

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 923**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2013 PCT/NL2013/050729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO14058321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2013 E 13785942 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2906716**

54 Título: **Marcadores de diagnóstico molecular HSA-MIR 124 Y FAM19A4, para cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones de precursores de alto grado**

30 Prioridad:

12.10.2012 EP 12188377

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

24.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MEIJER, CHRISTOPHORUS, JOANNES,
LAMBERTUS, MARIA;
SNIJDERS, PETRUS, JOSEPHUS, FERDINANDUS y
STEENBERGEN, RENSKÉ, DANIELA, 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 2 664 923 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Marcadores de diagnóstico molecular HSA-MIR 124 Y *FAM19A4*, para cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones de precursores de alto grado

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la prevención del cáncer y el diagnóstico médico; y se refiere a un marcador de diagnóstico molecular para cánceres invasivos inducidos por el virus del papiloma humano (HPV) y sus lesiones precursoras de alto grado, tales como el cáncer invasivo de cuello uterino y las lesiones premalignas del cuello uterino. En particular, la presente invención se refiere al uso de la secuencia genómica y reguladora de *FAM19A4* como marcador para lesiones premalignas inducidas por hrHPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por hrHPV.

15 Antecedentes de la invención

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

20 El desarrollo del carcinoma de células escamosas del cuello uterino se caracteriza por una secuencia de lesiones premalignas, denominadas neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que se clasifican de 1 a 3, que se refieren a la displasia leve (CIN 1), displasia moderada (CIN 2) y displasia/carcinoma severo *in situ* (CIN 3), respectivamente. CIN 1 también se conoce como lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y CIN 2 y CIN 3 juntas 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 es la lesión, menor es la posibilidad de regresión espontánea. El cáncer de cuello uterino se considera una enfermedad prevenible porque las etapas premalignas pueden detectarse mediante citología exfoliativa y tratarse con relativa facilidad cuando sea necesario, con solo efectos secundarios menores. El cribado cervical tiene como objetivo el diagnóstico temprano de lesiones premalignas de alto grado (es decir, CIN 2/3 y adenocarcinoma *in situ*) y cancerosas tratables, lo que reduce la mortalidad del cáncer invasivo de cuello uterino. La práctica médica general comprende el tratamiento de todas las mujeres con CIN 2, CIN 3 confirmadas morfológicamente y adenocarcinoma *in situ*, con el fin de prevenir el desarrollo de cáncer de cuello uterino.

35 Durante la última década, se ha establecido que la carcinogénesis cervical se inicia por una infección con virus del papiloma humano de alto riesgo (hrHPV). La expresión de los oncogenes virales E6 y E7, que alteran las vías supresoras tumorales 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 surgió como una herramienta de evaluación primaria atractiva. Sin embargo, de acuerdo con un proceso de carcinogénesis de múltiples etapas, se requieren alteraciones adicionales en el genoma de la célula huésped para la progresión de una célula infectada por hrHPV hasta células cancerosas invasivas. Solo una pequeña proporción de mujeres infectadas con HPV de alto riesgo desarrollarán lesiones cervicales premalignas de alto grado (CIN 2/3) y, si no se trata, cáncer de cuello uterino. En la mayoría de las mujeres con lesiones cervicales premalignas, las lesiones retroceden espontáneamente. De las mujeres que participan en el cribado basado en la población, alrededor del 5-6% tienen una prueba positiva de hrHPV. Sin embargo, solo un máximo de 20% de ellas (1% de las mujeres participantes) tienen \geq CIN 2/3. Por lo tanto, el cribado primario mediante pruebas de hrHPV irá acompañado de un número sustancial de procedimientos de seguimiento redundantes y ansiedad innecesaria entre las mujeres, a menos que se puedan aplicar marcadores a los frotis cervicales que permitan la estratificación de mujeres positivas para hrHPV para el riesgo de \geq CIN 2/3 y \geq adenocarcinoma *in situ*.

50 Un desafío importante es reducir el porcentaje de mujeres positivas a la prueba de HPV a aquellas que tienen lesiones clínicamente significativas. Un modo es utilizar la citología como una prueba secundaria (llamada selección jerarquizada) para las mujeres positivas para hrHPV. Aún así, esto deja un número sustancial de mujeres positivas para hrHPV con citología normal (3,5% de las mujeres en la población de cribado), de las cuales todavía el 10% tiene o adquiere \geq CIN 3. Además, la citología no es una opción para las muestras cervico-vaginales automuestreadas que pueden tomarse en casa, ya que no son representativas del estado citológico del cuello uterino. Otro modo es utilizar la genotipificación de HPV16/18. Sin embargo, esto deja a las mujeres con tipos distintos de HPV16/18 que, aunque en menor medida, también corren riesgo de \geq CIN 2/3 y \geq adenocarcinoma *in situ*. Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas de selección 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*.

60 Teschendorff et al. (Genome Medicine, 4 (3): 1-14, 2003) muestran que la hipermetilación de *FAM19A4* se asocia con el riesgo de desarrollar cáncer invasivo de cuello uterino.

65 Wilting et al. (Mol. Cancer, 9 (1): 167, 2010) enseñan una mejora del método de diagnóstico de cáncer de cuello uterino positivo para HPV de alto grado mediante la determinación del estado de metilación de *hsa-miR124-2*.

Sumario de la invención

Los inventores ahora han encontrado un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV, como se reivindica.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la región reguladora 5' de *PRDM14*, la secuencia codificadora, la parte rica en CpG de la primera secuencia intrónica y las secuencias 3' no codificadoras transcritas. El inicio de la transcripción se indica en negrita, la secuencia de codificación está en mayúscula. Una secuencia promotora de 1.000 pb y el intrón 1, que contienen ambas secuencias ricas en CpG, están en minúsculas.

15 La Figura 2 muestra la región reguladora 5' de *FAM19A4*, la secuencia codificadora, la parte rica en CpG de la primera secuencia intrónica y las secuencias 3' no codificadoras transcritas. El inicio de la transcripción se indica en negrita, la secuencia de codificación está en mayúscula. Una secuencia promotora de 1.000 pb y el intrón 1, que contienen ambas secuencias ricas en CpG, están en minúsculas.

20 La Figura 3 muestra que la expresión de ARNm de *PRDM14* en células de cáncer de cuello uterino SiHa puede sobrerregularse tras el tratamiento con un inhibidor de metilación de ADN (DAC). El tratamiento de las células de cáncer de cuello de útero SiHa se realizó con el inhibidor de metilación 2'-desoxi-5'-azacitidina (5'-aza o DAC) a una concentración de 0,2 μ M y 5 μ M. Otros tratamientos fueron PBS y etanol (EtOH). Todos los tratamientos fueron por duplicado. Los controles son ARN de referencia humano y un control de -RT (sin transcriptasa inversa añadida a la mezcla de reacción de ADNc).

25 Figura 4. Efectos de la expresión ectópica de *PRDM14* en células SiHa, CaSki y 93VU147T. (A) El porcentaje de células GFP⁺ disminuye en las células transfectadas con *PRDM14*, en comparación con las células del vector vacío, 24, 48 y 72 horas después de la transfección. (B) El análisis por citometría de flujo de células marcadas doblemente con Anexina V y PI muestra un aumento tanto en las células apoptóticas tempranas (Anexina V⁺/PI⁻) como tardías (Anexina V⁺/PI⁺) en la población de células que expresan *PRDM14*.

30 Figura 5. Diagramas de dispersión de los niveles de *PRDM14* y *FAM19A4* medidos por PCR específica de metilación cuantitativa en muestras de tejido cervical. En los ejes y, se presentan los niveles de ADN metilado; en los ejes x, las muestras se agrupan para cada estadio de enfermedad e histotipo. El nivel de metilación de *PRDM14* y *FAM19A4* aumenta con la etapa de la enfermedad y se detecta en prácticamente todos los SCC y AdCA. Se indican diferencias significativas en los niveles de metilación entre categorías de la enfermedad.

35 Figura 6. Los niveles de metilación de *PRDM14* y *FAM19A4* en muestras de tejido de cabeza y cuello positivas para hrHPV (HNSCC: SCC de cabeza y cuello). Los niveles de metilación aumentan significativamente en los carcinomas en comparación con los controles.

