden encontrarse en la Patente de Estados Unidos Nº 6.245.514. Ejemplos de moléculas que pueden usarse como restos fluorescentes o inactivadores en FRET incluyen fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 2'7'-dimetoxii-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, rodamina, 6-carboxirodamina, 6-carboxi-X-rodamina y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS). Si un resto fluorescente es un donador o un aceptor se define por su espectro de excitación y emisión y por el resto fluorescente con el que se empareja. Por ejemplo, FAM™ se excita más eficazmente por luz con una longitud de onda de 488 nm, y emite luz con un espectro de 500 a 650 nm y con un máximo de emisión de 525 nm. Por consiguiente, FAM™ es un resto fluorescente adecuado para su uso, por ejemplo, con TAMRA como resto inactivador, que tiene un máximo de excitación a 514 nm.

2. Ensayos basados en hibridación

Los expertos en la técnica conocen métodos de detección y/o cuantificación del nivel de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa (ARN o ADNc preparados a partir de los mismos), usando técnicas de hibridación de ácidos nucleicos (véase, Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Press, Nueva York). Las muestras biológicas pueden explorarse usando una sonda específica de SENP1 o telomerasa. Dichas sondas corresponden en secuencia a una región del ARN de SENP1 o telomerasa, o su complemento. En condiciones definidas, la hibridación específica de dicha sonda para ensayar ácido nucleico es indicativa de la presencia de polinucleótido de SENP1 o de telomerasa en una muestra. Las condiciones definidas serán suficientes para permitir la hibridación de la sonda con su diana sin hibridarse significativamente con otros polinucleótidos en una mezcla compleja (por ejemplo ADN genómico de una célula). Si se desea, puede utilizarse más de una sonda en la misma muestra de ensayo. La sonda puede comprender solo 8, 15, 20, 50 o 100 u otra cantidad de nucleótidos de la secuencia de ARN de SENP1 o telomerasa o su complemento puede comprender hasta 500, 1 kb o toda la secuencia de ARN o su complemento. En algunas realizaciones, la sonda tiene una longitud de entre 12 y 100 nucleótidos o 16-50 nucleótidos o 18-40 nucleótidos.

Un método para evaluar la presencia, ausencia y/o cuantificar polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa implica una transferencia de Northern: el ARNm se aísla de una muestra biológica determinada, se separa por electroforesis y se transfiere desde el gel a un soporte sólido (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa). Después, las sondas de SENP1 o de telomerasa marcadas se hibridan con la membrana para identificar y/o cuantificar el ARNm. La expresión de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa también puede analizarse mediante otras técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, transferencia puntual, hibridación *in situ*, protección con RNasa, exploración con micromatrices de ADN y técnicas similares.

Un método alternativo es muy útil cuando se usan grandes cantidades de sondas diferentes es un formato de transferencia puntual "inversa", en el que la secuencia amplificada contiene un marcador, y la sonda está unida al soporte sólido. Este formato sería útil si los métodos de ensayo de la presente invención se utilizasen como uno de una batería de métodos a realizar simultáneamente en una muestra. En este formato, las sondas no marcadas se unen a la membrana y se exponen a la muestra marcada en condiciones de hibridación apropiadamente rigurosas. La muestra marcada no hibridada se elimina después por lavado en condiciones adecuadamente rigurosas, y el filtrado se monitoriza después para determinar la presencia de secuencias unidas.

Ambos ensayos de transferencia puntual inversa y directa pueden realizarse convenientemente en una placa de microtitulación; véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 07/695.072 y la Patente de Estados Unidos N° 5.232.829. Las sondas pueden unirse a albúmina de suero bovino (BSA), por ejemplo, que se adhiere a la placa de microtitulación, inmovilizando de esta manera la sonda. Otro ejemplo de uso de una sonda de la invención para detectar un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.383.756, que proporciona un método para detectar un ácido nucleico unido a una membrana.

En otro ejemplo, puede detectarse un polinucleótido de SENP1 o de telomerasa usando métodos basados en ADN ramificado. En dichos métodos, se construye un monómero dendrímérico de dos cadenas de ADN que comparten una región de complementariedad de secuencia localizada en la parte central de cada cadena. Cuando las dos cadenas se hibridan para formar el monómero, la estructura resultante tiene un centro bicatenario central bordeado por cuatro extremos monocatenarios. Un dendrímero puede ensamblarse a partir de monómeros por hibridación entre sí de los extremos monocatenarios de los monómeros, aunque dejando al mismo tiempo muchos extremos monocatenarios libres. Estos extremos monocatenarios libres pueden tener las secuencias de cualquiera de los cebadores o sondas de la invención. Un dendrímero puede marcarse de manera detectable con cualquier resto detectable conocido por un experto en la técnica sin limitación, como se ha descrito anteriormente en relación con las sondas de la invención.

Después, los dendrímeros pueden usarse como una sonda, por ejemplo, en los ensayos de "transferencia puntual" descritos a continuación. Además, un dendrímero puede usarse como una sonda en cualquier método conocido por un experto en la técnica en el que la sonda se detecta directamente. Una sonda se detecta directamente cuando la presencia de la sonda puede determinarse sin ninguna reacción o modificación posterior, tal como una hibridación de transferencia puntual o Southern. Una orientación adicional sobre la selección y uso de dendrímeros como sondas puede encontrarse en la Patente de Estados Unidos N° 6.261.779 y en Nilsen et al., *J. Theoretical Biology* 187 (1997) 273-284; Capaldi et al., *Nucleic. Acids Res.*, 28 (2000) 21 e; Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8281-8282; y Wang et al., *Electroanalysis* 10 (1998) 553-556.

B. Detección de ADN de SENP1

En algunos casos, sería ventajoso detectar y analizar ADN genómico codificante de SENP1. Por ejemplo, puede ser útil determinar la estructura y/o secuencia de nucleótidos de una secuencia genómica codificante de SENP1 o que comprenda secuencias reguladoras de SENP1 para identificar mutaciones asociadas con cáncer u otras enfermedades. De manera similar, pueden analizarse secuencias de ADNc de SENP1 y/o secuenciarse los nucleótidos.

En algunos casos, se analizan secuencias genómicas de SENP1 para identificar polimorfismos (por ejemplo, variantes) entre alelos producidos normalmente y alelos asociados con cáncer. Como tipos de análisis moleculares se incluyen, pero sin limitación: análisis RFLP, análisis basados en PCR, análisis SNP, etc.

5 C. Detección y cuantificación de polipéptidos de SENP1 o de telomerasa

Además de la detección de polinucleótidos de SENP1 o de telomerasa, también puede utilizarse ensayos de afinidad tales como inmunoensayos para detectar polipéptidos de SENP1 o de telomerasa. Los inmunoensayos se usarán típicamente para cuantificar polipéptidos de SENP1 o de telomerasa en una muestra. Una revisión general de la tecnología que puede aplicarse puede encontrarse Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988).

Los expertos en la técnica conocen métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con los polipéptidos de SENP1 o de telomerasa (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, citado anteriormente; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986); y Kohler y Milstein, *Nature* 256 (1975) 495-497. Dichas técnicas incluyen la preparación de anticuerpos por selección de anticuerpos de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en fagos o vectores similares, así como la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales inmunizando conejos o ratones (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science* 246 (1989) 1275-1281; Ward et al., *Nature* 341 (198) 544-546).

Los polipéptidos de SENP1 y/o de telomerasa pueden usarse para producir anticuerpos específicamente reactivos con SENP1 o telomerasa, respectivamente. Por ejemplo, un SENP1 recombinante o un fragmento antigénico del mismo, se aísla y purifica, por ejemplo, después de expresión recombinante en células eucariotas o procariotas. Después, el producto se inyecta en un animal que puede producir anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales o policlonales pueden generarse, para uso posterior en inmunoensayos para medir la proteína.

Los anticuerpos monoclonales y el suero policlonal pueden recogerse y titularse contra la proteína inmunogénica en un inmunoensayo, por ejemplo, un inmunoensayo en fase sólida, con el inmunógeno inmovilizado sobre un soporte sólido. Típicamente, se selecciona antisuero policlonal con una titulación de 10^4 o mayor y se ensaya con respecto a su reactividad cruzada contra proteínas que no son SENP1 o telomerasa, usando un inmunoensayo de unión competitiva. El antisuero policlonal específico y los anticuerpos monoclonales normalmente se unirán con una K_d de al menos aproximadamente 0,1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 1 μ M, opcionalmente al menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y opcionalmente 0,01 μ M o mejor.

Una vez que se dispone de anticuerpos específicos de SENP1 y/o de telomerasa, los polipéptidos de SENP1 o de telomerasa pueden detectarse mediante una diversidad de métodos de inmunoensayo. Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo, véase Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr eds., 7ª ed. 1991). Además, los inmunoensayos de la presente invención pueden realizarse en cualquiera de diversas configuraciones, que se revisan ampliamente en *Enzyme Immunoassay* (Maggio, ed., 1980); y Harlow y Lane, citado anteriormente.

Los polipéptidos de SENP1 y/o de telomerasa pueden detectarse y/o cuantificarse usando cualquiera de una diversidad de ensayos de unión inmunológicos bien reconocidos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168). Para una revisión de los inmunoensayos generales, véase *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991). Los ensayos de unión inmunológicos (o inmunoensayos) utilizan típicamente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o antígeno de elección (en este caso los polipéptidos de SENP1 o telomerasa o subsecuencia antigénica de los mismos). El anticuerpo (por ejemplo, anti-SENP1 o anti-telomerasa) puede producirse mediante cualquiera de una diversidad de medios bien conocidos por los expertos en la técnica y como se ha descrito anteriormente.

Frecuentemente los inmunoensayos también usan un agente marcador que se une específicamente a y marca el complejo formado por el anticuerpo y antígeno. El propio agente marcador puede ser uno de los restos que comprende el complejo anticuerpo/antígeno. Por tanto, el agente marcador puede ser un polipéptido de SENP1 o de telomerasa marcado o un anticuerpo anti-SENP1 o anti-telomerasa marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como un anticuerpo secundario, que se une específicamente al complejo anticuerpo/SENP1 o anticuerpo/telomerasa (un anticuerpo secundario es típicamente específico contra anticuerpos de especies a partir de las cuales deriva el primer anticuerpo). Como agente marcador también pueden utilizarse otras proteínas que pueden unirse específicamente con las regiones constantes de inmunoglobulina, tales como la proteína A o la proteína G. Estas proteínas presentan una fuerte reactividad no inmunogénica con regiones constantes de inmunoglobulina de una diversidad de especies (véase, por ejemplo, Kronval et al., *J. Immunol.* 111 (1973) 1401-1406; Akerstrom et al., *J. Immunol.* 135 (1985) 2589-2542). El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, con el que otra molécula puede unirse específicamente, tal como estreptavidina. Los expertos en la técnica conocen diversos restos detectables.

A lo largo de los ensayos, pueden ser necesarias etapas de incubación y/o de lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas,

opcionalmente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, del antígeno, del volumen de la solución, de las concentraciones y similar. Normalmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse sobre una gama de temperaturas, tales como de 10 °C a 40 °C.

Los inmunoensayos para detectar en muestras los polipéptidos de SENP1 o de telomerasa pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad de antígeno se mide directamente. En ensayos de tipo "sándwich", por ejemplo, los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa pueden unirse directamente a un sustrato sólido sobre el que se inmovilizan. Estos anticuerpos inmovilizados capturan después polipéptidos de SENP1 o de telomerasa presentes en la muestra de ensayo. El polipéptido de SENP1 o de telomerasa así inmovilizado se une después mediante un agente marcador, tal como un anticuerpo secundario anti-SENP1 o anti-telomerasa que lleva un marcador. Como alternativa, el anticuerpo secundario puede carecer de un marcador, pero puede, a su vez, unirse mediante un anticuerpo terciario marcado específico a anticuerpos de las especies de las que deriva el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario o terciario se modifica típicamente con un resto detectable, tal como biotina, al cual se une específicamente otra molécula, por ejemplo, estreptavidina, para proporcionar un resto detectable.

En ensayos competitivos, la cantidad de polipéptido de SENP1 o de telomerasa presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de un polipéptido de SENP1 o de telomerasa conocido, añadido (exógeno) desplazado (sin competencia) de un anticuerpo anti-SENP1 o anti-telomerasa por el polipéptido de SENP1 o de telomerasa desconocido presente en una muestra. En un ensayo competitivo, se añade una cantidad conocida de polipéptido de SENP1 o de telomerasa a una muestra y la muestra se pone después en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de SENP1 o de telomerasa. La cantidad de polipéptido de SENP1 o de telomerasa exógeno unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de polipéptido de SENP1 o de telomerasa presente en la muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo se inmoviliza sobre un sustrato sólido. La cantidad de polipéptido de SENP1 o de telomerasa unido al anticuerpo puede determinarse midiendo la cantidad de polipéptido de SENP1 o de telomerasa presente en un complejo SENP1/anticuerpo o telomerasa/anticuerpo, o como alternativa midiendo la cantidad de proteína restante que no está formando complejo.

También pueden utilizarse análisis de transferencia (inmunotransferencia) Western para detectar y cuantificar la presencia de polipéptidos de SENP1 o de telomerasa en la muestra. La técnica comprende generalmente separar proteínas de la muestra por electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado, (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon, o un filtro de nailon derivatizado), e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente a SENP1 o telomerasa. Los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa se unen específicamente a SENP1 o a telomerasa sobre el soporte sólido. Estos anticuerpos pueden marcarse directamente o, como alternativa, pueden detectarse posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos anti-ratón de oveja marcados) que se unen específicamente a los anticuerpos anti-SENP1 o anti-telomerasa.

Un experto en la técnica apreciará que frecuentemente es deseable minimizar la unión no específica en inmunoensayos. Particularmente cuando el inmunoensayo implica un antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión no específica con el sustrato. Los expertos en la técnica conocen bien medios de reducción de dicha unión no específica. Típicamente, esta técnica implica revestir el sustrato con una composición proteica. En particular, generalmente se utilizan composiciones proteicas, tales como albúmina de suero bovino (BSA), leche en polvo desnatada y gelatina.

El grupo marcador o detectable particular utilizado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo utilizado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad química o física detectable. Dichos marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de inmunoensayos y, en general, en la presente invención, puede aplicarse la mayor parte de cualquiera de los marcadores útiles en dichos métodos. Por tanto, un marcador es cualquier composición que pueda detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas, colores fluorescentes, radiomarcadores, enzimas y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio de color o perlas de plástico.

D. Detección y cuantificación de la actividad de SENP1 o de telomerasa

La cantidad de SENP1 o de telomerasa también puede determinarse detectando la actividad de las proteínas.

SENP1 es una proteasa que elimina sentrininas de proteínas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.596.527; Gong et al., J Biol Chem. 275 (2000) 3355-3359; y Bailey et al., J Biol Chem. 279 (2004) 692-703. Por ejemplo, la actividad de SENP1 puede detectarse detectando la eliminación de sentrininas de una cantidad conocida de proteína sentrinizada en la muestra.

La actividad telomerasa puede medirse mediante cualquiera de los diversos ensayos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Hiyama et al., *Cancer Lett.* 194 (2003) 221-233. Por ejemplo, puede utilizarse TRAP (protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas) para detectar la actividad telomerasa con una alta sensibilidad usando PCR. Véase, Kim N. W. et al., *Science* 206 (1994) 2011-2015; Piatyszek M. A. et al., *Meth. Cell Sci.* 17 (1995) 1-15; Woodring et al., *Nuc. Acids Res.* 23 (1995) 3794-3795; Patentes de Estados Unidos N° 6.551.774; 6.391.554; y 5.837.453. Este método implica la detección de telomerasa mediante un sistema de ensayo de extensión de único cebador y, a grandes rasgos, se divide en tres etapas. Primero, la telomerasa se extrae de las células. Después, se realiza una reacción de extensión de una cadena TTAGGG por la telomerasa y los productos de reacción se amplifican por PCR usando dos cebadores. Finalmente, los productos amplificados se someten a electroforesis para detectar la actividad telomerasa confirmando escaleras en autorradiografía.

Una variación del TRAP implica SYBR Verde en tiempo real para cuantificar la actividad de telomerasa. Véase, por ejemplo, Wege et al., *Nuc. Acids Res.* 31 (2003) e3.

