

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 093**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/NL2012/050645**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13039394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12783347 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2756099**

54 Título: **Método de detección del cáncer de cuello uterino inducido por el HPV**

30 Prioridad:

**15.09.2011 EP 11181492**

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

**07.11.2017**

73 Titular/es:

**SELF-SCREEN B.V. (100.0%)  
Biothof 15 1  
1098 RX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**SNIJDERS, PETRUS JOSEPHUS FERDINANDUS;  
STEENBERGEN, RENSKÉ DANIÉLA MARIA;  
HEIDEMAN, DANIËLLE ANNE MARIE y  
MEIJER, CHRISTOPHORUS JOANNES  
LAMBERTUS MARIA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 641 093 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

Método de detección del cáncer de cuello uterino inducido por el HPV

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la prevención del cáncer y el diagnóstico médico; y se refiere a un ensayo de diagnóstico molecular para los cánceres invasivos inducidos por el virus del papiloma humano (HPV) y las lesiones precursoras de alto grado de los mismos, tales como el cáncer de cuello uterino invasivo y las lesiones cervicales premalignas. En particular, la presente invención se refiere al uso de un análisis combinado de la metilación del promotor de MAL y hsa-miR124 en muestras automuestreadas (hrHPV positivos) en un ensayo para lesiones premalignas inducidas por hrHPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por hrHPV.

10 Antecedentes de la invención

El cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer más común en las mujeres en todo el mundo y es responsable de aproximadamente 250.000 muertes por cáncer al año.

15 El desarrollo de carcinoma de células escamosas cervicales se caracteriza por una secuencia de lesiones premalignas, llamadas neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que se clasifican de 1 a 3, denominadas como displasia leve (CIN 1), displasia moderada (CIN 2) y displasia grave/carcinoma in situ (CIN 3), respectivamente. La CIN 1 también se denomina como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y CIN 2 y CIN 3 juntos como lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). Para el adenocarcinoma cervical, el adenocarcinoma in situ (ACIS) es una lesión precursora establecida. En principio, estas lesiones premalignas son reversibles, aunque cuanto más grave sea la lesión, menor será la probabilidad de regresión espontánea. El cáncer de cuello uterino se considera una enfermedad que se puede prevenir porque las etapas premalignas pueden ser detectadas por citología exfoliativa y tratadas con relativa facilidad cuando sea necesario, con sólo efectos secundarios menores. El cribado cervical tiene como objetivo diagnosticar tempranamente las lesiones cancerosas premalignas de alto grado (esto es, CIN 2/3 y adenocarcinoma in situ) y tratables, reduciendo así la mortalidad del cáncer de cuello uterino invasivo. La práctica médica general comprende el tratamiento de todas las mujeres con morfología confirmada CIN 2, CIN 3 confirmada morfológicamente y adenocarcinoma in situ, con el fin de prevenir el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

20 En la última década se ha establecido que la carcinogénesis cervical es iniciada por una infección con virus del papiloma humano de alto riesgo (hrHPV). La expresión de los oncogenes víricos E6 y E7, que alteran las vías supresoras de tumores p53 y Rb, respectivamente, ha demostrado ser esencial tanto para el inicio de la oncogénesis como para el mantenimiento de un fenotipo maligno. Por lo tanto, la prueba de hrHPV apareció como una herramienta de detección primaria, atractiva. Sin embargo, en consonancia con un proceso de múltiples etapas de carcinogénesis, se requieren alteraciones adicionales en el genoma de la célula huésped para la progresión de una célula infectada por hr-HPV a una célula cancerosa invasiva. Sólo una pequeña proporción de mujeres infectadas con HPV de alto riesgo desarrollará lesiones cervicales premalignas de alto grado (CIN 2/3) y, si no se tratan, cáncer de cuello uterino. En la mayoría de las mujeres con lesiones cervicales premalignas las lesiones remiten espontáneamente. De las mujeres que participan en el cribado basado en la población en los Países Bajos alrededor de 5-6% tienen una prueba positiva de hrHPV (Bulkman et al., Int J Cancer 2004, 110:94-101). Sin embargo, sólo en un máximo del 20% de ellos (1% de las mujeres participantes) tienen  $\geq$ CIN 2/3. Por lo tanto, el cribado primario mediante la prueba del hrHPV se acompañará con un número sustancial de procedimientos de seguimiento redundantes y ansiedad innecesaria entre las mujeres, a menos que se puedan aplicar marcadores en los frotis cervicales que permitan la estratificación de las mujeres positivas para hrHPV con riesgo  $\geq$ CIN 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma in situ.

30 Se han establecido grandes programas de cribado basados en la población en varios países basados en frotis tomados por los médicos. Sin embargo, no todas las mujeres convocadas se presentarán por tener que tomar un frotis cervical. Una serie de no-muestra es causada por la renuencia de las mujeres a tener que tomar un frotis cervical por una enfermera o un médico. Los estudios han demostrado que esto se puede superar ofreciendo a estas mujeres un dispositivo para la autorecolección del material (cervico-)vaginal en casa, que puede ser enviado al laboratorio para el análisis del HPV. Como tal, el automuestreo aumenta la participación de los no respondedores en los programas de cribado actuales (Gök et al. 2010 Brit. Medical J.; 340:c1040). El automuestreo es un método barato y bien aceptado para el cribado cervical. Aún más, debido a que el análisis del HPV puede ser tan bueno en muestras auto-recolectadas como muestras recolectadas por el médico para la detección de CIN2+/3+, el automuestreo se podría convertir en un método alternativo para el cribado primario del cáncer de cuello uterino en el futuro. De este modo, en los próximos años, el automuestreo del material (cervico-)vaginal se convertirá en una herramienta importante en el cribado del cáncer de cuello uterino.

45 Un reto importante es reducir el porcentaje de mujeres positivas para hrHPV a aquellas que tienen lesiones clínicamente significativas. Mientras que la citología puede servir como una prueba secundaria (llamada de triaje) para las mujeres positivas para hrHPV en raspados convencionales, la citología no es una opción para las muestras cervicovaginales automuestreadas que se pueden tomar en casa, ya que no son representativos del estado citológico del cuello del útero (Brink et al., 2006, J. Clin. Microbiol. 44:2518-2523). Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas de triaje

suplementarias o alternativas para estratificar a las mujeres positivas para hrHPV en aquellas con y sin  $\geq$ CIN 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma in situ.

5 Se ha demostrado anteriormente (WO 2009/128714) que las pruebas combinadas para la metilación del promotor del gen que codifica la proteína asociada a la maduración de linfocitos T, también conocida como proteína de diferenciación de células T (también denominada como MAL, Genbank Accession NM\_002371.2) y el gen que codifica la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) apareció una herramienta de triaje molecular alternativa atractiva cuando se aplicó a los raspados cervicales recolectados por el médico que se desempeñaron igual de bien como la citología (Hesselink et al. 2011 Clin Cancer Res. 17(8):2459-65). Sin embargo, este panel se desempeñó menos bien en las muestras cervicovaginales automuestreadas, principalmente porque las señales para la metilación de CADM1 en las automuestras de mujeres con  $\geq$ CIN 2/3 estaban más frecuentemente por debajo del umbral de ensayo que en el caso de muestras cervicales recolectadas por el médico. Aunque una combinación de MAL o CADM1 con la detección de silenciamiento basado en metilación de hsa-miR-124 fue sugerida por Wilting et al., (Mol. Cancer 9(1): 167, 2010) ninguna predicción de una posible mejora en las pruebas de hrHPV se ha hecho.

15 Eijnsink, J.J.H. et al. (Gynecologic Oncol. 120(2):280-283, 2011) describe que el análisis de metilación en lavados cervicovaginales automuestreados proporciona un rendimiento diagnóstico comparable a la detección mediante citomorfología y hrHPV. Sin embargo, este documento no se refiere a un cribado basado en la población sino sólo a una población de riesgo de derivación de mujeres en un centro de atención ambulatoria, en ausencia de controles negativos. Esto pone en duda la viabilidad de un cribado poblacional basado en muestras autoobtenidas.

20 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un ensayo que se pueda realizar en automuestras y que pueda dar una indicación más fiable de la presencia o del riesgo de desarrollar lesiones cervicales.