40 Descripción detallada de la invención

45 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 inducidos por HPV, es decir, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas neuroendocrinos en órganos relevantes tales como el cuello uterino, la cavidad oral, la orofaringe, el ano, el recto, el pene, la vulva, la vagina, etc. Incluye especialmente carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinomas de células escamosas cervicales y adenocarcinomas de cuello uterino.

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

55 Los términos "lesión premaligna" y "lesión precursora" se refieren a una etapa en la evolución celular de múltiples etapas hasta cáncer con una posibilidad 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 regresará. La patente actual se refiere a un método, que puede predecir cáncer invasivo o una lesión precursora de alto grado del mismo.

60 El término "lesión cervical premaligna de alto grado" se refiere a una etapa en la evolución celular de múltiples etapas hacia el cáncer de cuello uterino con una probabilidad fuertemente aumentada de progresar a un carcinoma de cuello uterino. El término "capaz de hibridar específicamente con" se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de emparejar bases específicas con una secuencia complementaria de ácido nucleico y unirse a la misma para formar un dúplex de ácido nucleico.

65 El término "lesión avanzada de CIN3" se usa para una lesión de CIN3 histotipificada con una infección por hrHPV

precedente de vieja data que da como resultado significativamente más alteraciones en el número de copias del ADN. En consecuencia, esta subcategoría de lesiones de CIN3 representa una etapa más alta de la enfermedad con mayor riesgo de cáncer.

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

10 El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, la temperatura, la concentración salina, el pH, la concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácido nucleico objetivo. Los términos tal como se usan incluyen una referencia a las condiciones bajo las que una sonda o cebador se hibridará con su secuencia objetivo, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces sobre el valor base). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia objetivo complementaria se hibrida con una sonda o cebador perfectamente coincidente. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion Na, típicamente alrededor de 0,01 a 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, más de 50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como formamida. Ejemplos de condiciones de baja rigurosidad o "condiciones de astringencia reducida" incluyen la hibridación con una solución reguladora de 30% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 2x SSC a 40°C. Ejemplos de condiciones de alta rigurosidad incluyen la hibridación en 50% de formamida, NaCl 1 M, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0,1x SSC 0,1x a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., 1994.

35 El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros de nucleótidos (habitualmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y aril-fosfato, fosforotioato), o enlaces no fosforados (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 naturales o sintéticas de ADN de cadena doble y cadena sencilla y ARN de cadena doble y cadena sencilla con formas circulares, ramificadas o lineales y, opcionalmente, incluyendo dominios que pueden formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, estructuras de tallo y bucle y bucle-tallo-bucle).

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

55 El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena sencilla que reconocerá y formará un dúplex unido a hidrógeno con una secuencia complementaria en un análisis de secuencia de ácido nucleico objetivo o su derivado de ADNc.

60 La metilación del ADN es un proceso bioquímico que es importante para el desarrollo normal en organismos superiores. Implica la adición de un grupo metilo a la posición 5 del anillo de pirimidina citosina o el nitrógeno número 6 del anillo de purina adenina. La metilación del ADN en la posición 5 de la citosina tiene el efecto específico de reducir la expresión génica y se ha encontrado en cada vertebrado examinado. En los tejidos somáticos adultos, la metilación del ADN ocurre típicamente en un contexto del dinucleótido CpG.

65 Utilizando un cribado de metilación de ADN de todo el genoma ahora se ha encontrado que el gen que codifica la familia con similitud de secuencia 19 (similar a quimioquina (motivo C-C), miembro A4 (también denominado como *FAM19A4*; GenBank acceso No. NM 001005527.2) es dirigido por la metilación del ADN en los queratinocitos

primarios después de la expresión del oncogén viral (HPV16E6E7), y que la metilación del promotor de *FAM19A4* y una mayor metilación de la secuencia de *hsa-miR124-2* son determinantes importantes de la carcinogénesis inducida por el hr-HPV. Las secuencias genómicas y reguladoras de *FAM19A4* y la secuencia de *hsa-miR124-2* proporcionan por lo tanto valiosos marcadores para diagnosticar el cáncer de cuello uterino invasivo y las lesiones precursoras de alto grado de los mismos. Además, la presente invención es adecuada para diagnosticar cánceres invasivos asociados a hrHPV no cervicales y sus lesiones precursoras de alto grado.

El cáncer de cuello uterino se asocia casi exclusivamente con la infección por el virus del papiloma humano (HPV). Los virus del papiloma humano constituyen un grupo de más de 100 tipos de virus, identificados por variaciones en la secuencia de ADN. Los diversos HPV causan una variedad de enfermedades cutáneas y de la mucosa. Los HPV se clasifican ampliamente en tipos de bajo riesgo y alto riesgo, según 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 tipos de alto riesgo, tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 se asocian principalmente con lesiones epiteliales premalignas y malignas. Estos tipos de HPV de alto riesgo causan crecimientos que, por lo general, son planos y casi invisibles, en comparación con las verrugas causadas por tipos de bajo riesgo, por ejemplo, HPV-6 y HPV-11. Se ha encontrado que los tipos de HPV de alto riesgo causan carcinoma invasivo del cuello uterino, así como también carcinoma invasivo en otras partes del tracto anogenital y/o la región de la cabeza y el cuello. Por lo tanto, la presente invención no solo es adecuada para detectar cáncer invasivo de cuello uterino y etapas precursoras del mismo asociadas con la secuencia de *hsa-miR124-2* y/o *FAM19A4*, sino también otros cánceres invasivos y etapas precursoras correspondientes inducidas por el HPV, particularmente del tipo de alto riesgo. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la evaluación del riesgo de cualquier lesión premaligna de alto grado inducida por HPV o cáncer invasivo.

Las lesiones precursoras inducidas por HPV muy adecuadas y los cánceres invasivos en el contexto de la presente invención son lesiones precancerosas cervicales y cánceres invasivos de cuello uterino, pero también lesiones precursoras y cánceres invasivos inducidos por HPV de alto riesgo en otros tejidos tales como la cavidad oral, orofaringe, ano, recto, pene, vulva, vagina, etc.

Una célula de prueba puede ser una célula (pre)neoplásica, una célula cervical en proliferación, o cualquier otra célula en la que se va a detectar la presencia de una lesión precursora inducida por HPV con potencial invasivo y cáncer invasivo inducido por HPV asociado con la secuencia de *hsa-miR124-2* y/o *FAM19A4*.

El gen *FAM19A4*, que codifica una proteína secretada de 16 kDa, se identificó originalmente por secuenciación de una biblioteca de ADNc humanos (Strausberg et al., PNAS, 2002, 99 (26): 16899-903). Este gen es un miembro de la familia Tafa que se compone de cinco genes altamente homólogos que codifican pequeñas proteínas secretadas. Estas proteínas contienen residuos de cisteína conservados en posiciones fijas, y están relacionadas lejanamente con MIP-1alfa, un miembro de la familia CC-quimioquina. Las proteínas Tafa se expresan predominantemente en regiones específicas del cerebro, y se postula que funcionan como quimioquinas o neuroquinas específicas del cerebro, que actúan como reguladores de las células inmunes y nerviosas (Tom Tang et al., Genomics 2004, 83 (4): 727-34). Alternativamente se han observado variantes de transcrito empalmadas para este gen. No se ha descrito una relación con el cáncer.

Los presentes inventores han establecido ahora que la metilación de *FAM19A4* de regiones ricas en CpG, tales como el promotor y el primer intrón de ambos genes, es un evento frecuente en carcinomas de cuello uterino tanto de carcinoma de células escamosas, carcinoma adeno-escamoso, adenocarcinoma como de histotipos de carcinoma neuroendocrino y sus lesiones precursoras de alto grado. La función exacta de *FAM19A4* aún no se ha definido.

Lo más interesante es que los presentes inventores han demostrado que la hipermetilación del promotor de *FAM19A4* (y secuencias intrónicas) puede detectarse en muestras de raspado cervical y que esta característica es capaz de predecir la presencia de una lesión CIN de alto grado o carcinoma invasivo. Además, la metilación del promotor de *FAM19A4* podría detectarse en muestras cervico-vaginales recolectadas por automuestreo y se encontró que estaba asociada con la presencia de una lesión CIN de alto grado subyacente o cáncer invasivo de cuello uterino.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV, comprendiendo dicho método la detección de hipermetilación en la secuencia de *hsa-miR124-2* y el gen *FAM19A4* en una célula por lo que dicha hipermetilación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por HPV.