Otra variación del TRAP se denomina PCR con extensión telomérica (PTEP). Véase, por ejemplo, Chen et al., *Biotechniques* 35 (2003) 158-162. Similar al TRAP, este método se basa en la amplificación por PCR después de la reacción de telomerasa *in vitro*, aunque en este caso, la reacción de telomerasa *in vitro* finaliza prematuramente, en lugar de aleatoriamente. Aparte de esto, los productos de extensión teloméricos se usan como cebadores iniciales, en lugar de como moldes, para desencadenar la amplificación con un ADN plasmídico especialmente construido como el molde que no puede amplificarse directamente con el cebador de telomerasa. El producto final es un fragmento de ADN específico que refleja actividad telomerasa. Los expertos en la técnica reconocerán que también pueden usarse otros métodos para detectar actividad telomerasa. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2002/0025518.

III. Patrones de cuantificación para ensayos de las invenciones

En muchas realizaciones de la invención, la cantidad de SENP1 o telomerasa en una muestra biológica se compara con uno o más valores patrón. En general, el valor patrón representará la cantidad de SENP1 o telomerasa encontrada en muestras biológicas de un individuo sano (por ejemplo, sin diagnóstico de cáncer y/o que no contiene un número significativo de células cancerosas). Los diferentes valores patrón serán apropiados dependiendo de diversos factores. Por ejemplo, la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra de un individuo sano puede variar dependiendo del método usado para cuantificar SENP1 o telomerasa. Además, el valor patrón puede variar dependiendo de la proporción de positivos falsos y de negativos falsos que se proporcionarán en un ensayo de diagnóstico. Por ejemplo, si el valor patrón se establece a un valor bajo, el número de negativos falsos disminuirá aunque la proporción de positivos falsos (aquellos sin cáncer que se puntúan como que tienen células cancerosas) aumentará. Por lo tanto, un usuario puede comparar la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra con diferentes valores patrón dependiendo de la tolerancia de resultados negativos falsos o positivos falsos.

En algunos casos, el valor patrón se determinará en base al promedio, mediana u otros cálculos estadísticos basados en una pluralidad de muestras que se sabe que carecen de células cancerosas o que se sabe que contienen células cancerosas. El valor patrón no necesita recalcularse en cada ensayo, sino que puede ser un solo valor o intervalo predeterminado. El valor patrón puede almacenarse en una memoria de ordenador y cuando sea necesario puede accederse al mismo.

En otras realizaciones, el valor patrón se determina en cada muestra biológica cada vez que se procesa un conjunto de muestras biológicas. En algunos casos, el valor patrón es la cantidad de SENP1 o de telomerasa en una muestra que se sabe, o que al menos se sospecha, que no contiene células cancerosas. En algunas realizaciones, estas muestras patrón se extraerán del mismo individuo que se somete a ensayo para determinar cáncer. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de tumor sólido y una muestra que no contiene cáncer del mismo individuo y la cantidad de SENP1 y/o de telomerasa en la muestra que no contiene cáncer puede formar la base del valor patrón. En otras realizaciones, las muestras patrón se obtendrán de otro individuo o individuos.

En algunos casos, las cantidades de SENP1 o de telomerasa (tanto de la muestra biológica de interés como del patrón sin cáncer) se normalizan con un segundo valor. La normalización es útil, por ejemplo, para eliminar o minimizar errores introducidos por un usuario o ensayos en las cantidades detectadas o minimizar errores producidos por diversos números de células en una muestra. Típicamente la normalización se basa en un valor que incorpora algunos de los mismos errores. Por ejemplo, la cantidad de un segundo transcripto en la misma muestra biológica puede usarse para normalizar valores de SENP1 o de telomerasa. Típicamente, el segundo transcripto se sabe o se sospecha que no está afectado por la presencia o ausencia de células cancerosas en la muestra. Los "transcriptos normalizantes" ejemplares (también conocidos como transcriptos de "genes constitutivos") incluyen, pero sin limitación, las siguientes proteínas humanas: proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa (PPP1CA), proteína de unión a la caja TATA (por ejemplo, M55654), HPRT1 (por ejemplo, M26434), por ejemplo β -glucuronidasa, β 2-microglobulina, fósforoglicerol quinasa 1 (por ejemplo, NM_000291), β -actina (por ejemplo, NM_001101), receptor de transferrina (por ejemplo, NM_003234), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (por ejemplo, NM_002046), albúmina de suero humano (por ejemplo, NM_000477), tubulina, hipoxantina fósforribosiltransferasa (por ejemplo, NM_000194), proteína ribosomal mitocondrial L32 (por ejemplo,

NM_031903), ARN 28S, ARN 18S, 5-aminolevulinato sintasa y porfobilinógeno desaminasa. Véase también, LightCycler h-Housekeeping Gene Selection Set (Roche Applied Sciences, catálogo no. 3310159); Thellin, O. et al., J. Biotechnol. 75 (1999) 291; Warrington, J.A. et al., Physiol. Genomics 2 (2000) 143. Los expertos en la técnica reconocerán que muchos genes constitutivos, entre otros, proporcionarán valores normalizadores equivalentes. Los valores pueden normalizarse de acuerdo con cualquiera de los métodos estadísticos generalmente conocidos, incluyendo la división simple de valores entre la cantidad del transcrito o proteína normalizante.

IV. Registro de Diagnóstico, Pronóstico o Fase de cáncer

Los métodos de la invención pueden implicar registrar la cantidad de SENP1 y/o de telomerasa en una muestra y/o un diagnóstico, pronóstico o fase de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado.

Esta información puede registrarse como texto o datos y puede almacenarse en una forma legible por ordenador. Dicho sistema informatizado comprende típicamente subsistemas principales, tal como un procesador central, una memoria del sistema (típicamente RAM) un controlador de entrada/salida (E/S), un dispositivo externo tal como una pantalla mediante un adaptador de pantalla, puertos en serie, un teclado, un disco duro mediante una interfaz de almacenamiento y una disquetera operativa para recibir un disquete y un dispositivo CD-ROM (o DVD-ROM) operativo para recibir un CD-ROM. Pueden conectarse muchos otros dispositivos, tal como una interfaz de red conectada mediante un puerto en serie.

El sistema informatizado también puede unirse a una red, que comprende una pluralidad de dispositivos informatizados unidos mediante un receptor de datos, tal como un cable Ethernet (coax o 10BaseT), línea telefónica, línea ISDN, red inalámbrica, fibra óptica u otro medio de transmisión de señal adecuado, mediante el cual al menos un dispositivo en red (por ejemplo, ordenador, conjunto de discos, etc.) comprende un patrón de dominios magnéticos (por ejemplo, disco magnético) y/o dominios de carga (por ejemplo, una matriz de células DRAM) que componen un patrón de bit que codifica datos obtenidos a partir de un ensayo de la invención.

El sistema informatizado puede comprender códigos para interpretar los resultados de cuantificación de SENP1 o telomerasa en una muestra biológica. Por tanto, en una realización ejemplar, en un ordenador se introducen resultados genotípicos donde un procesador central ejecuta un programa informatizado para determinar un diagnóstico, pronóstico o determinación de la fase de un cáncer particular, seleccionado, por ejemplo, de cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado.

V. Diagnóstico de cáncer

Los métodos de la presente invención pueden usarse en el diagnóstico, pronóstico, clasificación y tratamiento de diversos tipos de cánceres. Un cáncer, tal como cáncer primario, metastásico y recurrente, puede detectarse en cualquier fase de progresión. Puede encontrarse información sobre numerosos tipos de cáncer, por ejemplo, en el American Cancer Society (www.cancer.org) o, por ejemplo, en Wilson et al. (1991) Harrison's Principles of Internal Medicine, 12ª Edición, McGraw-Hill, Inc.

La presente invención proporciona métodos para determinar si un mamífero (por ejemplo, un ser humano) tiene o no cáncer de colon, si una muestra biológica contiene o no células de cáncer de colon, estimar la probabilidad de que un mamífero desarrolle cáncer de colon y monitorizar la eficacia de un tratamiento contra el cáncer en un mamífero con cáncer de colon. Dichos métodos se basan en el descubrimiento de que las células cancerosas tienen un nivel elevado de polinucleótido y/o polipéptido de SENP1. Por consiguiente, determinando si una célula contiene o no niveles elevados de SENP1 o TERT o TERC, es posible determinar si la célula de colon es o no cancerosa. Además, la presencia de células de colon cancerosas puede determinarse indirectamente, por ejemplo, en determinadas realizaciones, una muestra biológica que no contiene en sí misma células de colon cancerosas, pero que se ha extraído de un animal con células cancerosas de cualquier parte de su organismo, puede contener niveles elevados de SENP1 o TERT o TERC reflejando la presencia de células cancerosas.

En numerosas realizaciones de la presente invención, el nivel y/o la presencia de SENP1 o TERT o TERC se detectarán en una muestra biológica, detectando de este modo la presencia o ausencia de células de colon cancerosas en la muestra biológica o, en determinadas realizaciones, en el mamífero del que se extrae la muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica comprenderá una muestra tisular de un tejido que se sospecha que contiene células de colon cancerosas. Por ejemplo, en un individuo que se sospecha que tiene cáncer de vejiga, se realiza una biopsia de tejido de vejiga o se obtiene orina. En otras realizaciones, la cantidad de SENP1 o TERT o TERC se determina en un fluido corporal (por ejemplo, sedimento de orina (véase, por ejemplo, Melissourgos et al., Urology 62 (2003) 362-367), saliva, sangre, semen, etc.). En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 en una biopsia de tejido de colon se utiliza para detectar cáncer en este tejido. En algunas realizaciones, la cantidad de SENP1 se determina a partir de una muestra de heces para diagnosticar cáncer de colon. En otras realizaciones, se analizará una muestra de tejido que se sabe que contiene células de cáncer de colon, por ejemplo, procedentes de un tumor, con respecto a los niveles de SENP1 o TERT o TERC para determinar información sobre

el cáncer de colon, por ejemplo, la eficacia de determinados tratamientos, la esperanza de supervivencia del animal, etc. A menudo, los métodos se usarán junto con métodos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, detección de otros marcadores de cáncer de colon, etc.

5 Además, los métodos de la presente invención pueden usarse para evaluar la eficacia de un ciclo de tratamiento. Por ejemplo, en un mamífero con cáncer de colon a partir de cual se ha encontrado una muestra biológica que contiene una cantidad elevada de SENP1 o TERT o TERC, la eficacia de un tratamiento contra el cáncer puede evaluarse monitorizando los niveles de SENP1 o TERT o TERC a lo largo del tiempo. Por ejemplo, una reducción en los niveles de SENP1 o TERT o TERC en una muestra biológica extraída de un mamífero después de un
10 tratamiento, en comparación con un nivel en una muestra extraída del mismo mamífero antes, o al comienzo, del tratamiento, indica tratamiento eficaz.

Los métodos de detección de cáncer de colon pueden comprender la detección de una o más secuencias distintas de polinucleótidos o polipéptidos asociadas con cáncer. Por consiguiente, SENP1 o TERT o TERC tener pueden usarse en solitario, juntos o en combinación con otros marcadores para el diagnóstico o pronóstico de cáncer de colon.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para determinar el ciclo óptimo de tratamiento en un mamífero con cáncer de colon. Por ejemplo, la presencia de un nivel elevado de SENP1 o TERT o TERC puede indicar una esperanza de supervivencia reducida de un mamífero con cáncer de colon, indicando de este modo un tratamiento más agresivo para el mamífero. Además, puede establecerse fácilmente una correlación entre los niveles de SENP1 o TERT o TERC o la presencia o ausencia de una presencia de diagnóstico de SENP1 o TERT o TERC (es decir, una cantidad de SENP1 o TERT o TERC sobre el valor patrón), y la eficacia relativa de uno u otro agente anticanceroso. Dichos análisis pueden realizarse, por ejemplo, retrospectivamente, es decir, detectando niveles de
20 SENP1 o TERT o TERC en muestras extraídas previamente del mamífero que posteriormente se han sometido a uno o más tipos de terapia contra el cáncer, y correlacionar los niveles de SENP1 o TERT o TERC con la eficacia conocida del tratamiento.

En la elaboración de un diagnóstico, pronóstico, evaluación o clasificación de riesgo, basada en la expresión de SENP1 y TERT o TERC, la cantidad de expresión de SENP1 y TERT o TERC puede compararse con un valor patrón, como se ha indicado anteriormente. En algunos casos, puede efectuarse un diagnóstico o pronóstico de cáncer de colon si la expresión de SENP1 y TERT o TERC en la muestra biológica es más alta que la del valor patrón. En algunos casos, la cantidad de expresión de SENP1 y TERT o TERC en la muestra biológica es al menos 10 % más, 25 % más, 50 % más, 75 % más, 90 % más, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o más de 100 veces en comparación con el patrón en comparación con el valor patrón (o un valor que representa la expresión de SENP1 y TERT o TERC en una muestra que no contiene cáncer).

VI. Preparación de muestras y amplificación de ácidos nucleicos

40 Las muestras se obtienen generalmente o se aíslan de sujetos, típicamente de sujetos mamíferos, más típicamente de sujetos humanos. Esencialmente cualquier técnica para obtener estas muestras se utiliza opcionalmente incluyendo, por ejemplo, biopsia, raspado, punción venosa, frotis u otras técnicas conocidas en la materia.

Los métodos de almacenamiento de muestras biológicas, células de cultivo, aislamiento y preparación de ácidos nucleicos de estas fuentes se conocen generalmente en la técnica y muchas de éstos se describen adicionalmente en las referencias y/o en los ejemplos proporcionados en el presente documento.

Para ilustrar adicionalmente, antes de analizar los ácidos nucleicos diana descritos en el presente documento, estos ácidos nucleicos pueden purificarse o aislarse de muestras que típicamente incluyen mezclas complejas de diferentes componentes. Las células en muestras recogidas se someten típicamente a lisis para liberar el contenido celular. Por ejemplo, las células en sedimento de orina pueden someterse a lisis poniéndolas en contacto con diversas enzimas, productos químicos, y/o someterse a lisis mediante otras estrategias conocidas en la materia. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se analizan directamente en el lisado celular. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se purifican o se extraen adicionalmente de los lisados celulares antes de la detección.
55 Esencialmente, puede usarse cualquiera de los métodos de extracción de ácidos nucleicos para purificar ácidos nucleicos en las muestras utilizadas en los métodos de la presente invención. Técnicas ejemplares que pueden usarse para purificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, cromatografía por afinidad, hibridación con sondas inmovilizadas sobre soportes sólidos, extracción líquido-líquido (por ejemplo, extracción con fenolcloroformo, etc.), precipitación (por ejemplo, usando etanol, etc.), extracción con papel de filtro, extracción con reactivos formadores de micelas (por ejemplo, bromuro de cetil-trimetilamonio, etc.), unión a colorantes intercaladores inmovilizados (por ejemplo, bromuro de etidio, acridina, etc.), adsorción a gel de sílice o tierras diatomeas, adsorción a partículas de vidrio magnéticas o partículas de órgano silanos en condiciones caotrópicas, y/o similares. El procesamiento de las muestras también se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 5.155.018, 6.383.393 y 5.234.809.

65

Para ilustrar adicionalmente, los ácidos nucleicos no modificados pueden unirse a un material con una superficie de sílice. En la técnica se describen muchos de los procesos que se adaptan opcionalmente para su uso en la realización de los métodos de la presente invención. Para ilustrar, Vogelstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-619 describen la purificación de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio usando vidrio de sílex molido. Marko et al., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387 describen la purificación de ácidos nucleicos de bacterias en polvo de vidrio en presencia de perclorato sódico. En el documento DE-A 3734442 se aíslan ácidos nucleicos sobre filtros de fibra de vidrio. Los ácidos nucleicos unidos a estos filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón de Tris/EDTA que contiene metanol. Un procedimiento similar se describe en Jakobi et al., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. En particular, Jakobi et al. describen la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes, tales como agarosa, proteínas y restos de células. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o los fluidos pueden extraerse de los filtros de fibra de vidrio. Además, el uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de precipitación por adición de sal y etanol se describe, por ejemplo, en Alderton et al., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y en la PCT/GB91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del disolvente original aplicando un campo magnético y realizando una o más etapas de lavado. Después de al menos una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven típicamente en un tampón Tris.

En determinadas realizaciones de la invención también pueden utilizarse partículas magnéticas en una matriz de vidrio poroso que se recubre con una capa que incluye, por ejemplo, estreptavidina. Estas partículas pueden usarse, por ejemplo, para aislar proteínas y ácidos nucleicos conjugados con biotina. Opcionalmente también se utilizan partículas ferrimagnéticas, ferromagnéticas y superparamagnéticas. Partículas de vidrio magnéticas y métodos relacionados que pueden adaptarse para su uso en la realización de los métodos descritos en el presente documento también se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/37291.