#### Resumen de la invención

25 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las pruebas combinadas para la metilación del promotor del gen que codifica la proteína asociada a la maduración de los linfocitos T, también conocida como proteína de diferenciación de células T (también denominada como MAL, Genbank Accession NM\_002371.2) y el microRNA hsa-miR124 (número de acceso MIMAT0000422), codificado por 3 secuencias de microARN prematuras individuales situadas en tres regiones genómicas diferentes, esto es, HSA-MIR124-1 (número de acceso MI0000443) en el cromosoma 8p23.1, HSA-MIR124-2 (número de acceso MI0000444) en el cromosoma 8q12.3 y HSA-MIR124-3 (número de acceso MI0000445) en el cromosoma 20q12.33 (números de acceso como se indica en la base de datos de miRNA, miRBase (www.mirbase.org), Faculty of Life Sciences, University of Manchester), ambos de los cuales tienen propiedades supresoras de tumores en células de cáncer de cuello uterino, proporciona un valioso ensayo para diagnosticar el cáncer de cuello uterino invasivo y las lesiones precursoras de alto grado del mismo cuando se aplican a muestras de lavado automuestreadas que resultan positivas para hrHPV. De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a un método de detección de la aparición de lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y/o cánceres invasivos inducidos por HPV que comprenden ensayar una muestra de lavado cervicovaginal para determinar la presencia de una alteración en la metilación de la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) y hsa-miR124, en el que dicha alteración indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y/o cánceres invasivos inducidos por HPV. Preferiblemente, en dicho método, dicho cáncer invasivo inducido por HPV es un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo.

40 En otra realización de dicho método, dicha alteración es un aumento de metilación en comparación con una muestra de control, normal. Preferiblemente, en el método de la invención, la metilación se ensaya sobre el ácido nucleico que codifica el polipéptido MAL y sus regiones reguladoras y la secuencia hsa-miR124, en la que dicho ácido nucleico preferiblemente es ADN. En una realización preferida adicional, el ensayo se realiza con una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación y también se prefiere que el reactivo sea una sonda o cebador de ácido nucleico que se une al ácido nucleico, preferiblemente en el que dicha sonda o cebador de ácido nucleico tiene una etiqueta detectable. Se prefiere especialmente una sonda de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias representadas en la tabla 1.

50 También forma parte de la invención el uso de un marcador de diagnóstico molecular establecido para la detección de una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o un carcinoma invasivo inducido por HPV en una muestra de lavado cervicovaginal, en el que dicho conjunto de marcadores indica una alteración en el gen de MAL o metilación del promotor y una alteración en la metilación de la secuencia hsa-miR124.

Además, se incluye en la invención el uso de un kit de partes en un método de detección de una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o un carcinoma invasivo inducido por HPV en células de prueba a partir de un lavado cervicovaginal de un sujeto, comprendiendo dicho kit una metilación de endonucleasa de restricción sensible y

55 - medios para la detección de metilación del gen o promotor de MAL, en el que dichos medios comprenden sondas, cebadores específicos para MAL o específicos para la secuencia de nucleótidos de MAL de la figura 1; y

- medios para la detección de metilación de hsa-miR124, en el que dichos medios comprenden sondas, cebadores específicos para hsa-miR124.,

- opcionalmente, medios para la detección de infección por HPV, en el que dichos medios comprenden sondas y cebadores específicos para HPV, y

5 - opcionalmente medios para tomar un lavado cervicovaginal. Como se especifica en este documento, dichos medios se seleccionan preferiblemente del grupo de un VibaBrush (Rovers Medical Devices, Oss, Países Bajos) y un muestreador Pantarhei (Pantarhei Devices, Zeist, Países Bajos).

Breve descripción de los dibujos

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

10 La figura 2 muestra las regiones reguladoras 5' y las secuencias codificantes de las tres regiones genómicas de miR124, A: hsa-miR124-1, B: hsa-miR124-2, C: hsa-miR124-3

Las secuencias en cursiva/negrita son secuencias codificantes de microRNA prematuros. La secuencia subrayada comprende la secuencia de microARN madura. La zona rica en CpG está marcada en gris. Se muestra la secuencia de tipo salvaje (fila superior) así como la secuencia modificada después del tratamiento con bisulfito (fila inferior).

++ representa sitios CpG, :::: indica no-CpG 'C' convertido en 'T'.

15 La figura 3 muestra la comparación de los valores de la proporción Ct de los deciles del análisis de metilación de MAL (A) y CADM1 (B) en las automuestras de mujeres con CIN3+ (línea punteada con cuadrados rellenos) y mujeres con CIN2 máxima (línea punteada con cruz) y raspado cervical tomado por el médico de mujeres con CIN3+ (línea continua con cuadrados rellenos) y mujeres con CIN2 máxima (línea continua con cruz). Esta figura indica que, para MAL, las señales para mujeres con CIN3+ en muestras automuestreadas son iguales a las de frotis tomados por el médico, mientras que las de CADM1 para mujeres con CIN3+ son más bajas en comparación con aquellas en frotis tomados por el médico y caen una gran parte en el mismo intervalo que los niveles obtenidos en mujeres sin enfermedad cervical.

20 La figura 4 muestra la comparación de los valores de la proporción Ct de los deciles del análisis de metilación de CADM1 (líneas punteadas) y hsa-miR124-2 (líneas continuas) en automuestras de mujeres con CIN3+ (CADM1: cruz, hsa-miR124-2: diamante) y mujeres con ≤CIN1 (CADM1: triángulo, hsa-miR124-2: cuadrado), respectivamente. Esta figura indica que para hsa-miR124-2 las señales para las mujeres con CIN3+ en muestras automuestreadas son mucho más altas que las de CADM1. Por otra parte, la metilación hsa-miR124-2 muestra una mejor discriminación entre las muestras automuestreadas de las mujeres con CIN3+ y las mujeres con ≤CIN1 en comparación con CADM1.

Descripción detallada de la invención

30 El cáncer de cuello uterino está casi exclusivamente asociado con la infección por el virus del papiloma humano (HPV). El virus del papiloma humano constituye un grupo de más de 100 tipos de virus, según se identifican por variaciones en la secuencia de ADN. Los diversos HPV causan una variedad de enfermedades cutáneas y mucosas. Los HPV se clasifican ampliamente en tipos de riesgo bajo y de alto riesgo, basados en su capacidad para inducir cambios malignos en las células infectadas. Los tipos de HPV de bajo riesgo tales como 1, 2, 4, 6, 11, 13 y 32 se asocian principalmente con lesiones benignas o verrugas comunes, mientras que los de alto riesgo, tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, y 68 están asociados principalmente con lesiones epiteliales premalignas y malignas. Estos tipos de alto riesgo de HPV causan crecimientos que son habitualmente planos y casi invisibles, en comparación con las verrugas causadas por tipos de bajo riesgo, por ejemplo, HPV-6 y HPV-11.

40 El término "cáncer invasivo inducido por HPV" se refiere a un carcinoma inducido por HPV de alto riesgo, que invade el tejido circundante. Esto incluye todos los histotipos de carcinoma inducido por HPV, esto es, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamoso y carcinomas neuroendocrinos en el cuello uterino.

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

45 Los términos "lesión premaligna" y "lesión precursora" se refieren a una etapa en la evolución celular multietapas para cáncer con una probabilidad fuertemente aumentada de progresar a un carcinoma. Con la morfología clásica, el patólogo no puede predecir en el paciente individual cuál de estas lesiones progresará o remitirá. La presente solicitud de patente se refiere a un método, que puede predecir el cáncer invasivo o una lesión precursora de alto grado del mismo.

50 El término "lesión cervical premaligna de alto grado" se refiere a una etapa en la evolución celular multietapas para cáncer de cuello uterino con una probabilidad fuertemente aumentada de progresar a un carcinoma cervical. Las lesiones cervicales premalignas de alto grado son iguales a la denominación CIN 2/3 y superiores (esto es, ≥CIN2).

El término "capaz de hibridar específicamente a" se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de apareamiento de bases específico con una secuencia de ácido nucleico complementaria y de unión a la misma para formar un dúplex de ácido nucleico.

5 Un "complemento" o "secuencia complementaria" es una secuencia de nucleótidos que forma un dúplex unido a hidrógeno con otra secuencia de nucleótidos de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de base complementaria para 5'-AAGGCT-3' es 3'-TTCCGA-5'.

10 El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o de la sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. Los términos usados incluyen referencia a las condiciones bajo las cuales una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, hasta un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el transfondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 15 5°C menores que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (bajo intensidad iónica definida y pH) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida a una sonda o cebador perfectamente adaptado. Por lo general, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal sea inferior a aproximadamente de ion Na 1.0 M, por lo general de aproximadamente 0.01 a 20 1.0 M de concentración de iones Na (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas o cebadores largos (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). También se pueden conseguir condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Ejemplos de condiciones de bajo rigor o "condiciones de rigor reducidas" incluyen hibridación con una solución reguladora de formamida al 30%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 2x SSC a 40°C. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en SSC 0.1x a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describen, en, por ejemplo, Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

30 El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros nucleotídicos (usualmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces fosforosos (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y arilfosfato, fosforotioato) o enlaces no fosforosos (por ejemplo, péptido, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metil-citosina) y grupos de azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metil ribosilo, 2'-O-metoxietil ribosilo, 2'-fluoro ribosilo, 2'-amino ribosilo, y similares). Los oligonucleótidos pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas de ADN de cadena doble y sencilla y ARN de cadena doble y sencilla con formas circulares, ramificadas o lineales y opcionalmente incluyen dominios capaces de formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, estructuras de tallo y bucle y de bucle-tallo-bucle).