La célula de prueba del sujeto puede comprender una célula de una muestra de células de mucosa, tales como células cervicales, y también otros tejidos tales como cavidad oral, orofaringe, pene, vulva, ano, recto y otros tejidos en los que se va a detectar una lesión precursora o el cáncer asociado con el HPV. Todas estas muestras se pueden usar como muestra en un método de la presente invención. Preferiblemente, una muestra de las células de un paciente comprende células cervicales como células de prueba. Las células cervicales pueden, por ejemplo,

presentarse como un espécimen histológico o citológico. Las muestras citológicas comprenden frotis cervicales convencionales, así como preparaciones de capa delgada de muestras cervicales y muestras cervico-vaginales o vaginales recogidas por automuestreo.

5 Un método de la presente invención es particularmente adecuado para la detección de lesiones precancerosas de alto grado y cánceres invasivos asociados con la secuencia de *hsa-miR124-2* y *FAM19A4* que son inducidos por HPV de alto riesgo. Un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por HPV puede comprender medir la secuencia de *hsa-miR124-2* y el promotor de *FAM19A4* y el primer intrón.

10 La Figura 2 muestra la región promotora rica en CpG, parte de la primera secuencia intrónica rica en CpG del gen *FAM19A4*, así como la secuencia codificadora y la secuencia 3' no codificadora transcrita.

15 La detección de metilación se realiza en ácido nucleico, tal como ADN. Los reactivos que se usan son típicamente una sonda de ácido nucleico (ADN) o un cebador (PCR) o una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para la detección de la presencia de grupos metilo en el ADN de la célula de prueba.

20 El componente de la célula de prueba se puede detectar directamente en el lugar o se puede aislar de otros componentes celulares mediante métodos comunes conocidos por los expertos en la técnica antes de hacer contacto con el reactivo (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. 1995. 4ª edición, 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 volúmenes, segunda edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

25 Es deseable determinar directamente si el gen *FAM19A4* está hipermetilado. En particular, las áreas ricas en citosina denominadas "islas de CpG", que están situadas principalmente en las regiones reguladoras 5' de los genes, normalmente no están metiladas. El término "hipermetilación" incluye cualquier metilación de citosina en una posición que normalmente no está metilada en la secuencia del gen *FAM19A4* (por ejemplo, el promotor de *FAM19A4*, primer exón y primera secuencia intrónica, véase la Figura 2). La metilación del ADN puede detectarse mediante los siguientes ensayos actualmente utilizados en investigación científica:

30 • La PCR específica de metilación (MSP), que se basa en una reacción química de bisulfito de sodio con ADN que convierte citosinas no metiladas de dinucleótidos de CpG en uracilo o UpG, seguido por PCR tradicional. Sin embargo, las citosinas metiladas no se convertirán en este proceso, y los cebadores están diseñados para superponerse al sitio de interés de CpG, lo que permite determinar el estado de metilación como metilado o no metilado.

35 • Secuenciación completa del bisulfito del genoma, también conocida como Seq de BS, que es un análisis de todo el genoma de alto rendimiento de la metilación del ADN. Se basa en la conversión antes mencionada de ADN genómico con bisulfito de sodio, que luego se secuencía en una plataforma de secuenciación de próxima generación. Las secuencias obtenidas se vuelven a alinear con el genoma de referencia para determinar los estados de metilación de los dinucleótidos CpG con base en las faltas de correlación resultantes de la conversión de citosinas no metiladas en uracilo.

40 • El ensayo HELP, que se basa en la capacidad diferencial de las enzimas de restricción para reconocer y escindir sitios de ADN de CpG metilados y no metilados.

45 • Los ensayos ChIP en un chip, que se basan en la capacidad de los anticuerpos preparados comercialmente para unirse a las proteínas asociadas a la metilación del ADN como MeCP2.

50 • Escaneo genómico de puntos de referencia de restricción, un ensayo complicado y ahora raramente usado basado en el reconocimiento diferencial de enzimas de restricción de sitios CpG metilados y no metilados; el ensayo es similar en concepto al ensayo HELP.

55 • La inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP), análoga a la inmunoprecipitación de cromatina, se usa la inmunoprecipitación para aislar fragmentos de ADN metilados para su entrada en métodos de detección de ADN tales como microarreglos de ADN (MeDIP-chip) o secuenciación de ADN (MeDIP-seq).

60 • Pirosecuenciación de ADN tratado con bisulfito. Esta es la secuenciación de un amplicón hecha por un cebador directo normal pero un cebador inverso biotinilado para PCR del gen de elección. El Pirosecuenciador analiza entonces la muestra desnaturalizando el ADN y agregando un nucleótido a la vez a la mezcla de acuerdo con una secuencia dada por el usuario. Si hay una falta de coincidencia, se registra y se anota el porcentaje de ADN para el que está presente la falta de coincidencia. Esto le da al usuario un porcentaje de metilación por isla de CpG.

65 • Ensayo de rompimiento molecular ligero para la actividad de la adenina metiltransferasa de ADN: un ensayo que se basa en la especificidad de la enzima de restricción DpnI para sitios de GATC completamente metilados (metilación de adenina) en un oligonucleótido marcado con un fluoróforo y un atenuador. La adenina metiltransferasa metila el oligonucleótido convirtiéndolo en un sustrato para DpnI. El corte del oligonucleótido por DpnI da lugar a un aumento de fluorescencia.

• La transferencia Southern sensible a metilo es similar al ensayo HELP, aunque usa técnicas de transferencia Southern para investigar diferencias específicas de genes en la metilación usando digestiones de restricción. Esta

técnica se usa para evaluar la metilación local cerca del sitio de unión para la sonda.

La hipermetilación preferiblemente puede detectarse por tratamiento con endonucleasa de restricción del polinucleótido (gen) *FAM19A4* y análisis de transferencia Southern. Se puede utilizar cualquier endonucleasa de restricción que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento y que se inhibe cuando el C está 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. Los expertos en la técnica conocerán otras endonucleasas de restricción sensibles a la metilación.

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

Para los fines de la invención, la sonda de ácido nucleico específica para *FAM19A4* se puede usar para detectar la presencia del polinucleótido de *FAM19A4* (usando una sonda de ácido nucleico) en fluidos o tejidos biológicos. Los cebadores de oligonucleótidos basados en cualquier región de secuencia codificadora y región de secuencia reguladora en la secuencia de *FAM19A4* son útiles para amplificar ADN, por ejemplo, mediante PCR.

Cuando se utilizan cebadores de PCR, sondas de ácido nucleico o endonucleasas de restricción, se analiza la región reguladora 5', la primera secuencia intrónica y la secuencia codificadora de la secuencia de *FAM19A4* (como se especifica en la Figura 2).

Se puede usar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable del polinucleótido de *FAM19A4*. Las muestras preferidas para ensayar según los métodos de la invención incluyen muestras tales como raspados (cervicales o vaginales), lavados cervico-vaginales o hisopos, y/o biopsias (cervicales) y similares. Aunque el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente el sujeto es humano.

Los métodos de diagnóstico para la detección de trastornos incluyen métodos en los que se proporciona una muestra para prueba, cuya muestra comprende una preparación celular a partir de tejido cervical u otro tejido. Preferiblemente, tales muestras se proporcionan como frotis u otras muestras citológicas.

Una muestra de célula o tejido obtenida de un mamífero, preferiblemente un humano, se trata previamente adecuadamente para permitir el contacto entre el ADN celular de una célula de prueba comprendida en dicha muestra con un reactivo que detecta *FAM19A4* y detecta una alteración en la metilación del gen *FAM19A4* en comparación con el de una célula normal comparable. Las muestras pueden montarse en un soporte adecuado para permitir la observación de células individuales. Los ejemplos de materiales de soporte bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, poliuretano, opcionalmente provistos de capas para mejorar la adhesión celular y la inmovilización de la muestra, tales como capas de poli-L-lisina o silano. Los frotis o biopsias cervicales pueden prepararse, por ejemplo, como para la prueba de Papanicolaou (Pap) o cualquier modificación adecuada de la misma como conoce el experto en la técnica, y se pueden fijar mediante procedimientos que permitan el acceso adecuado del reactivo al componente objetivo. En ciertas realizaciones de la invención, las muestras citológicas se proporcionan como muestras de frotis convencionales o preparaciones de capa fina de células de cuello uterino o muestras de citología de base líquida o cualquier otro tipo de preparación conocida por los expertos en la técnica. Si se requiere almacenamiento, los procedimientos de rutina usan formalina tamponada para la fijación seguida de la inclusión en parafina, lo que proporciona una infraestructura tisular bien conservada. Para permitir la tinción inmunohistoquímica o inmunofluorescente, debe recuperarse o desenmascararse la antigenicidad del material de muestra. Un método para recuperar la antigenicidad de las proteínas entrecruzadas con formaldehído implica el tratamiento de la muestra con enzimas proteolíticas. Este método da como resultado una digestión (parcial) del material y se puede acceder a meros fragmentos de las proteínas originales mediante anticuerpos.