Vla. Realizaciones preferidas de la invención

A continuación se describen realizaciones particularmente preferidas de la invención. Una realización preferida de la invención es un método de detección de la expresión de SENP1 en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de determinar la cantidad de SENP1 en una muestra biológica de un individuo que tiene o se sospecha que tiene cáncer de colon.

El método puede comprender opcionalmente la etapa de obtener la muestra biológica del individuo antes de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de registrar un diagnóstico de cáncer de colon.

En una realización preferida, la cantidad de SENP1 se determina detectando un polinucleótido que codifica SENP1 en la muestra. Por lo tanto, preferentemente la etapa de determinar la cantidad de SENP1 comprende la etapa de detectar un polinucleótido de codifique SENP1 en la muestra. Esta etapa de detección puede comprender amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o un complemento de la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1. Preferentemente, el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable.

Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y de telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de telomerasa, respectivamente, en el que el patrón de SENP1 representa SENP1 en células no cancerosas y el patrón de telomerasa representa cantidades de telomerasa en células no cancerosas.

En resumen, en una realización preferida de la invención, se proporciona un método de detección de la expresión de SENP1 en una muestra biológica de un individuo que tiene, o se sospecha que tiene, cáncer de colon, comprendiendo el método determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica

- a) amplificando un polinucleótido que codifique SENP1 en la muestra biológica en una reacción de amplificación,
- b) detectando la cantidad del producto de amplificación de la etapa a) para detectar la expresión de SENP1 en la muestra biológica, y
- c) determinando la cantidad de TERT o TERC en la muestra biológica.

Preferentemente, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o un complemento de

la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1.

Preferentemente, el (la cantidad de) producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende adicionalmente una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de telomerasa, respectivamente, en el que el patrón de SENP1 representa SENP1 en células de colon no cancerosas y el patrón de telomerasa representa cantidades de telomerasa en células de colon no cancerosas. El patrón es preferentemente una muestra biológica (que comprende células) de un individuo control que no padece cáncer de colon.

El método puede comprender opcionalmente la etapa de obtener la muestra biológica del individuo antes de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de registrar un diagnóstico de cáncer de colon.

En otra realización preferida de la invención, se proporciona un método para determinar si una muestra biológica de un paciente comprende células de colon cancerosas que comprende las etapas de

- a) determinar la cantidad de SENP1 en una muestra biológica,
- b) determinar la cantidad de SENP1 en una muestra biológica de un individuo control que no padece cáncer de colon, y
- c) determinar la cantidad de TERT o TERC en la muestra biológica,

una diferencia significativa entre la cantidad de SENP1 en la muestra biológica del paciente y la cantidad de SENP1 en la muestra biológica del individuo control indica que la muestra biológica comprende células de cáncer de colon.

Una diferencia significativa es preferentemente una diferencia de 1,5 veces o mayor, más preferentemente una diferencia de dos veces o mayor.

La etapa de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica comprende preferentemente las etapas de

- a) amplificar un polinucleótido que codifique SENP1 en la muestra biológica en una reacción de amplificación, y
- b) detectar la cantidad del producto de amplificación de la etapa a) para determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica.

Preferentemente, la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o un complemento del mismo, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1.

Preferentemente, el (la cantidad de) producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto. Preferentemente, la reacción de amplificación comprende adicionalmente una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de comparar la cantidad de SENP1 y telomerasa en la muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de TERT o TERC, respectivamente, en el que el patrón de SENP1 representa SENP1 en células de colon no cancerosas y los patrones de TERT o TERC representan cantidades de TERT o TERC en células de colon no cancerosas. El patrón es preferentemente una muestra biológica (que comprende células) de un individuo control que no padece cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer pancreático.

El método puede comprender opcionalmente la etapa de obtener la muestra biológica del individuo antes de determinar la cantidad de SENP1 en la muestra biológica. Preferentemente, el método comprende adicionalmente la etapa de registrar un diagnóstico del cáncer de colon.

VII. Kits

La presente invención también proporciona kits para diagnosticar cáncer detectando SENP1 y telomerasa (por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos o actividad). Los kits de la invención generalmente comprenden reactivos para detectar polipéptidos de SENP1 y/o telomerasa y/o polinucleótidos de SENP1 y/o telomerasa y opcionalmente contendrán instrucciones por escrito sobre su uso.

En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenderán reactivos para amplificar polinucleótidos de SENP1 y/o telomerasa. Dichos reactivos pueden incluir, por ejemplo, cebadores específicos de SENP1 y/o telomerasa y/o

sondas marcadas de manera detectable (por ejemplo, sondas exonucleasas 5', baliza molecular o Scorpion). Opcionalmente los kits pueden incluir reactivos de amplificación, tales como, polimerasas termoestables, transcriptasa inversa, nucleótidos, tampones y sales u otros componentes como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica.

5 En algunos casos, los kits comprenderán al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que cuando el oligonucleótido y un polinucleótido que comprende la SEC ID N°: 1 se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1.

15 En algunos casos, los kits también comprenderán el oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1 o un complemento de la misma.

En algunos casos, los kits comprenderán al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 o más nucleótidos contiguos de:

- 20 i) ARN de telomerasa humana (TERC);
- ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa humana (TERT);
- iii) un complemento de TERC; o
- iv) un complemento de TERT

25 de tal manera que cuando el oligonucleótido y el ARNm de TERC o de TERT se someten a una reacción de amplificación, el oligonucleótido ceba la amplificación de al menos un fragmento de ARNm de TERC o de TERT.

30 En algunos casos, los kits comprenderán el oligonucleótido marcado de manera detectable que comprende una secuencia al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 35, 50 o más nucleótidos contiguos de:

- 35 i) ARN de telomerasa humana (TERC);
- ii) ARNm de la proteína telomerasa transcriptasa inversa humana (TERT);
- iii) un complemento de TERC; o
- iv) un complemento de TERT

40 en otras realizaciones, los kits de la invención comprenden reactivos que se unen específicamente a polipéptidos de SENP1 o de telomerasa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden un primer anticuerpo que se une específicamente a SENP1 o a telomerasa. Los kits también pueden comprender un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo (es decir, de diferentes especies) y un marcador detectable.

VIII. Exploración de antagonistas de SENP1

45 Diversos protocolos de exploración diferentes pueden utilizarse para identificar agentes que modulan el nivel de actividad de SENP1 en células, por ejemplo, en células de mamífero, por ejemplo, en células de ser humano. En términos generales, los métodos de exploración pueden implicar la exploración de una pluralidad de agentes para identificar un agente que interaccione con SENP1, por ejemplo, mediante la unión a SENP1 e impidiendo la actividad de SENP1 o impidiendo que un activador de SENP1 active SENP1.

50 1. Ensayos de unión a SENP1

Pueden realizarse exploraciones preliminares explorando agentes capaces de unirse a SENP1, como al menos algunos de los agentes ya identificados que pueden ser antagonistas de SENP1. Los ensayos de unión normalmente implican poner en contacto una proteína SENP1 con uno o más agentes de ensayo y dejar un tiempo suficiente para que la proteína y los agentes de ensayo formen un complejo de unión. Cualquiera de los complejos de unión formados puede detectarse usando cualquiera de las diversas técnicas analíticas establecidas. Los ensayos de unión a proteínas incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión inmunohistoquímicos, citometría de flujo u otros ensayos que mantienen la conformación de SENP1. La SENP1 utilizada en dichos ensayos puede expresarse de manera natural, clonarse o sintetizarse.

60 Los ensayos de unión también son útiles, por ejemplo, para identificar proteínas endógenas que interaccionan con SENP1.

65 2. Células y reactivos

Los métodos de exploración de la invención pueden realizarse como ensayos *in vitro* o basados en células. Los ensayos basados en células pueden realizarse en cualquiera de las células en las que el polipéptido de SENP1 se exprese de manera endógena o exógena. En algunas realizaciones, pueden realizarse ensayos basados en células usando células que tengan actividad o expresión de telomerasa reducida o no detectable y/o que tengan un fenotipo neoplásico. En algunas realizaciones, se ensaya la susceptibilidad de líneas celulares inmortales negativas a expresión TERT para posibles inhibidores de SENP1. Se propone que estas líneas celulares negativas a telomerasa son útiles en dicha exploración ya que posiblemente copian sus telómeros mediante un mecanismo independiente de telomerasa (Alargamiento Alternativo de Telómeros o "ALT"). Sin intentar limitar el ámbito de la invención a un mecanismo de acción particular, se propone que el SENP1 está implicado en el mantenimiento del ALT. La inhibición del ALT mediante un inhibidor de SENP1 podría predecirse después para obtener una alteración de la estructura telomérica con un inhibidor eventual de división de estas células. Por otro lado, en casos en los que la telomerasa es activa en líneas celulares, la telomerasa continuaría permitiendo la división celular incluso en presencia de un inhibidor de SENP1.

En la bibliografía se conocen ejemplos de células que no expresan telomerasa (células "ALT"). Véase, por ejemplo, Tsutsui, T et al. *Carcinogenesis* 24 (2003) 953-965; Bryan, T.M., *Hum Mol Genet* 6 (1997) 921-926; Guilleret, I. et al., *Carcinogenesis* 23 (2002) 2025-2030. Como ejemplos de líneas celulares ALT se incluyen, pero sin limitación, células SUSM-1, WI38 VA13/2RA, BET-3M, GM847, MeT-4A, IICF/c, IICF-T/A6, MDAH 087, Saos-2 y U-2.

La inhibición de ALT puede detectarse ensayando un cambio en la longitud del telómero (véase, por ejemplo, el Ensayo de Longitud del Telómero TeloTAGGG de Roche Applied Biosystems o Tsutsui, T. et al., *Carcinogenesis* 24 (2003) 953-965), o un cambio en marcadores morfológicos tal como la presencia de cuerpos PML que tienen "forma de rosquilla" en células ALT en lugar del aspecto normalmente punteado de PML-NB en células que no se someten a ALT (véase, por ejemplo, Yeager, T.R., et al., *Cancer Res.* 59 (1999) 4175-4179, inhibición de división celular (determinada, por ejemplo, contando el número de células en diferentes momentos (por ejemplo, usando productos de Technology™ Guava), usando ensayos basados en agar blando para contar el número de colonias a diferentes momentos, usando tecnología de estadificación celular para determinar la fase de ciclo celular de las células, analizando visualmente las células utilizando microscopía electrónica, análisis cromosómicos o tecnología Cellomics™, o analizando la expresión de proteínas, por ejemplo, mediante transferencia de western o análisis inmunohistoquímicos).

Los ensayos basados en células pueden implicar células completas o fracciones de células que contienen SENP1 para explorar la unión a agentes o modulación de la actividad de SENP1 por el agente. Las células usadas en los ensayos basados en células pueden ser células primarias o células tumorales u otros tipos de células de líneas celulares inmortales. Por supuesto, SENP1 puede expresarse en células que no expresan SENP1 de manera endógena.

3. Señalización de actividad o acontecimientos aguas abajo

La señalización de la actividad o de otros acontecimientos aguas abajo regulados por SENP1 también puede controlarse para identificar antagonistas de SENP1. Por tanto, en algunas realizaciones, una pluralidad de agentes se pone en contacto con una célula que expresa SENP1 y las células se exploran después con respecto a un cambio en la señalización o un acontecimiento aguas abajo. El conjunto de agentes que modulan un acontecimiento aguas abajo regulados por SENP1 está típicamente enriquecido para antagonistas de SENP1 porque al menos algunos de los agentes identificados probablemente antagonizan directamente SENP1. Los acontecimientos aguas abajo incluyen aquellas actividades o manifestaciones que se producen como resultado de la inhibición de SENP1 y pueden incluir, por ejemplo: crecimiento celular reducido (medido, por ejemplo, como recuentos de colonias en agar blando o usando sistemas de análisis celular tales como los de Guava Technologies, Hayward, CA), cambios en la fase del ciclo celular (medidos, por ejemplo, usando análisis de formación de imágenes con tinción de anticuerpos HT, por ejemplo, de Cellomics, Pittsburgh, PA, o por métodos citológicos convencionales); o cambios en la expresión de proteínas, incluyendo, por ejemplo, transferencia de western o microscopía.

Crecimiento en agar blando o formación de colonias en suspensión

Las células normales requieren un sustrato sólido para adherirse y crecer. Las células neoplásicas han perdido este fenotipo y crecen separadas del sustrato. Por ejemplo, las células neoplásicas pueden crecer en cultivos en suspensión agitados o suspenderse en medios semisólidos, tales como agar blando o semisólido. Las células neoplásicas, cuando se transfectan con genes supresores tumorales o se ponen en contacto con un antagonista de SENP1, pueden regenerar su fenotipo normal y pueden requerir un sustrato sólido para adherirse y crecer. Por tanto, el crecimiento en agar blando o la formación de colonias en ensayos en suspensión pueden usarse para identificar agentes que reduzcan o eliminen la proliferación y transformación de células anómalas, incluyendo crecimiento en agar blando.

En Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique* (3ª ed., 1994) se describen técnicas de crecimiento en agar blando o formación de colonias en suspensión.

Inhibición por contacto y limitación de densidad del crecimiento.

Las células normales crecen típicamente en un modelo plano y organizado en una placa de Petri hasta que se ponen en contacto con otras células. Cuando las células se ponen en contacto entre sí, se inhiben por contacto y detienen el crecimiento. Sin embargo, cuando las células se transforman, las células no se inhiben por contacto y continúan creciendo a altas densidades en focos desorganizados. Por tanto, las células transformadas crecen a una densidad de saturación más alta que las células normales. Esto puede detectarse morfológicamente mediante la formación de una monocapa de células sin orientación o de células redondas en focos dentro del patrón regular de células circundantes normales. Como alternativa, puede usarse el índice de marcado con (³H)-timidina a una densidad de saturación para medir la limitación de densidad del crecimiento. Véase Freshney (1994), citado anteriormente. Las células transformadas, cuando se transfectan con genes supresores tumorales, regeneran un fenotipo normal y se convierten en células inhibidas por contacto y crecerían a una densidad más baja.

El índice de marcado con (³H)-timidina a densidad de saturación puede usarse para medir la limitación de densidad del crecimiento. Por ejemplo, células hospedadoras transformadas pueden ponerse en contacto con un antagonista de SENP1 candidato y después crecer durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 24 horas) hasta densidad de saturación en condiciones de medio no limitantes. El porcentaje de células marcadas con (³H)-timidina puede determinarse autorradiográficamente. Véase, Freshney (1994), citado anteriormente.

Dependencia de factores de crecimiento o de suero

Las células transformadas tienen una menor dependencia de suero que sus homólogas normales (véase, por ejemplo, g., Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37 (1966) 167-175; Eagle et al., J. Exp. Med. 131 (1970) 836-879); Freshney, citado anteriormente. Esto se debe en parte a la liberación de diversos factores de crecimiento por las células transformadas. La dependencia de factores de crecimiento o de suero de las células que se ponen en contacto con un antagonista SENP1 candidato puede compararse con la de un control.

Niveles marcadores específicos de tumores

Las células tumorales o neoplásicas liberan una mayor cantidad de determinados factores (en lo sucesivo en el presente documento "marcadores específicos de tumores") que sus homólogas normales. Por ejemplo, el activador de plasminógeno (PA) se libera de glioma humano a un nivel más alto que las células de cerebro normales (véase, por ejemplo, Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*, in *Biological Responses in Cancer*, págs. 178-184 (Mihich (ed.) 1985)). De manera similar, el factor de angiogénesis tumoral (TAF) se libera a un mayor nivel en células tumorales que en sus homólogas normales. Véase, por ejemplo, Folkman, *Angiogenesis and Cancer*, Sem Cancer Biol. (1992)).

Diversas técnicas que miden la liberación de estos factores se describen en Freshney (1994), citado anteriormente. Véanse también, Unkless et al., J. Biol. Chem. 249 (1974) 4295-4305; Strickland y Beers, J. Biol. Chem. 251 (1976) 5694-5702; Whur et al., Br. J. Cancer 42 (1980) 305-312; Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*, in *Biological Responses in Cancer*, págs. 178-184 (Mihich (ed.) 1985); Freshney *Anticancer Res.* 5 (1985) 111-130.

Invasividad en Matrigel

El grado de invasividad en Matrigel o en algún otro constituyente de la matriz extracelular puede usarse en un ensayo para identificar antagonistas de SENP1. Las células tumorales presentan una buena correlación entre malignidad e invasividad de las células en Matrigel o en algún otro constituyente de la matriz extracelular. En este ensayo, pueden usarse células neoplásicas, en el que una invasividad disminuida de las células, después de ponerse en contacto con un agente, puede indicar que el agente es un antagonista de SENP1.