40 El término "cebador" como se usa en este documento se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar al objetivo de amplificación permitiendo que una ADN polimerasa se adhiera sirviendo así como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca bajo condiciones en las que se induce la síntesis del producto de la extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, esto es, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH apropiados. El cebador (de amplificación) es preferiblemente de cadena sencilla para una máxima eficacia en la amplificación. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxi ribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y la fuente del cebador. Un "par de cebadores bidireccionales" como se usa en este documento se refiere a un cebador directo y uno inverso como se usa comúnmente en la técnica de amplificación de ADN tal como en la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

45 El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de cadena sencilla que reconocerá y formará un dúplex unido por hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito de secuencia de ácido nucleico diana o su derivado de ADNc.

50 Los "MicroRNA" (miRNA o MIR) son moléculas cortas de ácido ribonucleico (ARN), de un promedio de sólo 22 nucleótidos de longitud y se encuentran en casi todas las células eucariotas. Los MIR regulan la actividad génica por apareamiento de bases imperfectas a la UTR 3' de sus ARNm diana, lo que conduce a la degradación o inhibición de la traducción del ARNm. Un solo MIR puede regular la expresión de hasta 200 dianas de genes diferentes, lo que significa que la expresión de aproximadamente un tercio de los ARNm humanos podría ser controlada por MIRs. Por lo tanto, la expresión alterada de MIRs puede contribuir a la transformación maligna aumentando o disminuyendo la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores, respectivamente (revisado por Calin and Croce, Nat Rev Cancer 2006, 6, 857-866). El hecho de que el perfil de expresión de una cantidad limitada de MIR proporcionó un clasificador muy preciso de subtipos de tumores, dando resultados aún mejores que un clasificador basado en caracterizar la expresión del ARNm de todo el genoma, subraya la importancia de miRNA en la carcinogénesis en general (Lu et al., Nature 2005;435:834-8). Curiosamente, los niveles de expresión miRNA en los tumores son globalmente más bajos en comparación con el tejido normal. Al igual que para la proteína que codifica genes supresores de tumores, también el

silenciamiento de miRNA puede resultar de alteraciones epigenéticas, tales como la metilación del ADN de las secuencias reguladoras.

La mayoría de los genes de microARN se encuentran en regiones intergénicas o en orientación anti-sentido a genes y contienen su propio promotor de genes de miRNA y unidades reguladoras.

5 El gen de MAL (proteína asociada a la maduración de linfocitos T) (Genbank Accession NM\_002371.2) se ha identificado originalmente como un gen expresado diferencialmente durante el desarrollo de células T (Alonso and Weisman 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1997-2001). MAL codifica una proteína de membrana integral de 17 kDa y es un componente de microdominios o balsas de membrana enriquecida con glicolípidos (Kim et al. 1995, J. Neurosci. Res., 42, 413-422). El MAL tiene un papel esencial como componente de la maquinaria proteica para el transporte apical  
10 de proteínas de membrana y secretoras en células epiteliales polarizadas (Cheong et al., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 6241-6248).

Se ha detectado una expresión de MAL reducida en un número diverso de cánceres humanos, incluyendo cáncer esofágico, gástrico y colorrectal (Mimori et al., 2003, Oncogene, 22, 3463-3471; Mimori 2007 et al., Ann. Surg. Oncol., 14, 1670-1677)

15 En el cáncer colorrectal, la inhibición de la expresión del MAL se ha asociado con la hipermetilación del promotor (Mori et al, 2006, Gastroenterology, 131,797-808; Lind et al., 2007 Gastroenterology, 132, 1631-1632)

Se demostró un papel funcional de MAL que actúa como un gen supresor de tumores mediante la reexpresión del gen de MAL en células de cáncer de esófago, dando como resultado una supresión de motilidad, invasión y tumorigenicidad, al tiempo que se mejora la apoptosis (Mimori et al., 2003, Oncogene, 22, 3463-3471)

20 Se estableció en el documento WO 2009/128714 que las alteraciones en la metilación del promotor de MAL se observan frecuentemente en carcinomas cervicales de carcinomas de carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinoma e histotipos de carcinoma neuroendocrino y sus lesiones precursoras de alto grado. Los estudios in vitro revelaron una implicación funcional de la inactivación de MAL en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, ya que la sobreexpresión de MAL en células de la línea celular de cáncer de cuello uterino SiHa que contiene de  
25 HPV 16 redujo la proliferación y anuló el crecimiento independiente del anclaje. Lo que es más interesante, los presentes inventores han mostrado en este sentido que la hipermetilación del promotor de MAL se podría detectar en muestras cervicovaginales recogidas por automuestreo y se encontró que estaba asociada con la presencia de una lesión CIN subyacente de alto grado o cáncer de cuello uterino invasivo.

30 Curiosamente, como se muestra en la parte experimental de la presente invención, al combinar el análisis de metilación de MAL con el análisis de metilación de una región promotora del microRNA miR124-2, se alcanza una alta sensibilidad para  $\geq$ CIN2.

Estos resultados indican que la detección de la metilación del promotor de MAL en combinación con la metilación del promotor de hsa-miR-124 en muestras cervicovaginales autorecolectadas puede predecir la enfermedad CIN de alto grado o el cáncer de cuello uterino.

35 La secuencia hsa-miR124 madura (número de acceso MIMAT0000422) está codificada por 3 secuencias de microARN prematuros individuales situadas en tres regiones genómicas diferentes, esto es, hsa-miR124-1 (número de acceso MI0000443) en el cromosoma 8p23.1, hsa-miR124- 2 (número de acceso MI0000444) en el cromosoma 8q12.3 y hsa-miR124-3 (número de acceso MI0000445) en el cromosoma 20q12.33 (números de acceso como se indica en la base de datos de miRNA, miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), Faculty of Life Sciences, University of Manchester). Aunque la secuencia madura es exactamente la misma, las secuencias prematura y reguladora son diferentes (véase la figura 2). Si en esta solicitud se utiliza el término hsa-miR124, se incluye cualquier forma de hsa-miR124.

45 La inhibición de la expresión epigenética de hsa-miR124 ya se ha descrito en varios cánceres humanos, incluyendo cáncer gástrico, colon, carcinomas de mama y pulmón y leucemia linfoblástica aguda (Lujambio et al., Cancer Res 2007, 67, 1424-1429; Andro IntJ Cancer 2009; 124: 2367-2374, Agirre et al. Cancer Res 2009;69:4443-4453). Estudios anteriores de Lujambio *et al.* and Agirre *et al.*, ya han señalado una función supresora de tumores putativa para hsa-miR124. En ambos estudios, se demostró que el silenciamiento epigenético de la expresión de hsa-miR124 para mediar la expresión inducida de la ciclina D quinasa 6 (CDK6), uno de los objetivos predichos de hsa-miR124. Se sabe que la CDK6 está implicada en la progresión y diferenciación del ciclo celular y puede inactivar la proteína retinoblastoma (pRb), un conocido supresor de tumores, con el fin de promover el crecimiento celular.

50 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona métodos de detección de la aparición de lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV que comprenden ensayar un lavado cervicovaginal para determinar la presencia de alteración en la metilación de la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) y hsa-miR124, en el que dicha alteración indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por HPV. Dicha presencia de lesiones precursoras de alto grado y/o cánceres invasivos se manifiesta por una metilación incrementada (también llamada hipermetilación) del gen de MAL y especialmente la región promotora del mismo y la región promotora de hsa-miR124.

La automuestra del sujeto contendrá células mucosas, tales como células cervicales, en las que se detectará una lesión precursora o un cáncer asociado con HPV.

Un método de la presente invención es particularmente adecuado para la detección de lesiones precancerosas de alto grado y cánceres invasivos que son inducidos por HPV de alto riesgo. Preferiblemente, el método de ensayo de la invención se realiza en muestras que ya han sido clasificadas como positivas para hrHPV.