En una realización de un método de la invención, se detecta una mayor metilación del promotor de *FAM19A4* en la célula de prueba en comparación con la célula normal comparable.

Se prefiere medir la metilación incrementada del promotor de *FAM19A4* y secuencias de intrón en combinación con una metilación incrementada de la secuencia de *hsa-miR124-2* debido a una sensibilidad incrementada.

La secuencia de *hsa-miR124* madura (número de acceso MIMAT0000422) está codificada por 3 secuencias prematuras individuales de microARN ubicadas en tres regiones genómicas diferentes, es decir, *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 miARN, miRBase (www.mirbase.org), Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad de Manchester).

El uso de un ensayo de hipermetilación de *hsa-miR124* para los métodos de detección o predicción de la aparición de lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV en una

(auto)muestra de un frotis cervical se ha descrito en el documento WO 2013/039394 y Wilting et al. (Mol. Cancer 2010: 9, 167).

La presente invención también proporciona un kit de partes como se define en las reivindicaciones, para usar en un método de detección de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres invasivos inducidos por HPV asociados con la secuencia de *hsa-miR124-2* y *FAM19A4* en células de prueba de un sujeto. Tal kit puede comprender adecuadamente un cepillo o una espátula para tomar un raspado (cervical) junto con un recipiente lleno con medio de recolección para recoger células de prueba. Alternativamente, se incluirá un dispositivo de muestreo que consiste en una jeringa de irrigación, un catéter femenino de orina desechable y un recipiente con fluido de irrigación para recoger las células del cuello uterino mediante lavado cervico-vaginal. Un kit de acuerdo con la presente invención puede comprender cebadores y sondas para la detección de la metilación de la secuencia de *hsa-miR124-2* y la metilación del promotor de *FAM19A4*.

Un kit de partes de acuerdo con la invención comprende medios para la detección de la metilación del promotor de *FAM19A4*, tales como enzimas de restricción sensibles a la metilación, o sondas o cebadores capaces de hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la Fig. 2. Por supuesto, como el ensayo también pretende detectar la metilación de *hsa-miR124-2*, se incluyen cebadores y sondas para la detección de la metilación en *hsa-miR-124-2*.

En el kit de la invención, los medios para la detección de la metilación de secuencia de *hsa-miR124-2* y la metilación de promotor de *FAM19A4* se combinan con medios para la detección de infección por HPV, preferiblemente para la detección de infección por HPV del tipo de alto riesgo. Dichos medios pueden comprender cebadores o sondas específicos de HPV, marcadores de proteína para infección por HPV o incluso marcadores sustitutos de infección por HPV como se conocen en la técnica.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Descubrimiento de PRDM14 y FAM19A4 como objetivos de metilación en la transformación inducida por HPV

Se realizó un análisis exhaustivo de los cambios en la metilación del ADN genómico asociado con la transformación *in vitro* inducida por HPV (expresión del oncogén viral e inmortalización posterior de queratinocitos primarios) mediante cariotipificación digital específica de metilación (MSDK) (Hu et al., 2005). MSDK es un método basado en secuencias que se basa en la escisión del ADN genómico con una enzima de restricción sensible a la metilación (Ascl), lo que permite un perfil de metilación exhaustivo imparcial. En este método, se concatenan las etiquetas de secuencia de 21 pb derivadas de ubicaciones específicas en el genoma y se analizan mediante secuenciación de alto rendimiento. Se determinaron los cambios en la metilación del ADN de todo el genoma como resultado de la expresión de E6 y E7 de HPV16, mediante la comparación de patrones de metilación de queratinocitos primarios de prepucio no transducidos (pase 5) con sus contrapartes de paso temprano transducidas con HPV16E6E7 (pase 7). Además, la metilación alterada asociada con la adquisición de inmortalidad, un evento crítico, denominado punto de no retorno, en el proceso de transformación, se analizó mediante la inclusión de derivados inmortales transducidos de HPV16E6E7 (pase 30).

Mediante este enfoque, se identificaron PRDM14 y FAM19A4 como nuevos objetivos de metilación en la transformación inducida por HPV, cuya metilación se hizo particularmente evidente en los transductantes inmortales, pero en el caso de PRDM14 también se observó con poca frecuencia en las células de pase temprano.

La metilación de la región promotora de PRDM14 y FAM19A4 se verificó mediante PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP) en una serie independiente de líneas celulares de queratinocitos transfectadas con HPV. Los cebadores y la sonda para qMSP se enumeran en la Tabla 1. La metilación del promotor de PRDM14 se detectó en dos líneas celulares de queratinocitos HPV16 (FK16A, FK16B) y dos HPV18 (FK18A, FK18B) inmortalizadas. Además, se detectaron altos niveles de metilación de PRDM14 en tres líneas celulares de cáncer cervical positivas para HPV (SiHa, HeLa y CaSki), así como una línea celular de cáncer de cabeza y cuello positiva para HPV16 (93VU147T). Tres aislados de queratinocitos primarios negativos para HPV (HFK) evaluaron la metilación negativa de PRDM14 (véase la Tabla 2).

El tratamiento de células de cáncer cervical SiHa con el inhibidor de metilación 5-aza-2 desoxicitidina (DAC) dio como resultado una sobrerregulación de la expresión de ARNm de PRDM14, lo que indica que la metilación del promotor de PRDM14 regula su expresión génica en células de cáncer de cuello uterino (Figura 2).

De forma similar a PRDM14, la metilación del promotor de *FAM19A4* se detectó en dos líneas celulares de queratinocitos inmortalizadas HPV16 (FK16A, FK16B) y dos HPV18 (FK18A, FK18B), así como líneas celulares de cáncer cervical (SiHa, HeLa y CaSki) y de cabeza y cuello (93VU147T), esta última muestra los niveles más altos de metilación de *FAM19A4*. Tres aislados de queratinocitos primarios negativos para HPV (HFK) evaluaron negativamente la metilación de *FAM19A4* (véase la Tabla 2).

Ejemplo 2: Papel funcional de PRDM14 en carcinogénesis cervical

Para determinar el papel funcional potencial de PRDM14 en carcinogénesis cervical, se transfectaron células de las líneas celulares SiHa y CaSki de cáncer de cuello uterino que contienen HPV16 con un vector de expresión de PRDM14 o un vector de control vacío (GFP). La expresión ectópica de PRDM14 en transfectantes PRDM14 SiHa y CaSki se confirmó mediante RT-PCR. Tras la transfección, se midió la inducción de apoptosis celular mediante análisis FACS de células teñidas por anexina V y yoduro de propidio (PI). En comparación con los transfectantes de control del vector vacío y células parentales no transfectadas, fue evidente una fuerte inducción de apoptosis en células que sobreexpresan PRDM14 (Figura 4). La fuerte inducción de apoptosis tras la expresión ectópica de PRDM14 en células de cáncer de cuello uterino sugiere un papel supresor tumoral en la carcinogénesis cervical. En analogía con los resultados de la línea celular de cáncer de cuello uterino, la expresión ectópica de PRDM14 en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello positivas para HPV16 también dio como resultado la inducción de apoptosis (Figura 4). Por lo tanto, estos datos sugieren que PRDM14 tiene un papel supresor tumoral en cánceres de cabeza y cuello positivos para HPV. Tras la introducción de PRDM14 en células de riñón embrionario humano (HEK) no se observó inducción de apoptosis, lo que indica que la inducción de apoptosis observada en líneas celulares de cáncer positivas para HPV no resulta de un efecto no específico de la construcción utilizada para la transfección.