Pueden usarse las técnicas descritas en Freshney (1994), citado anteriormente. En resumen, el nivel de invasión de las células hospedadoras puede medirse usando filtros recubiertos con Matrigel o con algún otro constituyente de la matriz extracelular. La penetración en el gel, o a través del lado distal del filtro, se califica como invasividad y se califica histológicamente mediante el número de células y distancia recorrida o se marcan previamente las células con ¹²⁵I y se cuenta la radioactividad del lado distal del filtro o la parte superior del disco. Véase, por ejemplo, Freshney (1994), citado anteriormente.

4. Validación

Los agentes que inicialmente se identifican mediante cualquiera de los métodos de exploración anteriores pueden ensayarse adicionalmente para validar la actividad aparente. En algunas realizaciones, dichos estudios se realizan con modelos animales adecuados. El formato básico de dichos métodos implica administrar a un animal un compuesto principal identificado durante una exploración inicial que sirve como un modelo de enfermedad humana a tratar y después determinar si SENP1 se modula en realidad y/o mejora la enfermedad o afección. Los modelos

animales utilizados en estudios de validación generalmente son mamíferos de cualquier tipo. Los ejemplos específicos de animales adecuados incluyen, pero sin limitación, primates, ratones y ratas.

5. Agentes que interaccionan con SENP1

Los agentes ensayados como moduladores de SENP1 pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una entidad biológica, tal como un polipéptido (por ejemplo, un péptido), azúcar, ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, ARNip o polinucleótidos antisentido) o lípidos. Esencialmente puede usarse cualquier compuesto químico como un posible modulador (por ejemplo, antagonista) o ligando en los ensayos de la invención, aunque más frecuentemente se utilizan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas se usan (especialmente basados en DMSO). Los ensayos se diseñan para explorar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas de ensayo y proporcionando compuestos de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que se desarrollan típicamente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos fabricantes de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs, Suiza) y similares.

En algunas realizaciones, los agentes tienen un peso molecular menor de 1500 dalton, y en algunos casos menor de 1.000, 800, 600, 500 o 400 dalton. El tamaño relativamente pequeño de los agentes puede ser deseable debido a que las moléculas más pequeñas tienen una mayor probabilidad de tener propiedades fisicoquímicas compatibles con buenas características farmacocinéticas, incluyendo absorción oral en comparación con los agentes con mayor peso molecular. Por ejemplo, agentes que son probablemente menos satisfactorios como fármacos, en base a la permeabilidad y solubilidad se describen por Lipinski et al. de la siguiente manera: tienen más de 5 donadores de enlaces de H (expresado como la suma de OH y NH); tienen un peso molecular mayor de 500; tienen un LogP mayor de 5 (o MLogP mayor de 4,15); y/o tienen más de 10 aceptores de enlaces de H (expresado como la suma de Ns y Os). Véase, por ejemplo, Lipinski et al. *Adv Drug Delivery Res* 23 (1997) 3-25.

En algunas realizaciones, los métodos de exploración de alto rendimiento implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contenga una gran cantidad de posibles compuestos terapéuticos (posibles compuestos moduladores o ligandos). Dichas "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas de ligando" se exploran después en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos así identificados pueden servir como "compuestos principales" convencionales o en sí mismos pueden usarse como agentes terapéuticos posibles o reales.

Una biblioteca química combinatoria es un conjunto de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, combinando diversos "bloques de construcción" químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, se forma combinando una serie de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en cada modo posible para una longitud del compuesto determinada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Millones de compuestos químicos pueden sintetizarse a través de dicha mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos.

La preparación y exploración de bibliotecas químicas combinatorias es muy conocida por los expertos en la técnica. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37 (1991) 487-493; y Houghton et al., *Nature* 354 (1991) 84-88). También pueden usarse otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero sin limitación: peptoides (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N°: 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6909-6913), polipéptidos análogos al vinilo (Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 6568), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 9217-9218), síntesis orgánica de análogos de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116 (1994) 2661), oligocarbamatos (Cho et al., *Science* 261 (1993) 1303), y/o peptidil fosfonatos (Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59 (1994) 658), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger y Sambrook, todos citados anteriormente), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14 (1996) 309-314 y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang et al., *Science*, 274 (1996) 1520-1522) y la Patente de Estados Unidos 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, Patente de Estados Unidos 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanones, Patente de Estados Unidos 5.549.974; pirrolidinas, Patentes de Estados Unidos 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de Estados Unidos 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514 y similares).

En el comercio se dispone de dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems,

Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además, en el comercio se dispone de numerosas bibliotecas combinatorias (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

5 SENP1 está estructuralmente relacionada con la familia de proteínas de la ubiquitina y esta similitud puede usarse para ayudar a diseñar antagonistas de SENP1. La familia de Modificadores Similares a Ubiquitina de Pequeño
 10 Tamaño (Ub1) (SUMO; revisado en Muller, S., et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2 (2001) 202-210) y Yeh, E.T., et al., Gene 248 (2000) 1-14), de la cual SENP1 es un miembro, está relacionada con la familia de la Ubiquitina. Aunque la identidad de secuencias entre las dos familias es <20 %, las estructuras generales son muy similares (2,1 Å rmsd
 (desviación cuadrática media) para los restos núcleo [21-93 y 1-72 de SUMO-1 y ubiquitina, respectivamente] (Bayer, P., et al., J. Mol Biol. 280 (1998) 275-286). Ambas proteínas se unen por enlace covalente mediante su
 15 grupo -COOH C-terminal con el grupo ε-NH₂ de una cadena lateral de Lisina (enlace isopeptídico) de la proteína diana. La ubiquitina y SUMO poseen motivos de di-Glicina conservados cerca del extremo C. La conjugación de la Ubiquitina y SUMO es un proceso complejo que implica diversas etapas: escisión de la cola C, activación y transferencia final (Johnson, E.S., et al., Embo J 16 (1997) 5509-5519; Gong, L., et al., FEBS Lett 448 (1999) 185-189).

A diferencia de la ubiquitina, los SUMO no forman uniones poliméricas debido a la sustitución del equivalente en Lys-48 de la Ubiquitina con Gln. Las rutas SUMO y ubiquitina difieren principalmente en la consecuencia de la
 20 modificación: el resultado más bien caracterizado de la ubiquitinación es el direccionamiento de la proteína marcada al proteasoma 26 S para la degradación. Las proteínas SUMOiladas no se diseñan para la degradación.

Se han identificado tres genes SUMO en seres humanos (véase la Tabla 1 para los números de acceso). Existe una similitud de secuencia/identidad del 62,0/49,0 % entre Smt3 y SUMO-1 humano (véase Tabla 2). Se ha resuelto la
 25 solución de la estructura de SUMO-1 humano (Bayer, P., et al., J Mol Biol. 280 (1998) 275-286).

Tabla 1: Secuencias (Números de acceso a SWISSPROT), motivos Pfam y Estructuras (archivos PDB).

<u>Secuencia/Motivo/Estructura</u>	<u>Descripción</u>
LEVADURAGP:ULP1	<i>S. cerevisiae</i> U1p1
LEVADURAGP:ULP2	<i>S. cerevisiae</i> U1p1
SW_HUM:SEN1_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP1
SW_HUM:SEN2_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP2
SW_HUM:SEN3_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP3
SW_HUM:SEN5_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP5
SW_HUM:SEN6_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP6
SW_HUM:SEN7_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP7
SW_HUM:SEN8_HUMANA	<i>H. sapiens</i> SENP8
PF02902	Pfam Ulp1_C (familia SENP)
leuv.pdb	Estructura de rayos X de Ulp1-Smt3 de levadura
PF00443	hidrolasa carboxilo-terminal de Ubiquitina Pfam (familia UCH)
SW_HUM:UBL3_HUMANA (P15374)	isozima L3 de ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:UBL1_HUMANA (P09936)	isozima L1 de ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:UBL5_HUMANA (Q9y5k5)	isozima L5 de ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa de <i>H. sapiens</i>
1uch.pdb	Estructura de rayos X de L3 - UCH de <i>H. sapiens</i>
1cmx.pdb	Estructura de rayos X ubiquitina aldehído - UCH de levadura
SW_HUM:SM33_HUMANA	<i>SUMO-1</i> de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:SM32_HUMANA	<i>SUMO-?</i> (<i>Sentrina 2</i>) de <i>H. sapiens</i>
SW_HUM:SM31_HUMANA	<i>SUM-?</i> de <i>H. sapiens</i>
LEVADURAGP:SMT3	Smt3 de <i>S. cerevisiae</i>
SW_HUM:UBIQ_HUMANA	Ubiquitina de <i>H. sapiens</i>
PF00240	familia de Ubiquitina Pfam
1a5r.pdb	Estructura NMR de SUMO-1 (Sm33) de <i>H. sapiens</i>

Tabla 2: Matriz de Similitud /Identidad de secuencias para Sm (SUMO) de *H. sapiens* y Smt3 de *S. cerevisiae*, por ejemplo: Sm31 y Sm32 tienen una similitud del 98,94 % y una identidad del 96,81 %.

	s m 3 1 h u m a n	s m 3 h u m a n	s m 3 h u m a n	1 a 5 r	l e u v	u b i q h u m a n
sm31_humana	96,81	48,96	48,96	48,10	15,79	3 espacios
sm32_humana	98,94	50,00	50,00	46,84	15,79	3 espacios
sm33_humana	65,62	64,98	100,00	50,63	18,42	3 espacio
1a5r	65,62	64,98	100,00	50,63	18,42	2 espacios
leuv	62,03	63,29	65,82	65,82	13,33	4 espacios
ubiq_humana	39,47	39,47	42,11	42,11	37,33	2 espacios

5 La SUMOilación es un proceso dinámico, reversible. En levaduras, la escisión de SUMO de su diana (desSUMOilación) se cataliza a través de cisteína proteasas denominadas ULP (por proteasas similares a Ubiquitina) y en ser humano a través de las SENP o SUSP (por proteasas específicas de sentrina/SUMO) (Li, S.J. y M. Hochstrasser, Nature 398 (1999) 246-251; Bailey, D. y P. O'Hare, J Biol Chem 279 (2004) 692-703). En levaduras se han identificado dos ULP (Ulp1 y Ulp2) y en ser humano al menos siete SENP (véase la Tabla 1). Estas proteasas desempeñan una doble función en la ruta de la SUMOilación: procesamiento de la cola C terminal para generar el motivo de di-Glicina y la desconjugación por hidrólisis del enlace isopeptídico Gly-Lys. No escinden enlaces isopeptídicos de ubiquitina. En levadura, la función de desconjugación de Ulp1 es esencial (Li, S.J. y M. M. Hochstrasser, Nature 398 (1999) 246-251). Es razonable especular que las diversas SENP distintas en mamíferos han evolucionado para funcionar con las distintas formas de SUMO. De manera adicional, la localización subcelular determina una limitación fisiológicamente significativa sobre la especificidad isopeptidasa de SUMO. Por ejemplo, SENP1 puede desconjugar SUMO-1 de Ran GAP1 *in vitro* pero no *in vivo*. Esto se atribuye al hecho de que Ran GAP1 está unido a las fibrillas citoplasmáticas del complejo de poros nucleares, mientras que SENP1 se localiza en el núcleo (Gong, L., et al., J Biol Chem 275 (2000) 3355-3359). En SENP1, en la posición 171-177, se encuentra una señal de localización nuclear (NLS1).

20 Un alineamiento de las siete SENP humanas y de dos secuencias de ULP indica que hay conservación entre el dominio catalítico C-terminal núcleo (restos 420-543 en SENP1; véase la Tabla 3) que posee los restos de Cys, His y Asp absolutamente conservados que forman la triada catalítica y un resto de Gln que forma el agujero de oxianión en el sitio activo (Gong, L., et al., J Biol Chem 275 (2000) 3355-3359). Se piensa que el dominio variable N-terminal desempeña una función reguladora ya que la expresión del dominio catalítico C terminal solo conduce a niveles más bajos de SUMO-1, indicativo de actividad catalítica constitutiva (Bailey, D. y P. O'Hare, J Biol Chem 279 (2004) 692-703).

Tabla 3: Matriz de Similitud/Identidad de Secuencias (superior/inferior) para SENP de *H. sapiens* y familias ULP de *S. cerevisiae*, por ejemplo: SENP1 y SENP2 tienen una similitud del 73,71 % y una identidad del 60,3 %

	senp1 24 espacios	senp2 23 espacios	senp3 23 espacios	senp5 24 espacios	senp6 14 espacios	senp7 17 espacios	senp8 18 espacios	ulp2 15 espacios	leuv 19 espacios
senp1_humana	60,31	43,62	43,62	43,62	31,41	21,79	27,03	37,57	
senp2_humana	73,71	37,23	30,73	30,73	30,73	20,11	27,57	35,84	
senp3_humana	65,69	56,38	29,79	26,74	22,29	22,29	27,07	27,75	
senp5_humana	62,23	55,85	31,91	30,11	22,29	25,56	28,32	29,94	
senp6_humana	56,77	52,08	54,79	57,43	24,86	29,63	29,63	29,94	
senp7_humana	53,93	50,26	48,13	72,28	22,95	29,26	31,43	31,43	
senp8_humana	40,22	36,87	44,00	44,32	46,45	21,71	21,39	21,39	
ulp2_levadura	50,81	45,41	51,38	46,67	50,00	40,00	30,99	30,99	
leuv	54,34	54,91	46,24	46,82	48,02	38,73	47,95	47,95	

La estructura de un complejo entre Ulp1 y Smt3 de levadura se ha resuelto (véase, por ejemplo, Mossessova, E. y C.D. Lima, Mol Cell 5 (2000) 865-876). Esta estructura y los alineamientos de secuencias descritos anteriormente se usaron para generar modelos de homología de SENP1 y SUMO-1 humana usando Moloc (Gerber, P.R. y K. Muller, J Comput Aided Mol Des 9 (1995) 251-268). Las interacciones observadas en el sitio activo de SENP1 humana modelada con el sustrato SUMO-1 son muy similares en las estructuras humanas modeladas y de levadura experimentales (véase Tabla 4). Existen enlaces de hidrógeno múltiples que implican los restos Glu93 y Gln94 de SUMO-1, aunque una muy pequeña interacción con Thr95. La Tabla 4 también enumera los restos homólogos en otros miembros de la familia SENP y hace una predicción sobre si estas interacciones de enlaces de hidrógeno con Glu93-Gln94 están preservadas. Basándose en este análisis, se prevé muy poca reactividad cruzada para SUMO-1 con otros miembros de la familia SENP ya que dos de los cuatro enlaces de hidrógeno crítico están perdidos. Específicamente, este análisis indica que un sustrato/inhibidor **EQTGG** sería muy específico para SENP1 y Ulp1 y no debería reaccionar en cruzado con otros miembros de la familia de proteasa específica de sentrina/SUMO humana. Por tanto, en algunas realizaciones, los antagonistas de SENP1 de la invención comprenden la secuencia EQTGG o miméticos de la misma.

Tabla 4: Interacciones de Homología de Enlaces Hidrógeno del complejo SENP1/SUMO-1 modelado con secuencia parcial EQTGG de sustrato/inhibidor propuesto. El texto en **negrita** indica que la interacción de enlaces hidrógeno se conserva con este resto.

Resto de SENP1	N467	K455	T499	T495
Detalles de interacción (restoSENP1:átomo -restoSUMO:átomo)	N467:Nδ2-E93:Oε1	K455:Nζ-E93:Oε2	T499:Oδ1-Q94:Nε2	T495:Oδ1-Q94:Oε1
Resto de SENP2	N412	G400	P444	T440
Resto de SENP3	N403	D391	D431	S427
Resto de SENP5	N584	D572	R612	S608
Resto de SENP6	N683	E671	K716	S712
Resto de SENP7	N711	E699	K744	S740
Resto de SENP8	N28	S16	Q60	P56
Resto de Ulp1	N450	R438	T477	S473

Como se ha descrito anteriormente, considerando esta información, existen diversas estrategias para desarrollar un inhibidor para SENP1. En algunas realizaciones, dado que las estructuras se encuentran disponibles tanto para SUMO-1 humano (dominio C terminal, NMR (Bayer, P., et al. J Mol Biol. 280 (1998) 275-286) como para el homólogo de levadura del complejo SENP1/SUMO-1 (rayos X (Mossessova, E. y C.D. Lima, Mol Cell 5 (2000) 865-876), un experto en la técnica puede realizar un diseño de inhibidores basado en estructura así como realizar una exploración virtual de compuestos para un efecto inhibidor previsto.