La figura 1 muestra la región promotora rica en CpG y la primera secuencia intrónica rica en CpG del gen de MAL, así como la secuencia codificante y la secuencia 3' no codificante transcrita. La metilación de las secuencias ricas en CpG particularmente en la región promotora dará como resultado una transcripción fuertemente disminuida o incluso un bloqueo completo de la transcripción. Un fenómeno similar desempeña un papel en hsa-miR124, del cual la secuencia se representa en la figura 2. En este documento también están indicadas las áreas ricas en CpG y la metilación de estas resultará en una transcripción fuertemente reducida o incluso bloqueo completo de la transcripción de la molécula hsa-miR124. El ensayo se lleva a cabo preferiblemente sobre el contenido de ácido nucleico de la muestra, donde el reactivo es por lo general una sonda de ácido nucleico (ADN o ARN) o un cebador (PCR). Mediante el uso de tales sondas o cebadores, se pueden detectar, por ejemplo, productos de expresión génica, tales como ARNm. El reactivo también puede ser una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para la detección de la presencia de grupos metilo en el ácido nucleico de la muestra, siendo dicho ácido nucleico de la muestra, preferiblemente, ADN.

El ácido nucleico de la muestra se puede detectar directamente in situ o se puede aislar de otros componentes celulares por métodos comunes conocidos para los expertos en el arte antes de ponerse en contacto con el reactivo (véase por ejemplo "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. 1995. 4th edition, John Wiley and Sons; "A Laboratory Guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis", Krieg (ed.), 1996, Wiley-Liss; "Molecular Cloning: A laboratory manual", J. Sambrook, E.F. Fritsch. 1989. 3 Vols, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Parece que el estado de metilación de MAL y de hsa-miR124 es predictivo para determinar la presencia de una lesión cervical precursora de alto grado o de cáncer de cuello uterino invasivo. La hipermetilación ocurre en particular en las áreas ricas en citosina denominadas "islas CpG", que están situadas principalmente en las regiones reguladoras 5' de los genes y que normalmente están desmetiladas. El término "hipermetilación" incluye cualquier metilación de la citosina en una posición que normalmente está desmetilada en la secuencia del gen de MAL (por ejemplo, el promotor de MAL, el primer exón y la primera secuencia intrónica, véase la figura 1) o la secuencia hsa-miR124 (figura 2). La hipermetilación se puede detectar, por ejemplo, mediante el tratamiento con endonucleasa de restricción del polinucleótido MAL y el polinucleótido de hsa-miR124 (gen) y el análisis por transferencia de Southern. Por lo tanto, en una realización del método de la invención, se prefiere el análisis de endonucleasa de restricción para detectar la hipermetilación del gen de MAL o la secuencia hsa-miR124. Se puede utilizar cualquier endonucleasa de restricción que incluya CG como parte de su sitio de reconocimiento y que esté inhibida cuando el C esté metilado. Las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación tales como BssHII, MspI, NotI o HpaII, usadas solas o en combinación, son ejemplos de tales endonucleasas. Otras endonucleasas de restricción sensibles a la metilación serán conocidas para los expertos en el arte.

Otros métodos para la detección del gen de MAL o la hipermetilación de la secuencia hsa-miR124 implican la modificación de bisulfito del ADN, en la que las citosinas no metiladas se convierten en un uracilo mientras que las citosinas metiladas están protegidas contra la modificación química. Las posteriores amplificación y secuenciación por PCR, incluida la pirosecuenciación, revelará si las citosinas en las islas CpG se mantienen en caso de metilación o se sustituyen por un uracilo en el caso de un estado no metilado. Otro método implica el tratamiento de un producto amplificado por PCR generado a partir de ADN modificado con bisulfito con una endonucleasa de restricción que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento.

Un medio alternativo para ensayar secuencias metiladas es una PCR específica de metilación, que también se basa en la modificación de bisulfito de ADN, seguida por reacciones de PCR específicas que se dirigen a secuencias ricas en CpG.

Para los fines de la invención, se puede usar una sonda de ácido nucleico específica para MAL o hsa-miR124 para detectar la presencia de polinucleótido de MAL o hsa-miR124 (usando sonda de ácido nucleico) en fluidos o tejidos biológicos. Los cebadores de oligonucleótidos basados en cualquier región de secuencia de codificación y región de secuencia reguladora en la secuencia de MAL o hsa-miR124 son útiles para amplificar el ADN, por ejemplo, por PCR.

Cuando se usan cebadores de PCR, sondas de ácidos nucleicos o endonucleasas de restricción, se analiza la región reguladora 5', la primera secuencia intrónica y la secuencia codificadora de la secuencia MAL (según se especifica en la figura 1) o la secuencia hsa-miR124 (como se especifica en la Fig. 2).

En una realización de un método de la invención, se detecta una metilación incrementada del gen de MAL (incluyendo la región promotora) y la secuencia hsa-miR124 en la célula de prueba en comparación con la célula normal comparable.

La presente invención también proporciona el uso de un kit de partes en un método de detección de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por HPV de acuerdo con la

invención. Dicho kit puede comprender adecuadamente un dispositivo de muestreo que consiste en una jeringa de irrigación, un catéter de orina femenino desechable y un recipiente con fluido de irrigación para recoger células cervicovaginales mediante un lavado. Un kit de acuerdo con la presente invención puede comprender cebadores y sondas para la detección de metilación de MAL y hsa-miR124-2. Los cebadores y sondas usados para la presente invención se dan en la tabla 1 y la tabla 2.

Tabla 1: combinaciones de cebadores y sondas de MAL utilizadas para el análisis de PCR específico de metilación cuantitativo en automuestras:

cebador directo de MAL F: GCGTAGTATTAAGTAGAGAGGTTCCG

cebador inverso de MAL R: AATAAAAAATAAAACCGACCGC

sonda de MAL P: ACTAAACCGACGCTAATTCGACGCT

Un kit de partes como se describe en este documento comprende medios para la detección de metilación de MAL y hsa-miR124, tales como enzimas de restricción sensibles a la metilación o sondas, cebadores específicos para MAL o específicos para la secuencia de nucleótidos MAL de la figura 1 o sondas, cebadores específicos para hsa-miR124.

En aún otra realización alternativa de un kit como se usa en este documento, los medios para la detección de metilación de MAL y hsa-miR124 se pueden combinar con medios para la detección de infección por HPV, preferiblemente para la detección de infección por HPV del tipo de alto riesgo. Tales medios pueden comprender cebadores o sondas específicos de HPV, marcadores de proteínas para la infección por HPV o incluso marcadores sustitutivos para la infección por HPV como se conocen en la técnica.

#### Ejemplos

Ejemplo 1. Metilación de Hsa-miR124 en líneas celulares de queratinocitos inmortalizados con HPV y líneas celulares de cáncer de cuello uterino

Puesto que la secuencia hsa-miR124 madura está codificada en tres ubicaciones genómicas diferentes (hsa-miR124-1 [8p23.1], hsa-miR124-2 [8q12.3] y hsa-miR124-3 [20q13.33]), se determinó el estado de metilación de la hsa-miR124 en los 3 loci mediante PCR cuantitativa de metilación específica (MSP). Se detectaron los siguientes amplicones: hsa-miR124-1: nt 811 a 904; hsa-miR124-2: nt 701 a 838; hsa-miR124-3: nt 897 a 991, cada uno de los cuales se denominan como las secuencias mostradas en la figura 2. El gen de mantenimiento B-actina se usó como referencia interna (Harden et al., J Urology 2003;169:1138-1142). Utilizando estos ensayos no se encontró metilación de hsa-miR124 en queratinocitos primarios aislados de tres donantes diferentes (EK), mientras que las islas CpG correspondientes de los tres loci genómicos fueron metiladas en tres líneas celulares de carcinoma cervical que contiene hrHPV (SiHa, HeLa y CaSki). En los pasajes tempranos y tardíos de cuatro líneas de células de queratinocitos inmortalizadas con hrHPV (FK16A, FK16B, FK18A y FK18B), que representaban etapas consecutivas de transformación maligna inducida por HPV (Steenbergen et al., Oncogene 1996;13:1249-1257), tanto hsa-miR124-1 como hsa-miR124-2 fueron frecuentemente metiladas, aunque los niveles de metilación fueron relativamente bajos en los pasajes tempranos (pasaje 23-43) en comparación con los altos niveles de metilación en pasajes tardíos (pasaje 70-96). El tercer gen, hsa-miR124-3, no se metiló en ninguna de las líneas celulares inmortalizadas por HPV. Mientras que la expresión de ARN de hsa-miR124 era indetectable en células de cáncer de cuello uterino SiHa, se detectó la reexpresión de hsa-miR124 en células SiHa tratadas con el agente desmetilante de ADN 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC, 5 µM). Esto indica que el silenciamiento del gen hsa-miR124 está mediado (in)directamente por modificaciones epigenéticas, predominantemente metilación del ADN, en células SiHa.