Ejemplo 3: la metilación del promotor de PRDM14 y FAM19A4 son eventos comunes en lesiones de CIN de alto grado, carcinomas de células escamosas cervicales, carcinomas adenoescamosos, adenocarcinomas y carcinomas neuroendocrinos

A continuación, se analizó la metilación del promotor de PRDM14 y FAM19A4 en muestras de tejido cervical mediante PCR específica de metilación cuantitativa (qMSP) como se describe en el Ejemplo 1. Se eligió el gen de mantenimiento de β -actina (ACTB) como referencia para la medición de entrada de ADN total. Para todas las muestras, la cantidad de ADN metilado medido se dividió por la cantidad de ACTB, y las muestras con relaciones superiores a un límite predefinido (por ejemplo, la relación media de los controles normales (excluyendo los valores extremos) + 2,58 veces la desviación estándar) se clasificaron como positivas.

Se encontró que la metilación del promotor PRDM14 fue detectable en el 11% (2/18) de las muestras de control cervical normal, 33% (13/40) de las lesiones CIN1, 55% (23/42) de las lesiones CIN3 y 100% (42 / 42) de carcinomas de células escamosas cervicales (SCC) (Tabla 3). Los niveles de metilación de PRDM14 detectados en las diferentes etapas de la enfermedad se grafican en la Figura 5.

Junto a los carcinomas de células escamosas cervicales también se analizó la metilación del promotor de PRDM14 en adenocarcinomas cervicales. Los adenocarcinomas, que constituyen hasta el 20% de los carcinomas de cuello uterino, son de particular interés ya que la incidencia del adenocarcinoma cervical se ha mantenido igual o incluso aumentado en los países con un programa nacional de detección de cáncer cervical. Esto indica que el adenocarcinoma cervical y su lesión precursora glandular, es decir, el adenocarcinoma in situ (ACIS), con frecuencia se pasan por alto el cribado basado en citología. Con base en estudios genéticos y epigenéticos comparativos entre carcinomas de células escamosas cervicales y adenocarcinomas cervicales, se ha descubierto que ambos histotipos tumorales se desarrollan por vías carcinogénicas distintas (Dong et al., 2001, Kang et al., 2005, Wilting et al., 2006, Henken et al., 2007). En consecuencia, la mayoría de los biomarcadores que permiten la detección del carcinoma de células escamosas cervicales no detectan necesariamente el adenocarcinoma cervical.

Los marcadores de metilación tales como CADM1, CDH1, DAPK1 y SOX17 son más específicos para los carcinomas de células escamosas, mientras que los marcadores tales como RASSF1A, APC, DKK3 y SFRP2 están predominantemente metilados en adenocarcinomas (Overmeer et al., 2008, Kang et al., 2005, Dong et al., 2001, van der Meide et al., 2011).

Curiosamente, la metilación del promotor de PRDM14 pareció ser una excepción ya que, a diferencia de la mayoría de los marcadores conocidos, detectó adenocarcinomas cervicales con una frecuencia similar a los carcinomas de células escamosas; es decir, el 97% (30/31) de los adenocarcinomas mostraron la metilación del promotor de PRDM14 y el 57% (12/21) adenocarcinoma in situ probó metilación positiva para PRDM14 (Figura 5, Tabla 3). Se obtuvieron resultados similares para carcinomas adenoescamosos cervicales y carcinomas neuroendocrinos.

Por lo tanto, la metilación del promotor de PRDM14 parece ser un marcador de metilación universal para todos los histotipos de carcinoma cervical.

El análisis de la metilación del promotor de FAM19A4 reveló metilación positiva en un 19% (3/16) de las muestras de control cervicales normales, 12% (3/26) de lesiones de CIN1, 43% (18/42) de lesiones de CIN3 y 100% (42/42) de carcinomas de células escamosas cervicales (SCC), 52% (11/21) de adenocarcinoma in situ (ACIS) y 92% (24/26) de adenocarcinomas (AdCA) (Tabla 3). Los niveles de metilación de FAM19A4 detectados en las diferentes etapas de la enfermedad y los histotipos se grafican en la Figura 5. Por lo tanto, la metilación del promotor de FAM19A4 también representa un marcador de metilación universal para todos los histotipos de carcinoma cervical.

Ejemplo 4 Detección de metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4* en raspados cervicales positivos para hrHPV

5 Usando un diseño de control de casos de mujeres que participan en un cribado con base en la población, se estudiaron los raspados cervicales de mujeres positivas para hrHPV en los que se diagnosticó \geq CIN 2 (incluidos 2 carcinomas) (es decir, casos) frente a mujeres positivas para hrHPV en las que se diagnosticó CIN1 máximo (es decir, controles). Se recogieron los raspados cervicales de estas mujeres en un medio de conservación en el que los ácidos nucleicos están bien conservados.

10 La metilación de *PRDM14* se detectó en el 23% (8/35) de las mujeres de control positivas para hrHPV con citología normal y 74% (17/23) de mujeres con \geq CIN2. Se detectó metilación de *FAM19A4* en 3% (1/35) de mujeres con control positivas para hrHPV con citología normal y 52% (12/23) de mujeres con \geq CIN 2. En una serie mayor de 200 raspados cervicales consecutivos positivos para hrHPV recogidos durante el ensayo prospectivo de cribado con base en la población POBASCAM (Rijkaart et al., Lancet Oncology 2012), un análisis de validación posterior reveló que *FAM19A* detecta más > 80% de las mujeres con \geq CIN3 en un umbral del ensayo que da lugar a una especificidad del 50%. En un umbral que corresponde a una tasa de especificidad del 70%, se detecta el 70% de las mujeres con \geq CIN3.

20 Estos datos indican que tanto el análisis de metilación de *PRDM14* como de *FAM19A4* permiten la detección de enfermedad cervical subyacente (CIN2 +) en raspados cervicales positivos para hrHPV y de ese modo proporcionan marcadores prometedores de selección de detección cervical mediante pruebas de HPV primaria.

25 Ejemplo 5: Análisis de metilación de *FAM19A4* en raspados cervicales de mujeres con NIC3 asociadas a una infección por HPV a corto y largo plazo

30 En estudios previos, se compararon las lesiones de CIN3 de mujeres con infección por HPV previa de corta duración (<5 años) con lesiones de CIN3 en mujeres con una infección por HPV previa de larga duración (\geq 5 años) con respecto a las alteraciones en el número de copias de ADN (Bierkens et al., Int J Cancer 2012: 131 (4): E579-85). La duración de las infecciones por hrHPV anteriores sirvió como un sustituto para la edad de la lesión según la cual a la lesión de CIN3 se le puede asignar un estadio de enfermedad respectivamente más bajo y más alto. El hecho de que se detectaron significativamente más alteraciones en el número de copias de ADN en las lesiones de CIN3 con una infección por hrHPV previa de larga duración, confirma la suposición de que esta categoría representa un estadio más avanzado de la enfermedad, las denominadas lesiones de CIN3 avanzadas, con mayor riesgo de cáncer.

35 Para determinar si el análisis de metilación de *FAM19A4* puede detectar estas lesiones avanzadas de CIN3, se analizaron los raspados cervicales de 19 mujeres con CIN3 y una infección por hrHPV de corta duración y 29 mujeres con CIN3 y una infección por HPV de larga duración. Lo más interesante es que todos los raspados (29/29; 100%) de mujeres con lesiones de CIN3 avanzadas (infección por hrHPV precedente de larga duración) se detectaron mediante metilación de *FAM19A4*, frente al 42% (8/19) de raspados de mujeres con lesiones de CIN3 asociadas con una infección por hrHPV de corta duración, las llamadas lesiones tempranas de CIN3. Un resultado de prueba positiva de metilación se basó en los umbrales del ensayo que dan lugar a una especificidad del 70%. Esta prevalencia notablemente alta en mujeres con lesiones avanzadas sugiere que la prueba de metilación de *FAM19A4* detecta a todas las mujeres con lesiones avanzadas de CIN3 que necesitan derivación inmediata para colposcopia.