En algunas realizaciones, los antagonistas de SENP1 de la invención comprenden un aldehído. Los aldehídos son fuertes inhibidores de cisteína proteasas porque forman tiohemiacetales. Estos aductos covalentes estables imitan el estado de transición. Los ejemplos en los que los aldehídos se han usado para aclarar el mecanismo de las cisteína proteasas incluyen papaína (Schroder, E., et al., FEBS Lett, 315 (1993) 38-42) y ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa (Pickart, C.M. y I.A. Rose, J Biol Chem 261 (1986) 10210-10217). La reducción del sustrato Smt3 por NaBH₄ al aldehído C terminal se usó para generar un estado de transición estable análogo para estudios de cocrystalización con Ulp1 de levadura (Mossessova, E. y C.D. Lima, Mol Cell 5 (2000) 865-876). Por lo tanto, un aldehído Gly-Gly podría servir como un fuerte inhibidor de la cisteína proteasa SENP1.

Los tres aminoácidos aguas arriba de Gly-Gly C terminal de SUMO-1 (Glu-Gln-Thr), o un mimético del mismo, pueden utilizarse en un inhibidor dado que estos restos contribuyen significativamente a la especificidad de la interacción SENP1/SUMO-1 (Tabla 4 y Tabla 5). Aunque Thr95 no interacciona fuertemente con SENP1, proporciona el espaciado adecuado entre el enlace peptídico escindible y los restos Glu93-Gln95.

Tabla 5: Secuencia C terminal de las tres proteínas SUMO de *H. sapiens*. La secuencia correspondiente a x1-x3 en la Figura 3 se indica subrayada; el motivo de di-Glicina se indica en **negrita**

Sm31	TIDVFQQQT GG VPESSLAGHSF
Sm32	TIDVFQQQT GG VY
Sm33	VIEVYQE QTGG HSTV
Smt3	IIEAHRE QIGG ATY

Aunque la estructura del complejo SENP1/SUMO-1 indica que la lisina y sus restos flanqueantes de la proteína diana no interaccionan con SENP1, un diseño de inhibidor alternativo podría incluir estos aminoácidos o restos para imitar sus grupos funcionales.

Un medio posible para validar la especificidad es explorar virtualmente la unión del inhibidor de SENP1 propuesto con una familia de proteínas muy relacionada con SENP1 en cuanto a estructura, función y mecanismo, tal como la ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa (motivo Pfam UCH; PF00443). Una búsqueda de la base de datos de Swissprot revela tres secuencias pertenecientes a la familia UCH en seres humanos (Tabla 1). La estructura de diversas UCH se ha resuelto, incluyendo la isozima L3 de la UCH humana (Johnston, S.C., et al., *Embo J*, 16(13): 3787-96 (1997)) y la enzima de levadura en complejo con aldehído ubiquitina C terminal (Johnston, S.C., et al., *Embo J*. 18 (1999) 3877-3887). Podrían construirse modelos de homología para los otros miembros de la familia usando, como molde, estas estructuras de rayos X. Un inhibidor altamente específico del inhibidor de SENP1 interaccionaría favorablemente con SENP1, pero no con ninguna UCH. Por tanto, en algunas realizaciones, los métodos de exploración de la invención comprenden adicionalmente seleccionar un agente que se una y/o inhiba SENP1 pero que no inhiba al menos una ubiquitina carboxilo-terminal hidrolasa.

La localización nuclear de SENP1 desempeña una función en su especificidad por el sustrato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, para garantizar reactividad cruzada mínima del inhibidor propuesto con otras cisteína proteasas, se puede utilizar la propia secuencia de localización nuclear (NLS1; PKKTQRR) de SENP1 como parte del inhibidor en un diseño de Caballo de Troya. Esta secuencia heptapeptídica, cuando se modela sobre la estructura SUMO-1 del complejo modelado de homología SENP1-SUMO1, muestra solo un solapamiento estérico que implica el Inhibidor Arg6' con SENP1 en Lys500. Sin embargo, habría suficiente espacio para que el heptapéptido realizase ajustes conformacionales para impedir dichas interacciones estéricas o de carga desfavorables dado que faltarían los 92 primeros aminoácidos de SUMO-1. Por consiguiente, en algunos casos, un inhibidor de SENP1 comprende uno o más de lo siguiente: 1) un aldehído Gly Gly, 2) la secuencia Glu-Gln-Thr, o un mimético de la misma, y/o 3) una señal de localización nuclear tal como PKKTQRR.

IX. Composiciones farmacéuticas y administración

Pueden administrarse antagonistas de SENP1 directamente al sujeto mamífero para el tratamiento de cánceres, que incluyen, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado. La administración puede realizarse mediante cualquiera de las vías normalmente utilizadas para introducir un agente quimioterapéutico u otro fármaco anticanceroso en contacto final con el tejido a tratar. Aunque puede usarse más de una vía para administrar una composición particular, a menudo una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Pueden administrarse antagonistas de SENP1 a un individuo como el único ingrediente activo o en combinación con agentes quimioterapéuticos u otros agentes anticancerosos.

Por lo tanto, la presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de SENP1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización de la descripción, se proporciona un antagonista de SENP1 para su uso en medicina. En otra realización de la descripción, se usa un antagonista de SENP1 en la fabricación de un medicamento o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado. Prefiriéndose particularmente cáncer de vejiga.

Las composiciones farmacéuticas descritas pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que va a administrarse, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed. 1985)).

Los antagonistas de SENP1, solos o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación. Las formulaciones en aerosol pueden colocarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similar.

Las formulaciones adecuadas para administración incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. En la práctica, las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, nasal, tópica, intravenosa, intraperitoneal o intratecal. Las formulaciones de antagonistas pueden presentarse en envases unidos o multidosis herméticamente cerrados, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo previamente descrito. Los antagonistas también pueden administrarse como parte de un alimento o fármaco preparado.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente descripción, debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una diversidad de factores incluyendo la eficacia del antagonista específico empleado, la edad, peso corporal, actividad física y dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la gravedad de una

enfermedad particular. El tamaño de la dosis también se determinará por la existencia, naturaleza y grado de cualquiera de los efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un compuesto particular o vector en un sujeto particular.

- 5 A la hora de determinar la cantidad eficaz del antagonista a administrar, un médico puede evaluar los niveles plasmáticos circulantes del antagonista, la toxicidad del antagonista y la producción de anticuerpos anti-antagonistas. En general, la dosis equivalente de un antagonista es de aproximadamente 1 ng/kg a 10 mg/kg para un sujeto típico. La administración puede realizarse mediante dosis unitarias o divididas.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Asociación de expresión de SENP1/telomerasa con cáncer de vejiga

- 15 El trabajo de la presente invención muestra que, un nivel aumentado de ARNm de proteasa específica de sentrina/SUMO (SENP1) está presente en el sedimento de orina de pacientes con cáncer de vejiga, que tienen tumores que, en el sedimento de orina no expresan ARNm de telomerasa (TERT). Por tanto, la medición de SENP1 puede usarse para diagnosticar, monitorizar y evaluar el pronóstico de cánceres, particularmente, aunque no necesariamente de manera exclusiva, en casos en los que TERT no se expresa.

- 20 El trabajo de la presente invención muestra que un aumento en la expresión de ARNm de SENP1 está asociado con células de tumores que no expresan niveles detectables de ARNm de telomerasa. Hasta donde se sabe, ésta es la primera demostración de que la SENP1 es elevada en muestras negativas a telomerasa de pacientes con cáncer. En este contexto, SENP1 proporciona un marcador útil en ensayos de diagnóstico, monitorización y pronóstico para
25 la sobreexpresión de SENP1. Por lo tanto, la sobreexpresión de SENP1 es un marcador útil para la detección de algunos tumores que son positivos a telomerasa.

- Se obtuvo orina (100 ml) de sujetos humanos que estaban sanos o a los que se había diagnosticado cáncer de vejiga. Las células de estas muestras se recogieron por centrifugación a baja velocidad (700 x g durante 10
30 minutos), y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato. Las células se sometieron a lisis en tampón de lisis suministrado en el kit de ARN total HighPure de Roche. El ARN total se purificó usando el kit de ARN total HighPure de Roche. Las muestras se evaluaron por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) cuantitativa, en tiempo real, para determinar la expresión del gen que codifica la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y la expresión de la proteína fosfatasa 1, subunidad catalítica, isoforma alfa (PPP1CA),
35 un gen usado para monitorizar el rendimiento del ARN de las muestras.

- Para este estudio, se analizaron diecinueve muestras negativas a telomerasa de pacientes con cáncer de vejiga y diecinueve muestras negativas a telomerasa de pacientes sanos por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. En cada
40 ensayo, las condiciones experimentales fueron las siguientes: reacciones de 100 µl contenían bicina 50 mM, pH 8,0, acetato potásico 115 mM, glicerol al 8 %, acetato de manganeso 3 mM, 200 µM de cada desoxiadenosina trifosfato, desoxicitidina trifosfato, desoxiguanosina trifosfato y 500 µM de desoxiuridina trifosfato, 2 Unidades de uracil *N*-glucosilato (UNG) de Applied Biosystems, 10 Unidades de *rTth* ADN polimerasa (forma recombinante de ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* de Applied Biosystems), sonda 5' nucleasa 10 nM, 200 nM de cada cebador, directo e inverso. Se realizó la transcripción inversa del ARN de SENP1, se amplificó y se detectó con una sonda
45 marcada con fluorescencia.

- Los ensayos se realizaron en el ABI Prism 7700 con las siguientes condiciones de ciclo: Una etapa de incubación inicial a 50 °C durante 2 minutos para permitir la eliminación mediada por UNG de cualquier contaminación por el
50 producto remanente de la PCR, desnaturalización durante 1 minuto a 95 °C, y una etapa de transcripción inversa de 30 minutos a 60 °C, se realizaron después de 50 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 segundos y una hibridación/extensión a 60 °C durante 40 segundos. Vale la pena señalar que estas condiciones de ensayo establecidas son arbitrarias y que pueden obtenerse los mismos resultados con una diversidad de concentraciones de tampones, sales, glicerol/DMSO, concentraciones de nucleótidos, concentraciones de cebador y sonda, transcriptasas inversas, enzimas ADN polimerasas, métodos de dos enzimas/un tubo o dos enzimas/dos tubos para
55 la RT-PCR, con y sin UNG, usando magnesio o manganeso como catión divalente, diversas concentraciones de cebador/sonda, condiciones de secuencias y de termociclado. Las secuencias de cebadores y sondas fueron las siguientes: para SENP1 CAAGAAGTGCAGCTTATAATCCAA (SEC ID N°: 6; cebador en "sentido" directo) y GTCTTTGGGTTTCGAGGTAA (SEC ID N°: 7; cebador "antisentido" inverso), CTCAGACAGTTTTCTTGGCTCAGGCG (SEC ID N°: 8; sonda); para PPP1CA GAGCACACCAGGTGGTAGAA (SEC ID N°: 9; cebador directo), GGGCTTGAGGATCTGGAAA (SEC ID N°: 10; cebador inverso),
60 GAGTTTGACAATGCTGGCGCCATGATGAGT (SEC ID N°: 11; sonda).

- Los niveles de ARNm de SENP1 se midieron por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los números de copias relativos de SENP1 se determinaron basándose en patrones de cuantificación de ARN. Estos patrones consisten en
65 transcritos de PPP1CA no iniciados (run-off) de concentraciones conocidas, sometidos a transcripción inversa y amplificados por PCR en las mismas condiciones que las de las muestras experimentales. Se calcularon los valores

de umbral del ciclo (Ct, *Cycle threshold*) para proporcionar una medida de la cantidad de ARNm que estaba presente al inicio de la reacción de amplificación. Dado que en las reacciones de amplificación son raras las eficiencias, si hubiere, lo mismo ocurre con diferentes conjuntos de cebador/sonda o en patrones frente a muestras de sujetos humanos debido a la posible presencia de inhibidores de transcripción inversa que podría llevar a cabo la preparación de la muestra en el último caso, los números de copias se indican como copias relativas de un transcripto determinado en una muestra en lugar de como un número de copias absoluto.

Como se muestra en la Tabla I, en sujetos sanos, la mediana del número de copias de SENP1 es de 4, la mediana en pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa es de 1899 copias. En lugar de la media se calcula la mediana para mitigar el efecto de valores atípicos en los cálculos. La curva característica operativa del receptor para estas muestras (Figura 1) (determinada de acuerdo con los métodos de Agresti, A., *Categorical Data Analysis*, págs. 228-230 (2002)) muestra que los pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa pueden diferenciarse de los sujetos sanos negativos a telomerasa basándose en SENP1. Para una primera aproximación este subconjunto de pacientes puede diferenciarse de otro con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 90 %.

Tabla I: Copias relativas de ARNm de SENP1 en sujetos sanos frente a pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa

	Pacientes con cáncer de vejiga – Negativos a telomerasa	Sujetos Sanos
	Copias de SENP1	Copias de SENP1
	125	0
	201	0
	240	0
	304	0
	322	0
	655	0
	1184	0
	1413	0
	1499	3
	1899	4
	2708	4
	2873	5
	4113	10
	4610	10
	5188	12
	5839	21
	6195	26
	9941	380
	141773	1675
Mediana	1899	4

Estos datos también pueden normalizarse con el nivel de un gen constitutivo presente en cada muestra. Dicha normalización controla variaciones en el número de células en la muestra inicial, cualquier degradación de ARN o la presencia de inhibidores en una muestra. En este caso, el nivel de PPP1CA previamente medido, en las mismas condiciones, se usó para la normalización. Los cálculos fueron los siguientes: el número relativo de copias de ARNm de SENP1 en una muestra determinada se dividió entre el número relativo de copias de ARNm de PPP1CA en la misma muestra. Para facilitar el tratamiento y el registro, este número se multiplicó por 1×10^5 . Por tanto, el número de copias normalizado para el ARNm de SENP1 mostrado en la Tabla II representa el número de copias de ARNm de SENP1 por 1×10^5 copias de ARNm de PPP1CA. La mediana del número de copias normalizado para el ARNm de SENP1 en sujetos sanos es 1096, la mediana en pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa es de 11994. La curva característica operativa del receptor para estos datos (Figura 1) muestra que los pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa pueden diferenciarse de los sujetos sanos negativos a telomerasa basándose en SENP1. Para una primera aproximación este subconjunto de pacientes puede diferenciarse de otro con una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 70 %.

Tabla II: Copias relativas de ARNm de SENP1 normalizadas con niveles del gen constitutivo PPP1CA en sujetos sanos frente a pacientes con cáncer de vejiga negativos a telomerasa

	Pacientes con cáncer de vejiga – Negativos a telomerasa	Sujetos Sanos
	Copias de SENP1	Copias de SENP1
	2017	0
	2344	0
	3242	0
	3379	0
	3509	0
	5095	0
	6892	0
	8182	0
	10413	137
	11994	1096
	15370	1445
	16401	1592
	17827	2257
	22070	3688
	22378	4561
	23384	7639
	26195	10591
	33182	19453
	76298	47093
Mediana	11994	1096

- 5 Los resultados indican que SENP1 puede usarse como un marcador para diferenciar pacientes con cáncer de pacientes sanos basándose en el ARNm encontrado en células en muestras de los pacientes.

Ejemplo 2: Asociación de la expresión de SENP1 y/o telomerasa con cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de intestino delgado

10 Se homogeneizaron 100 mg de tejidos sólidos congelados en 7,5 ml de solución Ultraspec (Biotecx) durante 30 segundos. El ARN total se extrajo usando el kit de ARN Ultraspec® de Biotecx. Después el ARN se purificó usando el kit mini RNeasy de QIAGEN (para un máximo de 100 ug de ARN total), incluyendo un tratamiento con DNasa de QIAGEN. Se sintetizó ADNc usando 3-50 ug de ARN total por reacción, basándose en el método descrito en el kit de síntesis de ADNc Bicatenario Superscript™ de Invitrogen. Los reactivos se adquirieron en Invitrogen salvo que se indique otra cosa. En la reacción de síntesis de la primera cadena, las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 5 pM de cebador Poly dT (Affymetrix nº 900375), Tampón de Primera Cadena 1X, DTT 0,01M, 0,5 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 400 Unidades de Transcriptasa Inversa RNasa H SuperScript™ (SSRT), el volumen de reacción total era de 20 µl. El cebador de primera cadena (1 µl) se incubó con ARN total (más agua sin RNasa para aportar un volumen de 10 µl) a 70 °C durante 10 min, seguido de incubación en hielo durante 2 min. Se añadió Tampón de Primera Cadena, DTT y los dNTP seguido de incubación a 42 °C durante 2 min. Después de la adición de SSRT II las muestras se incubaron durante 1 h a 42 °C. Después se realizó la síntesis de la segunda cadena. A toda la reacción de 20 µl de la síntesis de primera cadena se añadieron los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: Tampón de Segunda Cadena 1X, 0,2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 U de ADN Ligasa de *E. coli*, 40 U de ADN Polimerasa I de *E. Coli*, 2 U de RNasa H, 20 U de ADN Polimerasa de T4, el volumen de reacción total era de 150 µl. Todos los reactivos excepto la ADN Polimerasa de T4 se mezclaron y se incubaron durante 2 h a 16 °C. Después se añadió ADN Pol de T4 seguido de una incubación a 16 °C durante 5 min.