Ejemplo 2: La sobreexpresión de hsa-miR124 en células SiHa tiene efectos antiproliferativos y antimigratorios

Para determinar la posible relevancia funcional de la disminución de la expresión de hsa-miR124 en la carcinogénesis cervical, se transdujeron dos líneas celulares de cáncer de cuello uterino SiHa y CaSki con vectores retrovirales que contenían construcciones génicas que conducían a una expresión estable de hsa-miR124. El análisis de expresión mediante RT-PCR confirmó la expresión ectópica de hsa-miR124 en transductores hsa-miR124 y la ausencia de expresión en células transducidas con un vector retroviral vacío. La expresión ectópica de hsa-miR124 en ambos transductantes de SiHa y CaSki dio lugar a una disminución significativa de la proliferación celular ( $p < 0.05$ ) en comparación con transductantes hsa-miR-ctrl después de 6 días de cultivo. Además, utilizando un ensayo de cicatrización de heridas, se encontró que los transductantes SiHa hsa-miR124 tenían una capacidad migratoria disminuida en comparación con células SiHa hsa-miR-ctrl.

Ejemplo 3: metilación del promotor hsa-miR124 en muestras de tejido cervical

Para determinar si y cuando la hipermetilación de ADN de las tres regiones reguladoras de hsa-miR124 se produce durante el proceso de carcinogénesis cervical in vivo, se realizó un análisis cuantitativo de MSP, usando cebadores y sondas como se definen en la tabla 2 sobre muestras de tejido cervical obtenidas a partir de lesiones de CIN de bajo grado (CIN1), de cuello uterino normal, lesiones CIN de alto grado (CIN3) y carcinomas cervicales (tanto SCC como AdCas). En cuello uterino normal, 6% (1/18) de las muestras, resultaron positivas para la metilación en hsa-miR124-3,

5 mientras que no fue detectada la metilación de las muestras normales en las otras dos regiones reguladoras de genes (hsa-miR124-1 y hsa-miR124-2). En las lesiones de CIN1, el 28% (10/36) mostró metilación en hsa-miR124-1, 6% (2/36) en hsa-miR124-2 y 11% (4/36) en hsa-miR124-3. Los resultados positivos a la metilación en las lesiones CIN3 varió de 46% (19/41) para hsa-miR124-1, 20% (8/41) para hsa-miR124-2 a 10% (4/41) para hsa-miR124-3. Las frecuencias de hsa-miR124-1, hsa-miR124-2 y hsa-miR124-3 como se detectó en SCC fueron 86% (25/29), 83% (24/29) y 72% (21/29), respectivamente. En el caso de AdCa, se detectó la metilación de hsa-miR124-1, hsa-miR124-2 y hsa-miR124-3 en 93% (14/15), 80% (12/15) y 73% (11/15) respectivamente, de estos tumores. Al combinar los tres ensayos de MSP se encontró que la combinación de hsa-miR124-1 y hsa-miR124-2 tiene la más alta sensibilidad combinada y especificidad para  $\geq$ CIN3, ya que todas las muestras de epitelio cervical normales son negativas para la prueba, y el 59% de las lesiones CIN3, 93% de SCC y 93% de AdCas son positivos para la prueba. Debe tenerse en cuenta que las frecuencias por encima de las muestras de tejido sólo con umbrales establecidos en una especificidad de 100%. Bajar el umbral aumenta la sensibilidad para CIN3, aunque disminuye la especificidad.

Tabla 2: Cebadores y sondas para análisis de PCR específico de metilación cuantitativo de MIR124-1, MIR124-2 y MIR124-3.

	Cebador directo	Sonda	Cebador inverso	Ubicación del amplificación	Longitud del amplificación
MIR124-1	5-CGGCGGGGAGGATGTT-3'	5'-CGGCGTTTTTATTTTT-3'	5'-ATAAAAAACGACGCGTATACGTACG-3'	811-904	94 bp
MIR124-2	5'-GGGTAATTAATTTGGATTTACGTCGTTAT-3'	5'-TTTACAACACACGCCTAAA-3'	5'-CGTAAAAATATAAACGATACGTATACCTACGT-3'	701-838	138 bp
MIR124-3	5'-ACGCGGCGAAGACGTTT-3'	5'-AAAATCCTCGCCCGAAAAACGCGA-3'	5'-CGAACGACGAACGTGCGAAA-3'	897-991	95 bp

15

Ejemplo 4: metilación de hsa-miR124 en raspado cervical

Para evaluar el valor marcador putativo de la metilación de hsa-miR124 en la práctica clínica, se evaluó hsa-miR124 en raspados cervicales.

20 Utilizando un diseño de casos y controles anidados de mujeres que participaron en un ensayo de cribado basado en la población, se estudiaron raspados cervicales de mujeres positivas para hrHPV en las que se diagnosticó  $\geq$ CIN 2 (incluido 1 carcinoma) dentro de los 18 meses de seguimiento (esto es, casos) frente a las mujeres positivas para hrHPV en las que se diagnosticó CIN 1 máximo en un período de seguimiento de 18 meses (esto es, controles). La metilación de Hsa-miR124-1 se detectó en el 5% de los controles y el 48% de los casos. La metilación de Hsa-miR124-2 estuvo ausente en los controles y se detectó en el 48% de los casos y la metilación de hsa-miR124-3 se detectó en el 5% de los controles y el 24% de los casos. El análisis combinado de hsa-miR124-1 y hsa-miR124-2 detectó controles del 5% y 71% de los casos. Otros ajustes de la configuración de umbral aumentaron las tasas de sensibilidad para CIN3 a  $>80\%$ , siendo las tasas de especificidad aún aceptables ( $>50\%$ ).

Ejemplo 5: metilación de hsa-miR124 en muestras automuestreadas

30 Posteriormente, se analizaron muestras cervicovaginales automuestreadas recogidas utilizando ya sea un muestreador VivaBrush (Rovers Medical Devices, Oss, Países Bajos) o Pantarhei (Pantarhei Devices, Zeist, Países Bajos) durante el curso de un estudio prospectivo en el que se envió un total de 45,000 paquetes de automuestreo a las mujeres que, incluso después de un segundo recordatorio, no respondieron a la invitación para el cribado cervical regular (Véase [www.trialregister.nl](http://www.trialregister.nl), Trial no.NTR962 (PROHTECT trial)). Aproximadamente un tercio de estas mujeres devolvieron muestras automuestreadas al laboratorio. Estas muestras son apropiadas para el análisis de PCR de HPV (esto es, positivas a la beta-globina PCR) y las pruebas por hrHPV GP5+/6+-PCR producen al menos tantas lesiones  $\geq$ CIN2 en esta población que se encuentran mediante cribado regular en una población emparejada de mujeres respondedoras (Gök et al.2010 Brit.Medical J.;340:c1040).

35 El 55% de las automuestras de mujeres que más tarde fueron diagnosticadas con  $\geq$ CIN3 resultaron positivas para cualquiera de los marcadores MIR124, en comparación con sólo el 25% de las mujeres sin evidencia de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento. Estos datos muestran que el análisis de metilación MIR124 en materiales automuestreados es bien factible y mejorará la detección de la enfermedad cervical subyacente de alto grado.

40

Ejemplo 6 Comparación del rendimiento del análisis de metilación de CADM1 y MAL en muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas con su rendimiento en raspados cervicales recolectados por el médico

5 La prueba combinada para la metilación del promotor del gen que codifica la proteína asociada a la maduración de los linfocitos T, también conocida como proteína de diferenciación de células T (también denominada como MAL, Genbank Accession NM\_002371) y el gen que codifica la molécula de adhesión celular 1 (CADM1) parece una herramienta de triaje molecular alternativa atractiva cuando se aplicó a los raspados cervicales recolectados por el médico que se desempeñaron igual de bien como la citología (Hesselink et al. 2011, Clin Cancer Res; 17(8):2459-65). Como tal, a continuación, se evaluó la metilación del promotor de MAL y CADM1 en muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas positivas a ADN hrHPV obtenidas de no participantes que participaron en el estudio de cohorte PROHTECT [Gök et al. 2010 Brit. Medical J.; 340:c1040] y compararon su rendimiento con los resultados obtenidos en raspados cervicales recolectados por médicos (n=236) como se describe por Hesselink et al. (Hesselink et al. 2011, Clin Cancer Res; 17(8):2459-65).

15 De las 757 mujeres que resultaron positivas para hrHPV en su muestra de lavado cervicovaginal autorecolectada en el ensayo PROHTECT 1, 355 mujeres tuvieron en última instancia un criterio de valoración válido del estudio. Estas incluyeron a 74 mujeres que habían sido diagnosticadas con CIN3+, incluyendo cuatro carcinomas de células escamosas y un adenocarcinoma, 20 con CIN2 y 261 sin evidencia de CIN2+ (esto es, a CIN1 máxima). El último grupo se denominará en lo sucesivo como  $\leq$ CIN1. Todas las muestras se ensayaron tanto para la metilación de MAL (región M1) como para CADM1 (región M18) usando PCR cuantitativa específica de metilación de acuerdo con los mismos criterios descritos anteriormente para los raspados cervicales recolectados por el médico (Hesselink et al. 2011, Clin Cancer Res; 17(8):2459-65)

20 Se encontró que el análisis de metilación de MAL funcionaba igualmente bien en muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas comparadas con raspados cervicales recogidos por médicos, tanto con respecto a la detección de CIN3+ como lesiones CIN2+ (Figura 3A). Por el contrario, las señales obtenidas en el análisis de metilación de CADM1 de muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas se redujeron marcadamente en comparación con las obtenidas en raspados cervicales recolectados por el médico y, como tal, particularmente la detección de CIN3+ en muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas, no fue satisfactoria (Figura 3B).