Ejemplo 6: metilación del promotor de *FAM19A4* en raspados cervicales de pacientes con cáncer

50 Se analizaron en total 60 raspados cervicales de pacientes con carcinomas de cuello uterino para la metilación de *FAM19A4*. Estos incluyeron 10 adenocarcinomas, 2 adenocarcinomas in situ, 2 carcinomas adenoescamosos, 43 carcinomas de células escamosas y 3 carcinomas no diferenciados. Todos los carcinomas, excepto 1 adenocarcinoma, dieron positivo para la metilación de *FAM19A4* (especificidad del 70%). Además de los raspados de pacientes con cáncer de cuello uterino, también se encontró que un subconjunto de raspados de mujeres con cáncer endometrial fue positivo para metilación de *FAM19A4*. Lo más interesante es que la serie completa de raspados derivados de pacientes con cáncer resultó positiva para una combinación de *FAM19A4* y metilación de *hsa-miR124-2* (Wilting et al., Mol Cancer 2010: 9, 167).

60 Por lo tanto, las pruebas combinadas para la metilación de *FAM19A4* y *hsa-miR124-2* en raspados cervicales permiten la detección de todos los cánceres (100%) de origen cervical y endometrial.

Ejemplo 7: metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4* en muestras automuestreadas

65 Posteriormente se analizaron las muestras cervico-vaginales automuestreadas recogidas usando un VivaBrush (Rovers Medical Devices, Oss, Los Países Bajos) o un filtro Delphi (Delphi BioScience BV, Scherpenzeel, Los Países Bajos) durante el curso de un estudio prospectivo, en el que se enviaron un total de 45.000 paquetes de

5 automuestreo a mujeres que, incluso después de un segundo recordatorio, no respondieron a la invitación para un examen cervical regular (Véase www.trialregister.nl, Ensayo No. NTR962 (ensayo PROHTECT)). El ofrecimiento de automuestreo para pruebas de hrHPV a las no asistentes mostró volver a atraer hasta el 30% de estas mujeres al programa de detección (Gök et al., *BMJ* 2010; 340: c1040). Las muestras autorrecolectadas son equivalentes a las tomadas por un médico con respecto a las pruebas de HPV (Brink et al., *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2518-23). La prueba de hrHPV en las automuestras produce al menos tanto como \geq lesiones de CIN2 en esta población como se encuentra por cribado regular en una población combinada de mujeres que responden (Bais et al., *Int J Cancer*: 2007, 120: 1505-1510; Gök et al., *BMJ* 2010; 340: c1040). Sin embargo, también para el automuestreo de HPV existe la necesidad de herramientas de selección jerarquizada para estratificar a las mujeres positivas para hrHPV en aquellas con y sin \geq CIN 2/3 y \geq adenocarcinoma in situ. Mientras que la citología convencional no se puede realizar confiablemente en especímenes cervicovaginales autorrecolectados (Brink et al., *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2518-23), el análisis de metilación del ADN se puede aplicar a los lavados cervicovaginales autorrecolectados (Eijsink et al., *Gynecol Oncol* 2011; 120: 280-3). Es importante destacar que los presentes resultados muestran que los marcadores de metilación *FAM19A4* y *PRDM14* permiten la detección de CIN2 + subyacente no solo cuando se aplica a muestras de lavado cervicovaginal autorrecolectadas, sino también a muestras por cepillo vaginal autorrecolectadas. Este último es un tipo de muestra en el que los marcadores conocidos previos a menudo se realizan con baja sensibilidad clínica. En consecuencia, los marcadores *PRDM14* y *FAM19A4* se pueden considerar marcadores de pandetección que funcionan igual en frotis cervicales tomados por el médico, automuestras basadas en lavado y automuestras basadas en cepillos.

20 Una serie de 177 muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas de mujeres positivas para hrHPV sin evidencia de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento (es decir, citología normal/HPV- o histología CIN0/CIN1) así como 74 muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas de mujeres positivas para hrHPV con \geq CIN3 (68 CIN3, 4 SCC, 1 ACIS, 1 carcinoma de células adenoescamosas probados en 36 meses) se analizaron mediante qMSP para la metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4*. *FAM19A4* combinado o no con el análisis de metilación de *PRDM14* alcanzó una sensibilidad del 70% para \geq CIN3 con una especificidad del 70%. Hasta ahora, la metilación de *FAM19A4* es sorprendentemente el único marcador de metilación que predice en muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas una lesión \geq CIN3 subyacente en mujeres positivas para hrHPV con sensibilidad aceptable ($>$ 60%). Se obtuvieron tasas de sensibilidad mucho más bajas en muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas con otros marcadores de metilación o combinaciones de marcadores. Dado que tal rendimiento superior no se observa en los raspados convencionales o las muestras de lavado cervicovaginal, este hallazgo es inesperado.

35 Además, una serie de 350 muestras de lavado cervicovaginal autorrecolectadas de mujeres positivas para hrHPV, incluyendo 272 mujeres positivas para hrHPV sin evidencia de enfermedad clínicamente significativa en el seguimiento (es decir, citología normal/HPV- o histología CIN0/CIN1) así como 78 muestras de lavado cervicovaginal de mujeres positivas para hrHPV con \geq CIN3, se analizó para metilación de *PRDM14* y *FAM19A4*. *FAM19A4*, combinado o no con el análisis de metilación de *PRDM14*, reveló una sensibilidad del 70% para \geq CIN3 con una especificidad del 70%. Esto confirma una función de pandetección de *FAM19A4* combinada o no con la metilación de *PRDM14* u otros marcadores de metilación en diversos tipos de muestras, incluidos los raspados cervicales y las muestras de cepillado y lavado vaginal autorrecolectadas (cervico).

40 En estudios posteriores se determinó si otros marcadores de metilación distintos de *PRDM14* pueden ser complementarios a *FAM19A4* para la detección de \geq CIN3 en muestras de lavado y cepillado vaginal autorrecolectadas. A tasas de especificidad por debajo del 70% (60% y 50%), se encontró que el marcador de metilación *hsa-miR124-2* (Wilting et al., *Mol. Cancer* 2010; 9, 167) tiene un valor aditivo que aumenta la sensibilidad en comparación con las pruebas para *FAM19A4* solamente.

50 Estos datos muestran que el análisis de metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4* en materiales automuestreados obtenidos tanto de muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas como de muestras de lavado cervicovaginal autorrecolectadas es muy factible y mejorará la detección de enfermedad cervical subyacente de alto grado. *FAM19A4* en particular produce altas tasas de sensibilidad y especificidad (70% frente a 70%), excediendo los de otros marcadores de metilación o genotipificación de HPV16/18, tanto en muestras de cepillo vaginal autorrecolectadas como en muestras de lavado cervicovaginal autorrecolectadas. Se demostró que un análisis combinado de *FAM19A4* y *hsa-miR124-2* era superior a las tasas de especificidad de 50% y 60%, en comparación con *FAM19A4* solamente.

Ejemplo 8: análisis de metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4* en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello positivas para hrHPV, carcinomas de vulva y lesiones precursoras y carcinomas de ano

60 Para determinar si la metilación del promotor de *PRDM14* y *FAM19A4* también es detectable en carcinomas distintos de cánceres de cuello uterino asociados con hrHPV, se analizaron 20 carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello positivas para hrHPV (es decir orofaríngeo) (HNSCC) y 2 muestras normales de mucosa oral por qMSP. Ambos niveles de metilación de *PRDM14* y *FAM19A4* se incrementaron significativamente ($p < 0,05$) en HNSCC comparado con muestras de mucosa normales de cabeza y cuello (Figura 6). De hecho, en todos los HNSCC (20/20) los niveles de metilación de *PRDM14* aumentaron en comparación con los controles. En 90% (18/20) de HNSCC se incrementaron los niveles de metilación de *FAM19A4*, en comparación con los controles.

Además, se probaron 3 carcinomas de vulva positivos para HPV, 4 lesiones precancerosas de vulva (VIN3) y 3 carcinomas de ano positivos para HPV para metilación de PRDM14 y *FAM19A4*. Todas las 11 lesiones revelaron altos niveles de metilación de PRDM14 y todas las lesiones menos 1VIN3 mostraron altos niveles de metilación de *FAM19A4*, similar a las lesiones cervicales.

5

Estos datos indican que las lesiones (pre) cancerosas positivas para hrHPV no cervicales, que incluyen las de la región de la cabeza y el cuello, la vulva y el ano, pueden detectarse por metilación de *FAM19A4* y/o PRDM14.