30 Para cada muestra los 150 µl completos de los ADNc bc (bicatenarios) resultantes se purificaron usando Gel Phase Lock (disponible en Brinkmann) de la siguiente manera: se mezclaron los 150 µl de los ADNc bc con un mismo volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. La fase acuosa se transfirió al nuevo tubo y el ARN se precipitó mediante métodos convencionales usando acetato de amonio y etanol, seguido de dos lavados con etanol al 100 % enfriado con hielo. El sedimento se secó y se resuspendió en 2-10 ul de agua desionizada sin RNasa. El ADNc se cuantificó midiendo la DO260.

35 Se realizó PCR cuantitativa en las muestras en las siguientes condiciones: 7 ng de ADNc, 1X de mezcla maestra universal TaqMan® (reserva adquirida disponible en Applied Biosystems, considerada a 2X), 2,4 µM de cada uno de los cebadores directo e inverso de GAPDH humano, y 0,5 uM de sonda TaqMan de GAPDH humano, y a mismo tubo de reacción se añadieron los cebadores y la sonda para un gen de interés determinado, a las concentraciones

descritas para los cebadores y sondas de GAPDH. Las secuencias de estos cebadores y sondas fueron: Para SENP1, CAAGAAGTGCAGCTTATAATCCAA (cebador en "sentido" directo) y GTCTTTCCGGTTTCGAGGTAA (cebador "antisentido" inverso), CTCAGACAGTTTTCTGGCTCAGGCG (sonda TaqMan); para TERT, TGGGCACGTCCGCA (directo), GGCGTGGTGGCACATGAA (inverso), TCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGG (sonda TaqMan). Todos los cebadores y sondas, incluidos aquellos para un panel de siete genes constitutivos (véase más adelante) se adquirieron en ABI. El volumen total de cada ensayo fue de 20 μ l. El ciclado se realizó en un Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism® 7900 HT. Después de 10 minutos a 95 °C se realizó una incubación inicial de 2 minutos a 50 °C y después 40-55 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

Los niveles de expresión relativos del ARNm de SENP1 y TERT (denominados genes de interés o GOI, *Genes Of Interest*) se calcularon de la siguiente manera: los valores de umbral del ciclo (Ct) se determinaron a partir de la RT-PCR para SENP1 y TERT, GAPDH y un panel de siete genes "constitutivos" humanos. Los siete genes fueron hipoxantina fosforibosil transferasa, β -glucuronidasa, β 2-microglobulina, fosfoglicerato quinasa, ciclofilina, β -actina y proteína PO ribosomal grande. Basándose en los Ct del panel de los genes constitutivos, el Ct de la GAPDH se ajustó para dar el valor esperado. Este ajuste compensa cualquier pequeña diferencia inesperada en el Ct de la GAPDH que podría explicarse porque la GAPDH no se comporta como el gen constitutivo "medio" en una muestra particular. El nivel expresión relativo del GOI se calcula después como:

$$\text{Ct(GAPDH ajustado)} - \text{Ct (GOI)} = \Delta\text{Ct}$$

$2^{\Delta\text{Ct}}$ = nivel de expresión relativo del GOI.

Como se muestra en la Figura 2 y en la Tabla III, estos datos existentes muestran que en una diversidad de cánceres algunos, aunque no todos, los tumores muestran expresión de telomerasa (TERT) elevada superior a la de las células normales. Del mismo modo, algunos tumores, aunque no todos, muestran un aumento en la expresión de SENP1. El uso tanto de SENP1 como de TERT en combinación como marcadores moleculares para el cáncer permite identificar un número mayor de muestras de tejido tumoral como positivas a cáncer en comparación con el uso de cualquier marcador en solitario. Por tanto, un ensayo molecular en el que la regulación positiva de cualquier marcador se puntúe como positiva para el cáncer podría mostrar una sensibilidad aumentada para la detección del cáncer. Esta sensibilidad incrementada llegaría, no sorprendentemente, a un coste de alguna especificidad disminuida (es decir, un mayor número de sujetos que no tienen cáncer se identificarían como que tienen cáncer). Para usar un ensayo para establecer un diagnóstico determinado, se seleccionarían valores estandarizados para pronósticos positivos y negativos que maximizarían pronósticos correctos, maximizando así la sensibilidad y especificidad. En los ejemplos mostrados, se seleccionan valores de umbral para que, cada marcador individual, proporcione aproximadamente una especificidad del 80 %. A menos que se muestre lo contrario, el umbral para la detección del TERT es cero.

La Tabla III proporciona un resumen del comportamiento de la telomerasa y de senp1 como únicos marcadores o como marcadores combinados. La sensibilidad es el número de muestras positivas a cáncer de un tipo de tejido determinado que se denominan positivas a cáncer dividido entre el número total de muestras positivas a cáncer de este tipo de tejido. La especificidad es el número de muestras negativas a cáncer (o normales) de un tipo de tejido determinado que se denominan negativas a cáncer dividido entre el número total de muestras negativas a cáncer de ese tipo de tejido. La "precisión" de un ensayo determinado se define como la suma de su sensibilidad y especificidad.

Tabla III

Tipo de cáncer	Telomerasa			SENPI			Combinadas		
	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	Sensibilidad	Especificidad	Precisión	Sensibilidad	Especificidad	Precisión
Vejiga	3/4 75 %	7/8 87 %	162 %	2/4 50 %	8/8 100 %	150 %	4/4 100 %	7/8 87 %	187 %
Mama	7/11 63 %	7/7 100 %	163 %	1/11 9 %	6/7 85 %	94 %	8/11 72 %	6/7 85 %	157 %
Colon	9/54 16 %	14/17 82 %	98 %	14/54 26 %	14/17 82 %	108 %	21/54 38 %	13/17 76 %	114 %
Riñón	0/7 0 %	5/5 100 %	100 %	4/7 57 %	5/5 100 %	157 %	4/7 57 %	5/5 100 %	157 %
Pulmón	3/14 21 %	20/21 95 %	116 %	5/14 36 %	17/21 80 %	116 %	7/14 50 %	16/21 76 %	126 %
Ovario	0/3 0 %	4/5 80 %	80 %	1/3 33 %	4/5 80 %	113 %	1/3 33 %	3/5 60 %	93 %
Pancreático	1/6 16 %	1/1 100 %	116 %	3/6 50 %	1/1 100 %	150 %	4/6 66 %	1/1 100 %	166 %
Pancreático (2º grupo)	2/9 22 %	10/10 100 %	122 %	4/9 44 %	9/10 90 %	134 %	5/9 56 %	9/10 90 %	146 %
Pancreático (metastásico)	5/6 83 %	100 %	183 %	1/6 17 %	90 %	107 %	5/6 83 %	90 %	173 %
Intestino delgado	0/2 0 %	7/8 87 %	87 %	2/2 100 %	7/8 87 %	187 %	2/2 100 %	7/8 87 %	187 %
PARA TODOS LOS CANCERES	30/116 26 %	75/82 91 %	117 %	36/116 31 %	71/82 87 %	118 %	59/116 51 %	67/82 82 %	133 %

Listado de Referencias

- Agresti, A., *Categorical Data Analysis*, págs. 228-230, 2002
- 5 Akerstrom et al., *J. Immunol.* 135 (1985) 2589-2542
- Alderton et al., *Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-169
- Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410
- Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25 (1977) 3389-3402
- Angelopoulou et al., *Anticancer Res.* 23 (2003) 4821-4829
- Arnold et al., *Clin. Chem.* 35 (1989) 1588-1594
- 10 Asai (ed.), *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, Vol. 37, 1993
- Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 2002
- Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995 Suplem.
- Bacchetti, S. y Counter, C.M. *Int. J. Oncology* 7 (1995) 423-432
- Bailey et al., *J Biol Chem.* 279 (2004) 692-703
- 15 Bates et al., *Mol. Plant Pathol.* 2 (2001) 275-280
- Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993)
- Bayer, P., et al., *J Mol Biol.* 280 (1998) 275-286
- Bodnar, A.G., et al., *Science* 279 (1998) 349-352
- Bryan, T.M., *Hum Mol Genet* 6 (1997) 921-926
- 20 Bryan, T.M., *Nature Medicine* 3 (1997) 1271-1274
- Campbell et al., *J. Org. Chem.* 59 (1994) 658
- Capaldi et al., *Nucleic. Acids Res.*, 28 (2000) 21e
- Chen et al., *Biotechniques* 35 (2003) 158-162
- Chen et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 116 (1994) 2661
- 25 Cho et al., *Science* 261 (1993) 1303
- Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, págs. 77-96, 1985
- Coligan, *Current Protocols in Immunology*, 1991
- Collins, K., *Curr. Opin Cell Biol.* 12 (2000) 378-383
- Compton, *Nature* 350 (1991) 91-92
- 30 Cong, Y.S., et al., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 407-425
- De Lange, T., *Science* 279 (1998) 334-335
- DeGraves, et al., *Biotechniques* 34 (2003) 106-110, 112-115
- Deiman B. et al., *Mol Biotechnol.* 20 (2002) 163-179
- DeVita, V.T., et al. (eds.), *Cancer: Principles and Practice*, 1997
- 35 Dunham, M.A. et al., *Nature Genetics* 26 (2000) 447-450
- Eagle et al., *J. Exp. Med.* 131 (1970) 836-879
- Folkman, *Angiogenesis and Cancer*, *Sem Cancer Biol.*, 1992
- Freshney *Anticancer Res.* 5 (1985) 111-130
- Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique*, 3ª ed., 1994 Furka, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37
- 40 (1991) 487-493
- Gerber, P.R. y K. Muller, *J Comput Aided Mol Des* 9 (1995) 251-268 Gibson et al., *Genome Research* 6 (1996) 995-1001
- Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., 1986 Gong et al., *J Biol Chem.* 275 (2000) 3355-3359
- 45 Gong, L., et al., *FEBS Lett* 448 (1999) 185-189
- Greiden et al., *Nature* 337 (1989) 331
- Guilleret, I. et al., *Carcinogenesis* 23 (2002) 2025-2030
- Gullino, *Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth*, in *Biological Responses in Cancer*, Mihich (ed.) págs. 178-184, 1985
- Hagihara et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 6568
- 50 Hanahan y Weinberg, *Cell* 100 (2000) 57-70
- Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 1988
- Hatch et al., *Genet. Anal.* 15 (1999) 35-40
- Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1989) 10915
- Hirschmann et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 114 (1992) 9217-9218
- 55 Hiyama et al., *Cancer Lett.* 194 (2003) 221-233
- Hobbs et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6909-6913
- Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7276-7280
- Houghton et al., *Nature* 354 (1991) 84-88
- Huse et al., *Science* 246 (1989) 1275-1281
- 60 Innis et al. (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, 1990
- Iqbal et al., *Mol. Cell Probes* 13 (1999) 315-320
- Jakobi et al., *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201
- Johnson, E.S., et al., *Embo J* 16 (1997) 5509-5519
- Johnston, S.C., et al., *Embo J.* 18 (1999) 3877-3887
- 65 Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 5873-5787
- Kievits et al., *J. Virol. Methods* 35 (1991) 273-286

Kim, N.W. et al. *Science* 266 (1994) 2011-2015
 Klostermeier y Millar, *Biopolymers* 61 (2002) 159-179
 Kohler y Milstein, *Nature* 256 (1975) 495-497
 5 Kozbor et al., *Immunology Today* 4 (1983) 72
 Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, 1990
 Kronval et al., *J. Immunol.* 111 (1973) 1401-1406
 Larrick, J. (ed.), *The PCR Technique: Quantitative PCR*, 1997
 Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761-3766
 Li, S.J. y M. Hochstrasser, *Nature* 398 (1999) 246-251
 10 Liang et al., *Science*, 274 (1996) 1520-1522
 Lipinski et al. *Adv Drug Delivery Res* 23 (1997) 3-25
 Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12 (1999) 75-99
 Little et al., *Clin. Chem.* 45 (1999) 777-784
 Lizardi et al., *Bio/Technology* 6 (1988) 1197
 15 Maggio (ed.), *Enzyme Immunoassay*, 1980
 Marko et al., *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-387
 Marks et al., *Biotechnology* 10 (1992) 779-783
 McCafferty et al., *Nature* 348 (1990) 552-554
 McEachern, M.J., et al. *Annu. Rev. Genet.* 34 (2000) 331-358
 20 Mehle, C., et al., *Oncogene* 13 (1996) 161-166
 Melissourgos et al., *Urology* 62 (2003) 362-367
 Miller et al., *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 393-397
 Mossessova, E. y C.D. Lima, *Mol Cell* 5 (2000) 865-876
 Muller, S., et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 202-210
 25 Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 (1970) 443
 Nilsen et al., *J. Theoretical Biology* 187 (1997) 273-284
 Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 1993
 PCT/GB91/00212
 PCT/US96/10287
 30 Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444
 Phyffer, et al., *J. Clin. Microbiol.* 34 (1996) 834-841
 Piatyszek M. A. et al., *Meth. Cell Sci.* 17 (1995) 1-15
 Pickart, C.M. e I.A. Rose, *J Biol Chem* 261 (1986) 10210-10217 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª ed.,
 1985
 35 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed., 2001
 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vols. 1-3 Cold Spring Harbor Press, Nueva
 York, 1989,
 Scheel, C. y Poremba, C. *Virchows Arch* 440 (2002) 573-582
 Schroder, E., et al., *FEBS Lett*, 315 (1993) 38-42
 40 Shay, J.W. y Bacchetti, S., *Eur. J. Cancer*, 33 (1997) 787-791
 Shippen-Lentz et al., *Science* 247 (1990) 546
 Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 (1970) 482c
 Stites y Terr (eds.), *Basic and Clinical Immunology*, 7ª ed., 1991
 Strickland y Beers, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5694-5702
 45 Taton et al., *Science* 289(2000) 1757-1760
 Temin, *J. Natl. Cancer Insti.* 37 (1966) 167-175
 Thellin, O. et al., *J. Biotechnol.* 75 (1999) 291
 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of
 principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays", 1993
 50 Tsutsui, T. et al., *Carcinogenesis* 24 (2003) 953-965
 Tyagi y Kramer, *Nature Biotech.* 14 (1996) 303-309
 Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 07/695,072
 Unkless et al., *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 4295-4305
 55 US 2002/0012969
 US 2002/0025518
 US 4.366.241
 US 4.376.110
 US 4.517.288
 US 4.683.195
 60 US 4.683.202
 US 4.767.700
 US 4.837.168
 US 4.851.331
 US 4.889.818
 65 US 4.914.210
 US 4.946.778

ES 2 464 719 T3

	US 4.948.882
	US 4.994.373
	US 5.010.175
	US 5.079.352
5	US 5.102.784
	US 5.118.605
	US 5.118.802
	US 5.119.801
	US 5.135.717
10	US 5.155.018
	US 5.210.015
	US 5.232.829
	US 5.234.809
	US 5.288.514
15	US 5.294.534
	US 5.312.728
	US 5.352.600
	US 5.405.774
	US 5.424.414
20	US 5.437.977
	US 5.464.746.
	US 5.466.591
	US 5.487.972
	US 5.491.063
25	US 5.506.337
	US 5.514.546
	US 5.519.134
	US 5.525.462
	US 5.525.465
30	US 5.525.735
	US 5.539.083
	US 5.547.861
	US 5.549.974
	US 5.556.959
35	US 5.569.588
	US 5.571.673
	US 5.593.853
	US 5.595.890
	US 5.597.696
40	US 5.618.711
	US 5.641.633
	US 5.648.245
	US 5.674.738
	US 5.679.510
45	US 5.679.785
	US 5.683.872
	US 5.683.875
	US 5.707.813
	US 5.710.028
50	US 5.714.320
	US 5.728.525
	US 5.750.343
	US 5.789.562
	US 5.792.614
55	US 5.795.718
	US 5.795.762
	US 5.800.989
	US 5.804.375
	US 5.808.036
60	US 5.808.044
	US 5.814.447
	US 5.837.453
	US 5.844.106
	US 5.846.723
65	US 5.846.726
	US 5.853.990