25 Esta discrepancia refleja muy probablemente el hecho de que las muestras autorecolectadas pueden tener una composición celular diferente (esto es, la deficiencia relativa de células cervicales en comparación con las células vaginales) que los frotis cervicales tomados por un médico. De acuerdo con lo anterior, los marcadores de triaje más óptimos para los raspados cervicales tomados por el médico de hrHPV-positivo no necesariamente se pueden traducir directamente a automuestras. Para un rendimiento clínico óptimo es probable que sea necesario un panel diferente de marcadores de metilación.

Ejemplo 7 Análisis de metilación de hsa-miR124-2 en combinación con metilación de MAL en muestras de lavado cervicovaginal autorecolectadas

35 Como se describe en el ejemplo 1, existe la necesidad de un marcador de metilación alternativo para mejorar el rendimiento clínico del análisis de metilación en muestras autorecolectadas. Los estudios previos utilizando MAL y CADM1 han demostrado que los marcadores que representan distintos eventos funcionales en el proceso de múltiples etapas de la carcinogénesis cervical pueden ser complementarios entre sí en términos de detección de CIN3+ (Overmeer et al., Int J Cancer 2010 Epub Dec 28; Hesselink et al. 2011, Clin Cancer Res; 17(8):2459-65). De este modo, la hipótesis de que para el análisis de muestras autorecolectadas es preferible un marcador alternativo que representa la misma etapa de transformación como CADM1. Mientras que la metilación de MAL se produce bastante temprano durante la transformación, esto es, altos niveles de metilación en los primeros pasajes de las células inmortalizadas con HPV, y la metilación de CADM1 está vinculada a etapas posteriores de transformación, tales como el crecimiento independiente de anclaje y tumorigenicidad, se buscó eventos de metilación funcionalmente asociados con etapas de transformación posteriores. Uno de tales eventos es el silenciamiento mediado por metilación del microARN 124 humano. Los altos niveles de metilación de los genes que codifican estos microARN se hicieron evidentes en pasajes tardíos de queratinocitos transfectados con HPV tras la adquisición de características de crecimiento independientes del anclaje. Además, se encontró que la sobreexpresión de hsa-miR124 suprimía las propiedades de crecimiento oncogénico de las células de cáncer de cuello uterino, apoyando un papel funcional en la carcinogénesis cervical, véase el ejemplo 2.

45 Por lo tanto, se evaluó el marcador de metilación hsa-miR124 por su potencial para complementar el marcador MAL para la detección de CIN3+ en la misma serie de muestras autorecolectadas positivas para hrHPV como probado para CADM1 y MAL (véase el ejemplo 1). De interés, el análisis de hsa-miR124-2 reveló una discriminación mucho mejor de lesiones de CIN3+ en comparación con CADM1 (Figura 4). Lo más importante es que se encontró que la combinación hsa-miR124-2/MAL tenía un excelente desempeño clínico en muestras autorecolectadas (esto es sensibilidad a CIN3+ de 86.5% a 52.5% de especificidad), igual al de CADM1/MAL en muestras recolectadas por el médico (esto es sensibilidad a CIN3+ de 83.3% a 50% de especificidad).

Todas las combinaciones de cebadores y sondas utilizadas para el análisis de qMSP en muestras cervicovaginales autorecolectadas se enumeran en la tabla 1 y tabla 2.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de detección de la aparición de lesiones cervicales precancerosas de alto grado inducidas por HPV y/o cánceres de cuello uterino invasivos inducidos por HPV que comprende ensayar una muestra de lavado cervicovaginal para determinar la presencia de una alteración en la metilación de la proteína asociada a la maduración de linfocitos T (MAL) y hsa-miR124, en el que dicha alteración indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y/o cánceres invasivos inducidos por HPV.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer invasivo inducido por HPV es un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo.
- 10 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha alteración es un aumento de metilación en comparación con una muestra de control, normal.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido nucleico es ADN.
5. Método según la reivindicación 4, en el que el ensayo se realiza con una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación.
- 15 6. Método según la reivindicación 4, en el que el reactivo es una sonda o cebador de ácido nucleico que se une al ácido nucleico.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicha sonda o cebador de ácido nucleico tiene un marcador detectable.
8. Método según la reivindicación 6 o 7, en el que la sonda de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias representadas en la tabla 1.
- 20 9. Uso de un conjunto de marcadores de diagnóstico molecular para la detección de una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV en una muestra de lavado cervicovaginal, en la que dicho conjunto de marcadores indica alteración en la metilación del gen o promotor de MAL y alteración en metilación de la secuencia hsa-miR124.
- 25 10. Uso de un kit de partes en un método de detección de una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV en células de ensayo de una muestra de lavado cervicovaginal de un sujeto, comprendiendo dicho kit una endonucleasa de restricción sensible a la metilación y
  - medios para la detección de metilación del gen o promotor de MAL, en el que dichos medios comprenden sondas, cebadores específicos para MAL o específicos para la secuencia de nucleótidos de MAL de la figura 1; y
  - medios para la detección de metilación de hsa-miR124, en el que dichos medios comprenden sondas, cebadores específicos para hsa-miR124.
- 30 11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicho kit de partes comprende además medios para la detección de infección por HPV, en el que dichos medios comprenden sondas y cebadores específicos para HPV.
12. Uso de un kit de partes como se define en las reivindicaciones 10 u 11, que comprende además medios para tomar un lavado cervicovaginal.

**Figura 1:**

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

Tomada de UCSC genome bioinformatic (www.genome.ucsc.edu)  
 Ref: hg18\_knownGene\_uc002stx.1 range=chr2:95054206-95083462.

El inicio de la transcripción se indica en negrita y resaltado  
 La secuencia de codificación está en mayúsculas  
 Parte del intrón 1, que contiene secuencias ricas en CpG y que forma parte de una isla CpG más grande que comienza en el promotor (nt375), está marcada con \* y subrayada

gactcgggcccggatttcaggcttcagtgctttagtaggaggaaacacagcaat  
 cacactattaatagtaaatataaaataaatgggcaactgctgcatggtaat  
 acttttttttttaaggcaaaaaataaaaaatagtgaacagagaaacaaa  
 acatgaaacaccggcagtcacacaggcaggcaagaacctgggggtggggg  
 tagcagcgggtcccaccctcaaaaggcccgggctgccagaccaagagaaa  
 gcgatgaatctctctggtaacgtcccttctctgctgcatggattcaaggc  
 cgacctgccccagcaccaccaccagcagcctctctgctggggccggcacag  
 ctgggagcaacctcctactctcaggcagacgcgcagcaccagcagagag  
 gcccggtgcaggatcccagcgcgaaccagcgcgggctcagtggaagcggg  
 aagggccggcggcggcggcgggctccatccccactgcagacccccagc  
 ctgtggcgggtgggtccagttccgccaggaaaaccggcgcctggagctgtggg  
 tcgagcacattaacgcattccagcggaaaaatgaaggagacccaaattcaa  
 agttaaagtaaatggtgacccgagaggtgccttgatgagaaggtttgggg  
 cccggttactgatggttatcattcttaccagatgctggtcacctacgaag  
 ggagaaaggcagcaggagcgcctgaccaaagtgggtttgcccctgcttccc  
 gcaagaggtggcaccacggctggaacgcaggagtgcagccacagctccc  
 cagctctggacgcccgcagcggggcctcgaagaggttcagggcgggtgcc  
 gcggetcgggcccgggtctcccggggcgtggggcggggggcggggtgg  
 gcggcggcggggctcctccctctctgcccgggctcccctgctcttaa  
 cccgcgcggggggcggcccaggccactgggctccgcggagccagcagag  
**gtc**tgccgaggtctgagcggcgcctcgtcccgtcccaggccgacgccag  
 caagcgcgtc**ATG**CCCCCGCAGCGGCACGGGGGGCAGCACCCCTGCCAG  
 TGGCTTCTCGGTCTTACACCTTGCCCGACTTGCTCTTCATCTTTGAGT  
TT\*gtgagtggtcctggcgggggaagggaaggggtgggctgagccgtg  
ctctctcgggcccagcagctgtcggacgggatccgctagctgcgca  
ggttctgggagcatcggggcagcagggcagggcggggactaagccaggg  
aagtcccctcccacctccggctcctttgtgcccttctagaccaacagaatg  
aggggaacagctctacaggactatggaggaaaaactgggttcccactggg  
gtcagatgtaggcagcggggcaggggggacggctcttggttcgctggtc  
ccaaagctgcgcgcggggcccacttgacgcgcgcagcgcaccgaagctc  
ccgcgcgcctttgcgcgggtgggtagaagtgcgcagcttttacaagggag  
aaggtttcgtaaaaaagaaaaaaatacagcaagagaaacattagatt  
accaaccgagatttgagatgagagggagctgaatccggttattttctt  
ctggccttttaaaagttctggcgagggaacgtatttgcgaccaattcgat  
ctggaaatgaggccatcgtttgcttggccgcagtcctctgcccgtgtg  
cggggtgggggtggaggagatggggggtgggggtgggggtggcggcga  
gagcagatccgcgcgcctcgactgacctgggcaggcccggggcctctgca  
cctgcggtcgggtcccgccttgacgcacggctctctgctgaggtgcagg  
aaagcgttccctactgagaactcctgataagcgcctcacgggtgcggaag