10

Tabla 1: Secuencias de cebador y sonda (5'-3') utilizadas para análisis cuantitativo por MSP de PRDM14 y FAM19A4

	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
PRDM14	TTATTAGCGGGTTAGACGTCGTTT	CGTCCCGAAATCGAACCC	CTTACTCTCCGCTCCCAATTCC AAAAATCC
FAM19A4	AGTCGGGCGGTTCCGGTTA	CCAAAAACGACGCGCAACTA	CCCAACTAACGCGCTAA

Tabla 2: Resumen de los resultados de qMSP de PRDM14 y *FAM19A4* en queratinocitos primarios, queratinocitos transfectados con HPV16 y HPV18 (pases temprano y tardío de células inmortalizadas FK16A, FK16B, FK18A y FK18B) y líneas celulares de cáncer de cuello uterino positivas para hrHPV

		PRDM14 qMSP	<i>FAM19A4</i> qMSP
Queratinocitos primarios	HFK1	-	-
	HFK2	-	-
	HFK3	-	-
Queratinocitos inmortalizados con HPV16 y 18	FK16A	+	+
	FK16B	+	+
	FK18A	+	+
	FK18B	+	+
Líneas celulares de cáncer cervical	SiHa	++	++
	HeLa	++	++
	CaSki	++	++
Líneas celulares de cancer de cabeza y cuello	93VU1 47T	++	++
-: negativo, +: positivo, ++: fuertemente positivo			

5 Tabla 3: Porcentaje de muestras de tejido cervical positivas para metilación de PRDM14 y *FAM19A4* según lo determinado por qMSP

	PRDM14	<i>FAM19A4</i>
Normal	11% (2/18)	19% (3/16)
CIN1	33% (13/40)	12% (3/26)
CIN3	55% (23/42)	43% (18/42)
SCC	100% (42/42)	100% (42/42)
ACIS	57% (12/21)	52% (11/21)
AdCA	97% (30/31)	92% (24/26)
CIN: neoplasia intraepitelial cervical CCE: carcinoma de células escamosas ACIS: adenocarcinoma <i>in situ</i> AdCA: adenocarcinoma		

Listado de secuencias

10 <110> Self-screen B.V.

<120> PRDM14 y *FAM19A4*, marcadores de diagnóstico molecular para cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras de alto grado

15 <130> P99544PC00

<150> EP 12188377.1

<151> 2012-10-12

20 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

25 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 1

ttattagcgg gtttagcgtc gttt 24

35 <210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> cebador

5 <400> 2
 cgtcccgaaa tcgaaccc 18

10 <210> 3
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador

15 <400> 3
 agtcgggctg ttcggta 18

20 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador

25 <400> 4
 ccaaaaacga cgcgcaacta 20

30 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> sonda

35 <400> 5
 ctactctcc gctccaatt cgaaaaatcc 30

40 <210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> sonda

50 <400> 6
 cccaactaac gcgctaa 17

55 <210> 7
 <211> 2443
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <400> 7

ES 2 664 923 T3

cccgccagct ttagggactc tggcggcgtc tcttagccgg gtagatgttc ctcccttccc	60
tctctcttcc aagccgctgc caggccgggg gtgaggctgc acctcagtct tcagccccga	120
aggccgcgcc cggggcgggt cgctcccat tcagctaaga ggaagcagcg gccggggggc	180
aggcgaggaa cctgtcccgg ctcacccggc aagactgctt tccccacc ctcggcgctt	240
ctttctgtga atgtgaatgg aactaagcgt tcctttctct ccctcaatgg ccggcgagga	300
gaattcaaat gcggtctttg ggcgctcggg atgggtctgg accttggttt tcagagcctg	360
cgcgccaag gtcgctagcc tttcccgaag gaagtgcag ctgcccgggc gcgggaggcc	420
catcctcggg cgtttaaac cacttaagga ataaaagccc ccgagagagc aaaacgacca	480
cccgaacct cggaagcgtc gggggtgccg ggcccaacgc tcccacgtgt cactgccggg	540
gactcgcgag gcgaagcttc ccagcgctca aggcgctccc gcctcgtccc caggtatcag	600
gaacagacac ccaccaggtc caccagcggg tcagacgccg ccttcgggca ggctgggatc	660
ttccgaactg ggagcggaga gtaaggggct cgaccccggg acgcgagtcc ggccttctgg	720
actccggttc aggtgtgtg tgcgcgcgga ggggcttacc tgggggccct gggtagcaca	780
cgtgttcggg tttttctcc ccgactccgc acgcctggag cggcaatact gcctgcccta	840
gaaggccagc ggcgagtgt cgcactagg gtcccaggga gggtttgaa aactgatgag	900
ttaagtgagc gacccaggg gacagagggc gagtgcagag tcggccaatg gctgcggtgg	960

ES 2 664 923 T3

gcggggagaa gacgacgcgg ggatctgcgt gggccgggtc aattccctac cctcgacctg 1020
 tcgatgcccc gcggccccgc ccgccctctt aagcctggct cagccctcag ggcccccccg 1080
 aagtctaccg agccccgagt gcctaccgag cccgagtgcc cccgcagcgt ccaggaggcg 1140
 cccgctccgc ggtggcgctc ttggagggtg tgcggaggt aggcacggga caggacgcgc 1200
 ctggggcccc gggcggtggt ctccagggc cgttggggag ggcggcagca ctogctggcg 1260
 cagttcgttt tggatggtcg ttctgcctc tcgggggctt tgaatccca gttgcagatc 1320
 cctgaggtcg gaggaggcta ggagaaggc gcctttggag gatcgggagg agacggggcg 1380
 ctgcctgtgt cgtggctgac ctcttctcct gacccctgt tctttaattt ctgagtcatg 1440
 accctgcttg gttttcttat tgggctcatt gatctcaaga cccgccggcc ctgaaggggc 1500
 ttcatctctc agcctcgggt aacttgctgc ctgtctatta aaacgccatc ctttcccgcc 1560
 ggtgcggggg cgggaggact ggcagtcgcc gaggtcttc gctcccacct ggccagggct 1620
 cgtccacgcg gctcccagg ggctaccca ggcaccaata gtctggtag aatgattgga 1680
 gtttccgagg aaccgggga atgtggcga cgtgcccg gcgggaaaag aggttcaggc 1740
 ggcgcatcct agggcagcca aaagtggcgc gccctcccc tcggggcagt caggaccgcc 1800
 aggacccgcg gggtcacacc gctgggcccag agcaggtcgc ggggtccctg gacctgcccg 1860
 ggggctctgg gagcgcgtct ccatctgcgc ggtgacacc aggtcctcg gctcttccct 1920
 cccagccgag ggcccaggag cgcctggagc tgcgcttg tccattgccc tccgaccgcc 1980
 tgcgctcggc tcccggccca gccccgaggt tggcagggcc ccgcggtcc cacagacct 2040
 accaacgagt tttgtaggac tgagaagaag gaaggaaag gaacttcaat gggttttgca 2100
 ggaaccgggt tgggggccga aagcggagag cgggtgtggg aaggcggccg ggcttaggga 2160
 aggggtgctt ggagaggaa ggggaaggca acactaacc ggaatttaga gtagggcagg 2220
 atccccgag atttccgttt ggggcttttt tgtgtttgct tctattgctg tttttctggt 2280
 ttgtcttaat tgtgggagcg ggctggcggg atcggactgg gggcgtttat cctgttccct 2340
 tggatctggg gctggctggg gtggaggagg ctggtgggga ggcgcgggtc ggaccccggg 2400
 aagctccgc gcggtgtcct cagcggcgcc cgttttctg cag 2443

<210> 8
 <211> 2166
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 8

10 agccgccgag cgtgcggtcc cgggatggt ctacccccgc caagtgaggc cgtgcctcag 60
 gacaaggtgt gctacccgcc ggagagcagc ccgcagaacc tggcccgta ctacacgct 120
 ttcccgctct atggacacta cagaaacagc ctggccaccg tggaggaaga cttccaacct 180