US 5.856.092
 US 5.866.336
 US 5.876.924
 US 5.880.287
 5 US 5.882.867
 US 5.888.72
 US 5.888.739
 US 5.919.630
 US 5.935.791
 10 US 5.945.283
 US 5.955.589
 US 5.958.700
 US 5.972.602
 US 5.981.176
 15 US 5.990.303
 US 5.994.063
 US 6.001.611
 US 6.022.686
 US 6.033.854
 20 US 6.054.279
 US 6.080.068
 US 6.110.677
 US 6.121.001
 US 6.124.090
 25 US 6.130.047
 US 6.140.055
 US 6.174.998
 US 6.177.249
 US 6.180.349
 30 US 6.210.884
 US 6.214.979
 US 6.221.603
 US 6.221.604
 US 6.245.514
 35 US 6.261.779
 US 6.261.784
 US 6.268.128
 US 6.294.338
 US 6.312.906
 40 US 6.320.005
 US 6.326.145
 US 6.335.166
 US 6.344.329
 US 6.348.596
 45 US 6.350.580
 US 6.352.827
 US 6.361.944
 US 6.365.724
 US 6.368.803
 50 US 6.379.888
 US 6.383.393
 US 6.383.756 US 6.391.554
 US 6.399.303
 US 6.399.392
 55 US 6.406.297
 US 6.417.340
 US 6.440.707
 US 6.495.324
 US 6.506.564
 60 US 6.528.254
 US 6.528.632
 US 6.551.774
 US 6.582.964
 US 6.596.527
 65 US 6.607.898
 Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14 (1996) 309-314

5 Vogelstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-619
 Vuorinen, et al., J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 1856-1859
 Walker, et al. Nucleic Acids Res. 20 (1992) 1691-1696
 Walker, PCR Methods Appl 3 (1993) 1-6
 Wang et al., Electroanalysis 10 (1998) 553-556
 Wang et al., J. Am. Chem. Soc. 120 (1998) 8281-8282
 Ward et al., Nature 341 (198) 544-546
 Warrington, J.A. et al., Physiol. Genomics 2 (2000) 143
 Wege et al., Nuc. Acids Res. 31 (2003) e3
 10 Whur et al., Br. J. Cancer 42 (1980) 305-312
 Wilson et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, 12^a Edition, McGraw-Hill, Inc., 1991
 WO 01/37291
 WO 91/19735
 WO 92/00091
 15 WO 93/20242
 WO 95/35390
 Woodring et al., Nuc. Acids Res. 23 (1995) 3794-3795
 Wu y Brand, Anal. Biochem. 218 (1994) 1-13
 Yan, P. et al. Cancer Res. 59 (1999) 3166-3170
 20 Yeager, T.R., et al., Cancer Res. 59 (1999) 4175-4179
 Yeh, E.T., et al., Gene 248 (2000) 1-14

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> SENP1 como marcador para el cáncer
 <130> 22347EP1
 30 <150> US 60/569.220
 <151> 06-05-2004
 <150> US 60/599.318
 35 <151> 05-08-2004
 <160> 20
 <170> Patent In Ver. 3.2
 40 <210> 1
 <211> 1932
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <220>
 <223> Proteasa 1 específica de sentrina/SUMO (SENP1)
 <400> 1
 50

ES 2 464 719 T3

```

atggatgata ttgctgatag gatgaggatg gatgctggag aagtgacttt agtgaaccac 60
aactcogtat tcaaaaccca cctcctgcc aaaaacaggtt ttccagagga ccagctttcg 120
ctttctgacc agcagat ttt atcttccagg caaggacatt tggaccgatc ttttacatgt 180
tccacaagaa gtgcagctta taatccaagc tattactcag ataatccttc ctcagacagt 240
tttcttggct caggcgat ttt aagaaccttt ggccagagtg caaatggcca atggagaaat 300
tctaccccat cgcaagctc atctttacaa aatcaagaa acagccgaag tctttacctc 360
gaaacccgaa agacctcaag tggattatca aacagttttg cgggaaagtc aaaccatcac 420
tgccatgtat ctgcatatga aaaatctttt cctattaaac ctgttccaag tccatcttgg 480
agtgttcat gtctcgaag tcttttgagc cccaagaaaa ctcagaggcg acatgttagt 540
acagcagaag agacagttca agaagaagaa agagagattt acagacagct gctacagatg 600
gtcacagggg aacagtttac tatagccaaa cccaccacac attttctttt acacctgtct 660
cgatgtctta gttccagtaa aaatactttg aaagactcac tgtttaaaaa tggaaactct 720
tgtgcatctc agatcattgg ctctgatact tcatcatctg gatctgccag cattttaact 780
aaccaggaac agctgtccca cagtgtatat tccctatctt cttatacccc agatgttgca 840
tttggatcca aagattctgg tactcttcat catccaccac atcaccactc tgttccacat 900
cagccagata acttagcagc ttcaaataca caatctgaag gatcagactc tgtgatttta 960
ctgaaagtga aagattccca gactccaact cccagttcta ctttcttcca ggcagagctg 1020
tggatcaaaag aattaactag tgtttatgat tctcgagcac gagaaagatt ggcagagatt 1080
gaagaacaga aggcattggc cttacagctt caaaaccaga gattgcagga gcgggaacat 1140
tcagtacatg attcagtaga actacatctt cgtgtacctc ttgaaaagga gattcctgtt 1200
actgttgtcc aagaaacaca aaaaaagggt cataaattaa ctgatagtga agatgaattt 1260
cctgaaatta cagaggaaat ggagaaagaa ataaagaatg tatttcgtaa tgggaatcag 1320
gatgaagttc tcagtgaagc atttgcctg accattacac gcaaagatat tcaaactcta 1380
aaccatctga attggctcaa tgatgagatc atcaatttct acatgaatat gctgatggag 1440
cgaagtaaag agaaggctt gccaaagtgt catgcattta ataccttttt cttcactaaa 1500
ttaaaaacgg ctggttatca ggcagtgaaa cgttggacaa agaaagtaga tgtattttct 1560
gttgacattc tttggtgcc cattcacctg ggagtacact ggtgtctagc tgttgtggac 1620
tttagaaaga agaatactac ctattacgac tccatgggtg ggataaacia tgaagcctgc 1680

agaatactct tgcaatacct aaagcaagaa agcattgaca agaaaaggaa agagtttgac 1740
accaatggct ggcagctttt cagcaagaaa agccagattc ctcagcagat gaatggaagt 1800
gactgtggga tgtttgcctg caaatatgct gactgtatta ccaaagacag accaatcaac 1860
ttcacacagc aacacatgcc atacttccgg aagcggatgg tctgggagat cctccaccga 1920
aaactcttgt ga 1932

```

5 <210> 2
 <211> 643
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Proteasa 1 específica de sentrina/SUMO (SEN1)

<400> 2

ES 2 464 719 T3

Met Asp Asp Ile Ala Asp Arg Met Arg Met Asp Ala Gly Glu Val Thr
 1 5 10 15

Leu Val Asn His Asn Ser Val Phe Lys Thr His Leu Leu Pro Gln Thr
 20 25 30

Gly Phe Pro Glu Asp Gln Leu Ser Leu Ser Asp Gln Gln Ile Leu Ser
 35 40 45

Ser Arg Gln Gly His Leu Asp Arg Ser Phe Thr Cys Ser Thr Arg Ser
 50 55 60

Ala Ala Tyr Asn Pro Ser Tyr Tyr Ser Asp Asn Pro Ser Ser Asp Ser
 65 70 75 80

Phe Leu Gly Ser Gly Asp Leu Arg Thr Phe Gly Gln Ser Ala Asn Gly
 85 90 95

Gln Trp Arg Asn Ser Thr Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Gln Lys Ser
 100 105 110

Arg Asn Ser Arg Ser Leu Tyr Leu Glu Thr Arg Lys Thr Ser Ser Gly
 115 120 125

Leu Ser Asn Ser Phe Ala Gly Lys Ser Asn His His Cys His Val Ser
 130 135 140

Ala Tyr Glu Lys Ser Phe Pro Ile Lys Pro Val Pro Ser Pro Ser Trp
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ser Leu Leu Ser Pro Lys Lys Thr Gln Arg
 165 170 175

Arg His Val Ser Thr Ala Glu Glu Thr Val Gln Glu Glu Glu Arg Glu
 180 185 190

Ile Tyr Arg Gln Leu Leu Gln Met Val Thr Gly Lys Gln Phe Thr Ile
 195 200 205

Ala Lys Pro Thr Thr His Phe Pro Leu His Leu Ser Arg Cys Leu Ser

ES 2 464 719 T3

210						215										220
Ser	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Ser	
225					230					235					240	
Cys	Ala	Ser	Gln	Ile	Ile	Gly	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	
				245					250					255		
Ser	Ile	Leu	Thr	Asn	Gln	Glu	Gln	Leu	Ser	His	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	
			260					265					270			
Ser	Ser	Tyr	Thr	Pro	Asp	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Gly	Thr	
		275					280					285				
Leu	His	His	Pro	His	His	His	His	Ser	Val	Pro	His	Gln	Pro	Asp	Asn	
	290						295				300					
Leu	Ala	Ala	Ser	Asn	Thr	Gln	Ser	Glu	Gly	Ser	Asp	Ser	Val	Ile	Leu	
305					310					315					320	
Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Ser	Gln	Thr	Pro	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Phe	Phe	
				325					330					335		
Gln	Ala	Glu	Leu	Trp	Ile	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Asp	Ser	Arg	
			340					345					350			
Ala	Arg	Glu	Arg	Leu	Arg	Gln	Ile	Glu	Glu	Gln	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	
		355					360					365				
Gln	Leu	Gln	Asn	Gln	Arg	Leu	Gln	Glu	Arg	Glu	His	Ser	Val	His	Asp	
	370					375					380					
Ser	Val	Glu	Leu	His	Leu	Arg	Val	Pro	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Pro	Val	
385					390					395					400	
Thr	Val	Val	Gln	Glu	Thr	Gln	Lys	Lys	Gly	His	Lys	Leu	Thr	Asp	Ser	
				405					410					415		
Glu	Asp	Glu	Phe	Pro	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	Met	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	
			420					425					430			
Asn	Val	Phe	Arg	Asn	Gly	Asn	Gln	Asp	Glu	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Phe	
		435					440					445				
Arg	Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Lys	Asp	Ile	Gln	Thr	Leu	Asn	His	Leu	Asn	
	450					455					460					
Trp	Leu	Asn	Asp	Glu	Ile	Ile	Asn	Phe	Tyr	Met	Asn	Met	Leu	Met	Glu	
465					470					475					480	
Arg	Ser	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Val	His	Ala	Phe	Asn	Thr	Phe	
				485					490					495		
Phe	Phe	Thr	Lys	Leu	Lys	Thr	Ala	Gly	Tyr	Gln	Ala	Val	Lys	Arg	Trp	
			500					505					510			
Thr	Lys	Lys	Val	Asp	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Ile	Leu	Leu	Val	Pro	Ile	

ES 2 464 719 T3

515 520 525

His Leu Gly Val His Trp Cys Leu Ala Val Val Asp Phe Arg Lys Lys
 530 535 540

Asn Ile Thr Tyr Tyr Asp Ser Met Gly Gly Ile Asn Asn Glu Ala Cys
 545 550 555 560

Arg Ile Leu Leu Gln Tyr Leu Lys Gln Glu Ser Ile Asp Lys Lys Arg
 565 570 575

Lys Glu Phe Asp Thr Asn Gly Trp Gln Leu Phe Ser Lys Lys Ser Gln
 580 585 590

Ile Pro Gln Gln Met Asn Gly Ser Asp Cys Gly Met Phe Ala Cys Lys
 595 600 605

Tyr Ala Asp Cys Ile Thr Lys Asp Arg Pro Ile Asn Phe Thr Gln Gln
 610 615 620

His Met Pro Tyr Phe Arg Lys Arg Met Val Trp Glu Ile Leu His Arg
 625 630 635 640

Lys Leu Leu

<210> 3
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Telomerasa transcriptasa inversa humana (TERT)

<400> 3

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
 85 90 95

Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
 100 105 110

Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr

ES 2 464 719 T3

	115		120		125														
Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Arg	Arg	Val				
	130					135					140								
Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Val	His	Leu	Leu	Ala	Arg	Cys	Ala	Leu	Phe	Val				
145					150					155					160				
Leu	Val	Ala	Pro	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Val	Cys	Gly	Pro	Pro	Leu	Tyr				
				165					170					175					
Gln	Leu	Gly	Ala	Ala	Thr	Gln	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	His	Ala	Ser	Gly				
			180					185					190						
Pro	Arg	Arg	Arg	Leu	Gly	Cys	Glu	Arg	Ala	Trp	Asn	His	Ser	Val	Arg				
		195					200					205							
Glu	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Arg	Arg				
	210					215					220								
Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Arg	Ser	Leu	Pro	Leu	Pro	Lys	Arg	Pro	Arg	Arg				
225					230					235					240				
Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	Arg	Thr	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Ser	Trp				
				245					250					255					
Ala	His	Pro	Gly	Arg	Thr	Arg	Gly	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly	Phe	Cys	Val				
			260					265					270						
Val	Ser	Pro	Ala	Arg	Pro	Ala	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Gly	Ala				
		275					280					285							
Leu	Ser	Gly	Thr	Arg	His	Ser	His	Pro	Ser	Val	Gly	Arg	Gln	His	His				
	290					295					300								
Ala	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Ser	Arg	Pro	Pro	Arg	Pro	Trp	Asp	Thr	Pro				
305					310					315					320				
Cys	Pro	Pro	Val	Tyr	Ala	Glu	Thr	Lys	His	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Gly				
				325					330					335					
Asp	Lys	Glu	Gln	Leu	Arg	Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro				
			340					345					350						
Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser				
		355					360					365							
Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Gln				
	370					375					380								
Arg	Tyr	Trp	Gln	Met	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Gly	Asn	His				
385					390					395					400				
Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Thr	His	Cys	Pro	Leu	Arg				
				405					410					415					
Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln				

ES 2 464 719 T3

				725						730					735
Asn	Thr	Tyr	Cys	Val	Arg	Arg	Tyr	Ala	Val	Val	Gln	Lys	Ala	Ala	His
			740					745					750		
Gly	His	Val	Arg	Lys	Ala	Phe	Lys	Ser	His	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Asp
		755					760					765			
Leu	Gln	Pro	Tyr	Met	Arg	Gln	Phe	Val	Ala	His	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser
	770					775					780				
Pro	Leu	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gln	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu
785					790					795					800
Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Arg	Phe	Met	Cys	His	His
				805					810					815	
Ala	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Lys	Ser	Tyr	Val	Gln	Cys	Gln	Gly	Ile	Pro
			820					825					830		
Gln	Gly	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Leu	Cys	Ser	Leu	Cys	Tyr	Gly	Asp
		835					840					845			
Met	Glu	Asn	Lys	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Arg	Arg	Asp	Gly	Leu	Leu	Leu
	850					855					860				
Arg	Leu	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Thr	Pro	His	Leu	Thr	His	Ala
865					870					875					880
Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Val	Arg	Gly	Val	Pro	Glu	Tyr	Gly	Cys
				885					890					895	
Val	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Val	Asn	Phe	Pro	Val	Glu	Asp	Glu
			900					905					910		
Ala	Leu	Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe
		915					920					925			
Pro	Trp	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Asp	Thr	Arg	Thr	Leu	Glu	Val	Gln	Ser
	930					935					940				
Asp	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Ala	Arg	Thr	Ser	Ile	Arg	Ala	Ser	Leu	Thr	Phe
945					950					955					960
Asn	Arg	Gly	Phe	Lys	Ala	Gly	Arg	Asn	Met	Arg	Arg	Lys	Leu	Phe	Gly
				965					970					975	
Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Cys	His	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Val	Asn
			980					985					990		
Ser	Leu	Gln	Thr	Val	Cys	Thr	Asn	Ile	Tyr	Lys	Ile	Leu	Leu	Leu	Gln
		995					1000					1005			
Ala	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Cys	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Phe	His	Gln	Gln
	1010					1015					1020				
Val	Trp	Lys	Asn	Pro	Thr	Phe	Phe	Leu	Arg	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala

ES 2 464 719 T3

1025		1030		1035		1040									
Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser	Leu
				1045					1050					1055	
Gly	Ala	Lys	Gly	Ala	Ala	Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Ala	Val	Gln	Trp
			1060					1065					1070		
Leu	Cys	His	Gln	Ala	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Thr	Arg	His	Arg	Val	Thr
		1075					1080					1085			
Tyr	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Leu	Ser
	1090					1095					1100				
Arg	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Ala	Asn
1105					1110					1115					1120
Pro	Ala	Leu	Pro	Ser	Asp	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp				
			1125						1130						