ccgaagtgacctccctcagcctcaactccccgggggcccgtggccttcac\*  
ATCTTCGGGGGCTGGTGTGGATCCTGGTGGCCTCCTCCCTGGTGCCC  
TGGCCCCCTGGTCCAGGGCTGGGTGATGTTTCGTGTCTGTGTTCTGCTTCGT  
GGCCACCACCACCTTGATCATCCTGTACATAATTGGAGCCCACGGTGGAG  
AGACTTCCTGGGTACCTTGGACGCAGCCTACCACTGCACCCGCTGCCCTC  
TTTTACCTCAGCGCCTCAGTCCTGGAGGCCCTGGCCACCATCACGATGCA  
AGACGGCTTACCTACAGGCACTACCATGAAAACATTGCTGCCGTGGTGT  
TCTCCTACATAGCCACTCTGCTCTACGTGGTCCATGCCGGTGTCTCTTTA  
ATCAGATGGAAGTCTTCATAAagccgcagtagaacttgagctgaaaacc  
agatggtgttaactggccgccccactttccggcataacttttagaaaac  
agaaatgcccttgatggtggaaaaaagaaaacaaccacccccccactgcc  
caaaaaaaaaagccctgccctgttgctcgtgggtgctgtgtttactctcc  
cgtgtgccttcgctccgggtgggagcttgctgtgtctaacctccaact  
gctgtgctgtctgctagggtcacctcctgtttgtgaaaggggaccttctt  
gttcgggggtgggaagtggcgaccgtgacctgagaaggaaagaaagatcc  
tctgctgaccttgagcagctctcgagaactacctgttggtattgtcca  
caagctctcccagcgcgccatcttgctgcatgttttaagtcttcatgga  
tgttctgcatgcatggggactaaaactcacccaacagatctttccagag  
gtccatggtggaagacgataaccctgtgaaatactttataaaatgtctta  
atgttc





**B: secuencia hsa-miR124-2 (Número de acceso: MI0000444)**

```

1 TCGACCACGCCGTAGGGGACGCCGTGAAAAGAGCCGTCGCGCCCGCTGCCTCCTGCCCGC
|++|::|++:++||| ||| |++:++||| ||| |::|++|++++:++:|::|::|::|++:
1 TCGATTACGTCGTAGGGGACGTCGTGAAAAGAGTCGTCGCGTTCGTTGTTTTTGTTCGT

61 TGCGCAGAGGGCTCCGCCGTAGAGGTCAACTCCCTCACCTTTTCTCTCTCCTGCTTG
|++:| ||| |::|++:++||| ||| |::|::|::|::|::|::|::|::|::|::|::|
61 TGGTAGAGGGTTTCGTTTCGTAGAGGTTAATTTTTTTTATTTTTTTTTTTTTTTGTTG

121 CCCTCCCTCCGCCCGGCCAGGCGCTTCCAGCCCCAGACTGTGGCCACTGGCTGAGGAGT
::|::|::|++:++||:|::| |++:|::|::|::|::|::|::|::|::|::|::|::|
121 TTTTTTTTTCGTTTCGGTTTAGCGTTTTTAGTTTTAGATTGTGGTTATTGGTTGAGGAGT

181 GCGAGTCGGCTGCGCTGCCCTGAGCCTAATCCCTCTTCCGGGCCAGACCCGAGGTCGCG
|++|||++|:| |++:|::|::| |::| |::|::|::|::|::|++|::|::| |::|++| |::|++
181 GCGAGTCGGTTGCGTTGTTTTGAGTTTAATTTTTTTTTTCGGGTTTAGATTGAGGTTGCG

241 GCTCCTGGGCAGTGGGGAAGCTTTAGTGAGCAGGCTTTTCTCTCCGCAGCAAACCTGTAG
+:|::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::|
241 GTTTTTGGGTAGTGGGGAAGTTTTAGTGAGTAGTTTTTTTTTTTCGTAGTAAATTTGTAG

301 CCAGACCAGATGGGCCGCCAGCTCTCTCGGGACTAGGCAGGTGCGGATGAGTTAATTTT
:| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::|
301 TTAGATTAGATGGGTTCGTTTAGTTTTTTCGGATTAGGTAGGTGCGGATGAGTTAATTTT

361 TCCGCATTACAAAGAAAGATGACCCAGCCCGCCCTTGGACTCTCTTTTCCCAAAATCTCC
|:++:| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::|
361 TTCGTATTATAAAGAAAGATGATTTAGTTTCGTTTTTGGATTTTTTTTTTTTAAATTTTTT

421 CAACCAAACCCGCGGTAACGTTATCAAAGCACACAGAGCCAGGCATATCTGTGTGTTTA
:| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::|
421 TAATTAATTCGCGGTAACGTTATTAAGGATATAGAGTTTAGGTATATTTGTGTGTTTA

481 TCTTACAGGCACACACGCATGGTTTTCTCTTTTATATGCTAGATTTTCATCCCTGACAGCA
|:| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::| |::|
481 TTTTATAGGTATATACGTATGGTTTTTTTTTTTATATGTTAGATTTTATTTTGTATAGTA

541 GAAAATGATTGGCAATGGTTATGACGGAGAACATGCAATAGCGTGGTTCCTTAAAAACCTG
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
541 GAAAATGATTGGTAATGGTTATGACGGAGAATATGTAATAGCGTGGTTTTTAAAAATTG

601 CCATTCCTTACAAGTGCCTTAGAAAGGATTCAGGGCGAACCAACTGGGTTAATTGCATTG
:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
601 TTATTTTTTATAAGTGTTTTAGAAAGGATTTAGGGCGAATTAATTGGGTTAATTGTATTT

661 AGTAAAATAACACGATTACAAAATTAGATCTGTACCAAGAGGGGTAATTAACCTGGATCCA
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
661 AGTAAAATAATACGATTATARRATTAGATTTGATTAGAGGGGTAATTAATTTGGATTTA

721 CGCCGTCATTTGAAAACCTAGATTTTATAGCCTTATGTATGTTTTTAGGCGTGTCTGTGTA
++:++:| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
721 CGTCGTTATTTGAAAATTAGATTTTATAGGTTTATGTATGTTTTTAGGCGTGTCTGTGTA

781 TGGCATGGAGATAATGCATATGTATACGAGGCACACGCACCGTCTACACTCCACGGA

```

```

| | : | | | | | | | | | | : | | | | | | | | | | ++ : | | : | : ++ : : ++ : | : | : | : | : | : ++ | |
781 TGGTATGGAGATATATGTATATGTATACGTAGGTATACGTATCGTTTATATTTTACGGA
| : | | : | | | | | | | | : | ++ : | : | | : | | | | | | | | : | | | | | | | | : | | |
841 ACAGACTAATTACAGCGGCTCTGGCAGATGTGTCAGAGATGAGCAGAGACAGGAGCTGG
| : | | : | | | | | | | | : | ++ : | : | | : | | | | | | | | : | | | | | | | | : | | |
841 ATAGATTAATTATAGCGSTTTTGGTAGATGTGTTAGAGATGAGTAGAGATAGGAGTTGG

901 GCTTATGAGTTATGACTCTAGGGGTAGAGACTCAGAGCGGAGAGAGGGGGATGGGCAGGG
| : | | | | | | | | | | : | : | | | | | | | | : | : | | ++ | | | | | | | | | | : | | |
901 GTTTATGAGTTATGATTTTAGGGGTAGAGATTTAGAGCGGAGAGAGGGGGATGGGTAGGG

961 AGAGAAGAGTGGTAATCGCAGTGGGTCTTATACTTTCCGGATCAAGATTAGAGGCTCTGC
| | | | | | | | | | | | ++ : | | | | | | : | | | | : | | : ++ | | : | | | | | | | | : | : | :
961 AGAGAAGAGTGGTAATCGTAGTGGGTTTTATATTTTCCGGATTAAGATTAGAGGTTTTGT

1021 TCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGC
| : | : ++ | | | | : | : | ++ | | : | | | | | | | | | | : | | : | | | | | | | | : | + + + + | | | | | | :
1021 TTTTCGTGTTTATAGCGGATTTTGATTTAATGTTATATAATTAAGGTACGCGGTGAATGT

1081 CAAGAGCGGAGCCTACGGCTGCACTTGAA
| : | | | | ++ | | | | : | : | ++ | | : | | : | | | | | |
1081 TAAGAGCGGAGTTTACGGTTGTATTTGAA

```

C: **secuencia hsa-miR124-3** (Número de acceso: MI0000445)

```

1 CTCGGGGAGGCAGCGCGGGGCCGGTGTCCGGGTGACGTACCCGCGCGCCCGCAGTGATAA
  :|++| | | | | : | | ++| ++| | | : ++| | | | | ++| : | : ++++++ : : : | | | | | |
1 TTCGGGGAGGTAGCGCGGGTCCGGTGTCCGGGTGACGTTATCGCGCGGTTTTAGTGATAA

61 TCGCCCGGTGCCGGAGCGGAGCGCGGATAACCGCGGAGGCAACGGCGACGGCBBCCGGCGG
  | ++| : ++| | | : ++| | | ++| | | +++++| | | ++++++| | | : | | ++| ++| ++| ++| ++| ++|
61 TCGGTCCGTGTCCGGAGCGGAGCGCGGATAACCGCGGAGGTAACGGCGACGGCBBCCGGCGG

121 CCGCCGGGCGCGGGACAGTTGCATCGSGCCCGGGCCGGCTAGCAGGAGCTGGGCGCCTG
  ++| ++| | +++++| | | : | | | | : | ++| | | : ++| | : ++| | : | | | | : | | | ++| : | |
121 CCGCCGGGCGCGGGATAGTTGTATCGSSGTCGGGTCCGGTTAGTAGGAGTTGGGCGTTG

181 CAGCGTGGACCCCGTGGACACTCGGCTCGCAGCCGGCCCTGCGGCGCTCGGGGACTTGGCT
  : | | ++| | | | : : ++| | | : : ++| | : ++| : : | | ++| ++| : ++| | | : | | : |
181 TAGCGTGGATTTCGTGGATATTCGGTTCGAGTCGGTTTTCGGCGTTCCGGGATTTCGTT

241 GGTCCCTTCTCGGGTTCGGGGCCCTTCTCCGCCAGGGCAGCAGCGGCGGGGGCCG
  | | : : : | : ++| | | | : : +++++ : : | : : ++ : : | | | : | : | ++++++ | | : : :
241 GGTTCCTTCTCGGGTTCGGGGCCCTTCTCCGCCAGGGCAGCAGCGGCGGGGGCCG

301 CCGGAGCCGAAGAGCAGGCGGGAACTGGCGGCGCGCGGGAGGCGCAGGGAGCGGAGGCG
  ++| | | | ++| | | | : | | ++| ++| +++++| | | ++| : | | | ++| | | ++|
301 CCGGAGTCGAAGAGTAGGCGGGAATTGCGGCGCGCGCGGGAGGCGTAGGGAGCGGAGGCG

361 GCAGCAGCGGCTCCCGCGGGGACTGGTAATTACGCTCGGGGCGGGCGGGGCGAGCCGG
  | : | : | ++| : : : ++| ++| | : | | | | | ++| : ++| | : ++| | : ++| | ++| | ++|
361 GTAGTAGCGGTTTTTCGTGGGATTCGTAATTACGTTCCGGGTCGGGTCGGGCGGAGTCGG

421 GCAAGCGGCTCTCTGGGTCTCCCGCTCTTTCTCTCCACGAACAGCTCGAGCGGCTTCTC
  | : | | ++| : : : : | | | | : : : ++| : | : : : ++| : | : : ++| ++| : : | : +
421 GTAAGCGGTTTTTTTGGGTTTTTTTCGTTTTTTTTTACGAATAGTTTCGAGCGTTTTTTC

481 GCGGGCCCGCTGCGCGCGGAGAGGACGAGCTCGCTGGGTTGTA AAAAGAGACGAGTTTTC
  +++| : : ++| | ++++++ | | | | ++| : ++| | | | | | | | | | | ++| | | | :
481 GCGGGTTCGTTGCGCGCGGAGAGGACGAGTTTCGTTGGGTTGTA AAAAGAGACGAGTTTTT

541 ATCTTTGAGCATCGAGATTCGTTCTTTTAACCGCATTCCGGTCCGCGCTCCTGGGTCGGCA
  | | : | | | | : | ++| | | ++| : | | | | : ++| | | ++| | +++++ : : | | | | ++| : |
541 ATTTTGGAGTATCGAGATTCGTTTTTTTAATCGTATTCGGTCCGCGTTTTTTGGGTCGGTA

601 CCGGCAGGGCGACGGCAGGGGAAGGCAGCTCCCGAGGAGCTCGCGCCGCCAGTCCGGAGC
  ++| | : | | | ++| ++| : | | | | | : | : | ++| | | | : ++++++ : : : | | ++| | +
601 CCGGTAGGGCGACGGTAGGGGAAGGTA GTTCGGAGGAGTTCCGCTCGTTTAGTCCGAGC

661 GGTTCGCGCCCTCCGGAGCCCGCGGAGGCGGCGGGTGGCGACGCGCTCAGCAGCCG
  + | | | : | ++| : : : ++| | | : : +++++| | | ++| : ++| | | | ++| : +++++ : : : : :
661 GGTTCGCGTTTTTCGGAGTTTCGCGGAGGCGGTTCCGGTCCGCTACGCGTTTTATTATTTT

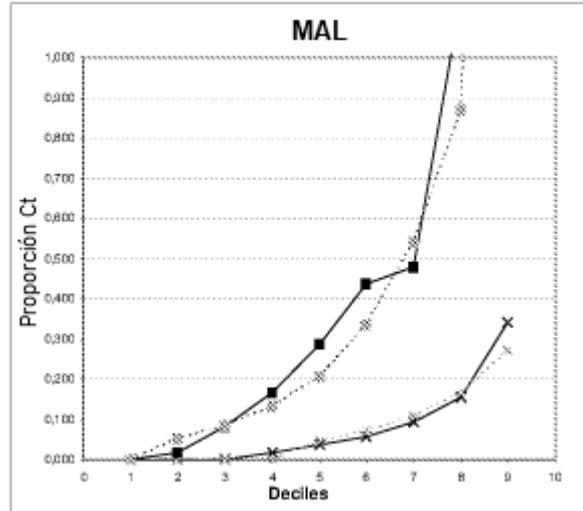
721 CACCCCGGAATCCGCTTCGCGATTCCCGGGCGCCCAAGCTCCAGGAACGCCCGGAGGG
  : : : : ++| | | : ++| : | +++++| | : ++| | ++ : : : : | : : | | | ++ : : ++| | |
721 TATTTTCGGAATTCGTTTTTCGCGATTTCGCGGCGTTTTTAACTTTAGGAAGCTTCGGAGGG

781 ACCCACTTGGGGGCCCACTCTCTGCCSCGAAAGGGGAGAAGTGTTGGGCTCCTCCGAGTC
  | ++| : : | | | | : : : : | : : : +++++| | | | | | | | | | | : : : | : ++| | +
781 ACGTATTTGGGGGTTTTATTTTTTGTCCGGGAAAGGGGAGAAGTGTTGGGTTTTTTTCGAGTC
  
```



**Figura 3**

A



B

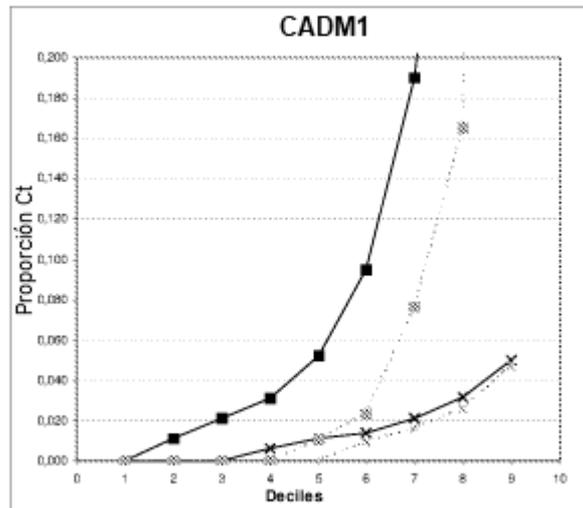


Figura 4