<210> 4
 <211> 4015
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Telomerasa transcriptasa inversa humana (TERT)

10

<400> 4

```

gcagcgtgc gtccctgctgc gcacgtggga agccctggcc ccggccacc ccgcgatgcc 60
gcgcgctccc cgtgcccag cctgctgcgc agccactacc gcgaggtgct 120
gcccgtggcc acgttcgtgc ggcgcctggg gcccagggc tggcggctgg tgcagcgcgg 180
ggaccgcgcg gctttccgcg cgttgggtgc ccagtgcctg gtgtgctgct cctgggacgc 240
acggccgccc ccgcgcgccc cctccttcgg ccaggtgtcc tgcctgaagg agctgggtgc 300
ccgagtgtct cagaggtgtt ggcgagcggg cgcaagaac gtgctggcct tcgcttcgc 360
gctgctggac ggggcccgcg ggggcccccc cgaggccttc accaccagcg tgcgcagcta 420
cctgcccAAC acggtgaccg acgcactgcg ggggagcggg gcgtgggggc tgcctgctgc 480
ccgctggggc gacgacgtgc tggttcacct gctggcacgc tgcgcgctct ttgtgctggt 540
ggctcccagc tgcgcctacc aggtgtgcgg gccgcgctg taccagctcg gcctgcccac 600
tcaggcccgg ccccgcacc acgctagtgg acccgaagg cgtctgggat gcgaacgggc 660
ctggaacatc agcgtcaggg aggcgggggt ccccctgggc ctgccagccc cgggtgcccag 720
gaggcgcggg ggcagtgccg gccgaagtct gccgttgccc aagaggccca ggcgtgggcg 780
tgcccctgag ccggagcggg cgcctgttgg gcaggggtcc tgggcccacc cgggcaggac 840
gcgtggaccg agtgaccgtg gtttctgtgt ggtgtcacct gccagaccgg ccgaagaagc 900
cacctctttg gaggtgccc tctctggcac gcgccactcc caccatccg tgggcccaca 960
gcaccacgcg ggcccccat ccacatcggg gccaccacgt cccctgggaca cgccttgtcc 1020
cccgtgttac gccgagacca agcacttct ctactcctca ggcgacaagg agcagctgcg 1080
gcccctcttc ctactcagct ctctgaggcc cagcctgact ggcgctcggg ggctcgtgga 1140
gaccatcttt ctgggttcca ggcctgggat gccagggact cccgcaggt tgcctccgct 1200
gcccagcgc tactggcaa tgccggccct gtttctggag ctgcttggga accaccgcga 1260
gtgcccctac ggggtgctcc tcaagacgca ctgcccgtg cgagctgccc tcaccccagc 1320
agccggtgtc tgtgcccggg agaagccca ggcctctgtg ggggcccccg aggaggagga 1380
cacagacccc cgtgcctggg tgcagctgct ccgccagcac agcagcccct ggcaggtgta 1440
cggtctcgtg cgggctgccc tgcgcgggct ggtgccccca ggcctctggg gctccaggca 1500
caacgaacgc cgttctccta ggaacaccaa gaagtctcct tcctgggga agcatgccc 1560
gctctcgtct caggagctga cgtggaagat gagcgtgccc gactgcccct ggctgcccag 1620
    
```

ES 2 464 719 T3

gagcccagg gttggctgtg ttccggccgc agagcaccgt ctgctgagg agatcctggc 1680
 caagttcctg cactggctga tgagtgtgta cgtcgtcgag ctgctcaggt ctttctttta 1740
 tgtcacggag accacgtttc aaaagaacag gctctttttc taccggaaga gtgtctggag 1800
 caagttgcaa agcattggaa tcagacagca cttgaagagg gtgcagctgc gggagctgtc 1860
 ggaagcagag gtcaggcagc atcgggaagc caggcccgcc ctgctgacgt ccagactccg 1920
 cttcatcccc aagcctgacg ggctgcgccc gattgtgaac atggactacg tcgtgggagc 1980
 cagaacgttc cgcagagaaa agagggccga gcgctctacc tcgaggggtga aggcactggt 2040
 cagcgtgctc aactacgagc gggcgccggc ccccgccctc ctggggcctt ctgtgctggg 2100
 cctggacgat atccacaggg cctggcgcac cttcgtgctg cgtgtgcggg cccaggacc 2160
 gccgcctgag ctgtactttg tcaaggtgga tgtgacgggc gcgtaogaca ccatcccca 2220
 ggacaggctc acggaggtca togccagcat catcaaacc cagaacacgt actgctgctg 2280
 tcggtatgcc gtggtccaga aggcgcgcca tgggcacgtc cgcaaggcct tcaagagcca 2340
 cgtctctacc ttgacagacc tccagccgta catgcgacag ttctgtggctc acctgcagga 2400
 gaccagcccg ctgagggatg ccgtcgtcat cgagcagagc tctcctctga atgaggccag 2460
 cagtggcctc ttcgacgtct tctacgctt catgtgccac cacgccgtgc gcatcagggg 2520
 caagtcctac gtccagtgc aggggatccc gcagggctcc atcctctcca cgtgctctg 2580
 cagcctgtgc tacggcgaca tggagaacaa gctgtttgcg gggattcggc gggacgggct 2640
 gctcctgcgt ttggtggatg atttcttgtt ggtgacacct cacctcacc acgcgaaaac 2700
 ctctctcagg acctggctc gaggtgtccc tgagtatggc tgctgtgga acttgcgaa 2760
 gacagtgggt aacttccctg tagaagacga gccctgggt ggacggctt ttgttcagat 2820
 gccggcccac gccctattcc cctgggtgcg cctgctgctg gataccgga ccttgagggt 2880
 gcagagcgac tactccagct atgccggac ctccatcaga gccagtctca ccttcaaccg 2940
 cggcttcaag gctgggagga acatgcgtcg caaactctt ggggtcttgc ggctgaagtg 3000
 tcacagcctg tttctggatt tgcaggtgaa cagcctccag acggtgtgca ccaacatcta 3060
 caagatcctc ctgctgcagg cgtacaggtt tcacgcattg gtgctgcagc tcccatttca 3120
 tcagcaagtt tggaagaacc ccacatttt cctgcgcgtc atctctgaca cggcctcct 3180
 ctgctactcc atcctgaaag ccaagaacgc agggatgtcg ctgggggcca agggcgccgc 3240
 cggccctctg ccctccgagg ccgtgcagtg gctgtgccac caagcattcc tgctcaagct 3300
 gactcgacac cgtgtcacct acgtgccact cctgggggtca ctcaggacag ccagagcgca 3360
 gctgagtcgg aagctcccgg ggacgacgct gactgccctg gaggccgag ccaaccggc 3420
 actgcctca gacttcaaga ccatcctgga ctgatggcca cccgccaca gccaggccga 3480
 gagcagacac cagcagcct gtcacgcgg gctctacgtc ccagggaggg agggcgccg 3540
 cacaccagc cccgcaccgc tgggagctct aggcctgagt gaggctgag cgagtgtcca gccagggct 3600
 catgtccggc tgaaggctga gtgtccgct gaggcctgag cagagtgtcca gccagggct 3660
 gagtgtccag cacacctgc gtcttcaact cccacagggc tggcgtcgg cccaccacca 3720
 gggccagctt ttctcaaca ggagcccgcc ttccactccc cacataggaa tagtccatcc 3780
 ccagattcgc cattgttcac cctcgcctt gccctcctt gccttccacc cccaccatcc 3840
 aggtggagac cctgagaagg accctgggag ctctgggaat ttggagtgc caaaggtgtg 3900

 ccctgtacac agggcaggac cctgcacctg gatgggggtc cctgtgggtc aaattggggg 3960
 gaggtgctgt gggagtaaaa tactgaatat atgagttttt cagttttgaa aaaaa 4015

<210> 5
 <211> 451
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Componente de ARN telomerasa humana (TERC)

10

<400> 5

gggttgcgga ggggtggcct gggaggggtg gtggccattt tttgtetaac cctaactgag 60
 aagggcgtag gcgcgtgct tttgtctccc gcgcgctggt tttctcgtg actttcagcg 120
 ggcggaag cctcggcctg ccgccttcca ccgttcattc tagagcaaac aaaaaatgtc 180
 agctgctggc ccgttcgccc ctcccgggga cctgcggcgg gtcgcctgcc cagccccoga 240
 accccgcctg gaggccggc tggcccggg gcttctcgg aggcaccac tgccaccggc 300

ES 2 464 719 T3

```
aagagttggg ctctgtcagc cgcgggtctc tcgggggcga gggcgagggt caggcctttc 360
aggccgcagg aagaggaacg gagcgagtcc ccgcgcgcgg cgcgattccc tgagctgtgg 420
gacgtgcacc caggactcgg ctcacacatg c 451
```

5 <210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador con "sentido" directo de SENP1

<400> 6
caagaagtgc agctataat ccaa 24

15 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador "antisentido" inverso de SENP1

<400> 7
gtctttcggg tttcgaggta a 21

25 <210> 8
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda TaqMan de SENP1

<400> 8
ctcagacagt tttcttggt caggcg 26

35 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador directo de PPP1CA

<400> 9
gagcacacca ggtgtagaa 20

45 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador inverso de PPP1CA

55 <400> 10
ggccttgagg atctgaaa 19

60 <210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 464 719 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda de PPP1CA

<400> 11
gagtttgaca atgctggcgc catgatgagt 30

5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: sustrato/inhibidor específico para proteasa SENP1, antagonista de SENP1

15

<400> 12

Glu Gln Thr Gly Gly
1 5

20

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia señal de localización nuclear (NLS1)

<400> 13

Pro Lys Lys Thr Gln Arg Arg
1 5

30

<210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia C-terminal Sm31 de la proteína modificadora similar a ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO)

40

<400> 14

Thr Ile Asp Val Phe Gln Gln Gln Thr Gly Gly Val Pro Glu Ser Ser
1 5 10 15

Leu Ala Gly His Ser Phe
20

45

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia C-terminal Sm32 de la proteína modificadora similar a ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO)

<400> 15

Thr Ile Asp Val Phe Gln Gln Gln Thr Gly Gly Val Tyr
1 5 10

55

<210> 16

ES 2 464 719 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia C-terminal Sm33 de la proteína modificadora similar a ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO)

10

<400> 16
 Val Ile Glu Val Tyr Gln Glu Gln Thr Gly Gly His Ser Thr Val
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: secuencia C-terminal Smt3 de la proteína modificadora similar a ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO)

20

<400> 17
 Ile Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Ala Thr Tyr
 1 5 10

25

<210> 18
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador directo de TERT

35

<400> 18
 tgggcacgtc cgca 14

<210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador inverso de TERT

45

<400> 19
 ggcggtgtgg cacatgaa 18

<210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: sonda TaqMan de TERT

55

<400> 20
 tcatcgagca gagctctccc ctgaatgagg 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección de la expresión de SENP1 en una muestra biológica, comprendiendo el método, determinar la cantidad de SENP1 y de TERT o TERC en una muestra biológica obtenida de un individuo que tiene o que se sospecha que tiene cáncer de colon.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente registrar un diagnóstico de cáncer de colon.
- 10 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la cantidad de SENP1 se determina detectando un polinucleótido que codifica SENP1 en la muestra.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa de detección comprende amplificar el polinucleótido en una reacción de amplificación.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la reacción de amplificación comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes que comprenden una secuencia al menos 90 % idéntica a al menos 10 nucleótidos contiguos de la SEC ID N°: 1, o un complemento de la misma, de tal manera que durante la reacción de amplificación los oligonucleótidos ceban la amplificación de al menos un fragmento de la SEC ID N°: 1.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto de amplificación de la reacción de amplificación se detecta en una etapa que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de manera detectable con el producto.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción de amplificación comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa fragmente el oligonucleótido marcado de manera detectable.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el método comprende adicionalmente comparar la cantidad de SENP1 y de TERT o TERC en una muestra con un patrón de SENP1 y un patrón de TERT o TERC respectivamente, en el que el patrón de SENP1 representa SENP1 en células no cancerosas y el patrón de TERT o TERC representa cantidades de TERT o TERC en células no cancerosas.
9. Un método para detectar la expresión de SENP1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una biopsia de colon y una muestra de heces.

Figura 1

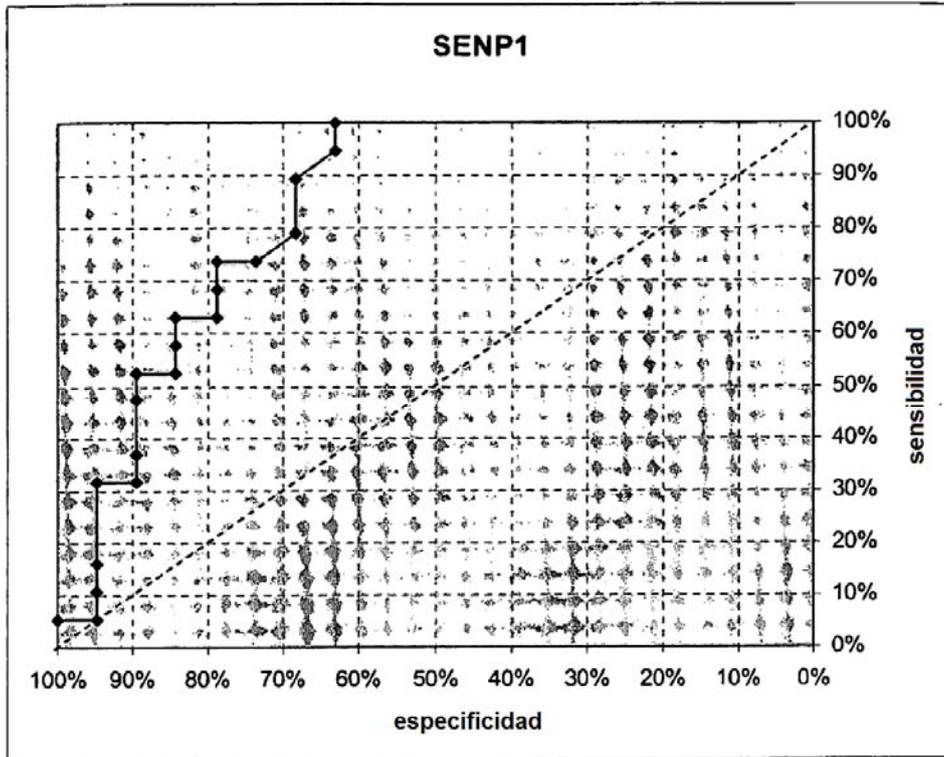


Figura 2A

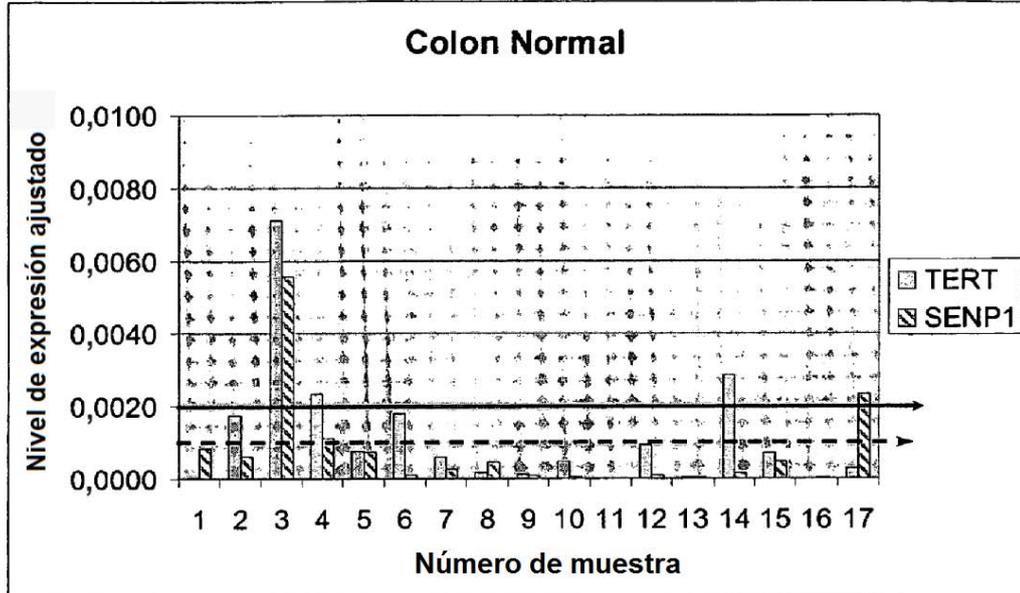


Figura 2B