ES 2 664 923 T3

ttccggcagc tggaggccgc agcgtctgct gcccccgcca tgccccctt ccccttccgg 240
 atggcgccctc ccttgctgag cccgggtctg ggccacaga gggagcctct ctacgatctg 300
 ccctggtaca gcaagctgcc accgtggtac ccaattcccc acgtccccag ggaagtgccg 360
 cccttctga gcagcagcca cgagtacgcy ggtgccagca gtgaagatct gggccaccaa 420
 atcattggtg gcgacaacga gagtggcccg tgttgaggac ctgacacttt aattccaccg 480
 ccccctgcyg atgcttctct gttacctgag gggctgagga cctcccagtt attaccttgc 540
 tcaccagca agcagtcaga ggatggtccc aaacctcca accaagaag gaaagtcctt 600
 gctcggttcc agttcacgga ggaggacctg cacttcgttc tgtacggggt cactcccagc 660
 ctggagcacc cagccagcct gcaccatgcy atttcaggcc tcctggtccc cccagacagc 720
 tctggatctg attctcttcc tcaaactctg gataaagact cccttcaact tccagaaggt 780
 ctatgcctca tgcagacggt gtttggtgaa gtcccacatt ttggtgtgtt ctgcagtagt 840
 tttatcgcca aaggagtcag gtttgggccc tttcaaggta aagtggtaa tgccagtgaa 900
 gtgaagacct acggagacaa ttctgtgatg tgggagatct ttgaagatgg tcatttgagc 960
 cactttatag atggaaaagg aggtacgggg aactggatgt cctatgtcaa ctgtgcccgc 1020
 ttcccgaagg agcagaacct agttgctgtg cagtgtcaag ggcatatatt ttatgagagc 1080
 tgcaaaagaga tccatcagaa ccaagagctc cttgtgtggt atggagactg ctatgagaaa 1140
 tttctggata ttctgtgag ccttcaggtc acagagccgg ggaagcagcc atctgggccc 1200
 tctgaagagt ctgcagaagg ctacagatgt gaaagatgtg ggaaggtatt tacctacaaa 1260
 tattacagag ataagcacct caagtacacc ccctgtgtgg acaagggcga taggaaattt 1320
 ccctgttctc tctgcaaacg atcctttgag aagcgggacc ggcttcggat ccacattctt 1380
 catgttcatg agaagcaccg gcctcacaag tgttctacat gtgggaaatg tttctctcaa 1440
 tcttccagcc taaacaaaca catgcyagtc cactctggag acagaccata ccagtgtgtg 1500
 tattgtacta agaggttcac agcctccagc atactccgca cacacatcag gcagcactcc 1560
 ggggagaagc ccttcaaatg caagtactgt ggtaaatctt ttgcatcca tgctgcccac 1620
 gacagccatg tccggcgttc acacaaggag gatgatggct gctcatgcag catctgtggg 1680
 aaaatcttct cagatcaaga aacattctac tcccacatga agtttcatga agactactag 1740
 ccctgccagc cacaatgact cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc agaggtgggt 1800
 ggatcactca agtccaggag ttcgagacca gcctgggcaa catggtgaaa tcctgtctct 1860
 accaaaaaaa taaaaaatc agctgggggt ggtggcacat gcctgtggtt ccagccactc 1920
 aggaggtcga ggtggcagga tggtttgagc acaggagacg gaggttgctg tgagctgaga 1980
 tcgccccact gcttttcaac ctgggtgaca gaaccagacc ctgtctcaaa acaaaaacaaa 2040
 acaaaaaaaa tgagtagccc tcaagagtgt ggagacaatg taaaaacaag agattcggat 2100
 tctctctatt tccttttatg gttatagaa gtccctgcag ttggctgtgt gtggtggctc 2160
 acgcct 2166

5 <210> 9
 <211> 2350
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

ES 2 664 923 T3

agtgttctca agggaccgct ctacgacgcc atgctttgca tactaaagag catggattta	60
ctagttacct gtgtaatcct cagtaaacga ttttaacttct ctgtgcttca gttatctcat	120
ctataaaata gagatcagat gaactaatcc cagtaaaatg aataccatta agtgacactg	180
attatcagtt acttcacttg cggaagagtg gagggcatga ctaggaatgg ggtgggagga	240
gggagtcaaa gaagtcttag ctgaatTTTT tttttttttt tttttttttt tgagacgaag	300
tctcgctctg tcgaccaggc tggagtgcag tggtgcgatc tcggctcact gcaagctccg	360
cctccccggt tcacgccatt ctctgcctc agcctcccga gtagctggga ctacaagcac	420
ccgccaccac gcctggctaa tttttgtatt tttagtagag acggggtttc accgtgtag	480
tcaggatggt ctcgatctcc cgacctcatg atccaccgc ctcagcctcc caaagtgctg	540
ggattacagg cgtgagcaac cgagcccggc cccagctgta ttttatacat taaaaagaa	600
aagtatttag gtattcatac gtgggccgag ttttctctc tctcatacaa gcacattaca	660
cgogaagcca gattagtcca tgaatgtgct actgcacggg gtggctaaga aatcctgctt	720
gcaaaccgct ttgggtcctg cgtggagaat ggttctgagt gagagccgaa ccctaatcc	780
gtcttcctta tgtggagctc aacgcgactc tcaggtattc aggaagaata ccttttgcctc	840
agcacctcg cgtggtggc cacagcgagg cgctcgggag aggcgcctgg aggcggcag	900
tggggcgcg ccgcctgagc aggggtgcgg ggcggggaga aggcggccc acgtggaccg	960
cggggccagg cagggacagg agcagccggg cgcccggcc aatcagcggc ttccgcggcg	1020
ggcccggccc ctctggtca gcgcgctagc tgggctcggc tccgcactgc tagctgcgcg	1080
ccgccctgga cggggcgcac cgactgcgcg cgcggctgcg ggcaaacatc gggagtctg	1140
cctcagctgc cgcttctcca gcagcagctt caggcttctc ccgcaggagc ttcgggcttc	1200
tcctggtaga gacgtgggaa cttttcttct cctggcgagg ctgcagaggt gatgggccgc	1260
tcccggggct cccgcgggga ggcggcacgg tgagcgtcct cgggctccgg tgcggcgatc	1320
agtacctagt tccgacgcg ccggtccgac ttggatgccg gctctagtgc agtaagaagg	1380
gttgaaggg ataagaggg gcgagaggat ggggtggggg tggatttga ccctgtattt	1440
aggtgctgtc tcgtgggcag ccgctgcctc tcggctggta ccgagtaac tcagctcggg	1500
gcagctcccc tcatcccggc tctctggggc gccggggaga gtgcctgtgc tgaggtcggc	1560

ES 2 664 923 T3

gtgcaacccg aagttggaag gggcactccg aagtaaggat gtgtggctgg agagaggcag 1620
 cggccgcttc cagtttcggg gttcatgtct gacagaaatcc ccgggggtgc tctgctgatg 1680
 cggaggaggc cactcgatga attggtatag ggggtggtga actcaccgtg agctcttttc 1740
 tggacaagtc gaccttagcg cttcatccct ttaatctgag ctaggatctt tctaggagca 1800
 agcaggtggg agccggtcag cgtccccccg cccccacccc caccctgaag ctctgggtgc 1860
 taggatcttg cttgaagggc gcagcgagcg cttgggaggc gtcttcacgc tgggagcgca 1920
 aagcttcccc cccaagtgga gaactggagc gggctctgaa gttgcgtctc tttccgctgg 1980
 aggcactctca gatttgccca ccaaggtggc atctctacat ttctttcgct ctttttccca 2040
 ctttgccctg ttaatccgct cctagaagag agggcatcct tgaccctacg caaggagctc 2100
 gggagaggat tggaaactgga aagcttgatc tcctgcacct ggtgaggctg cccaagccag 2160
 acacagtgcc gctggtgctg tttcttctcg aatcagcatc atttaacgtt taggggctcc 2220
 acggagcctt agtaaagctg tgaatcagct cctaagcagt atgtacatgc acgggttcac 2280
 ggactcgccc agacctagcc tggtgcccat cccccgtcac cgagattcag ggacccccct 2340
 ttggtttaac 2350

5 <210> 10
 <211> 1923
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10

gtcttctgag ctacgataat tttttggaac ggcagaaatg attggttcta gcaacagatg 60
 ggaatttgga gtcactctga aatatatcct ggaataagtg tgtttgacta gaaccacatc 120
 ttatgaggtc cccaaggatg agagtctgtg ctaagtcagt gttgctgtcg cactggctct 180
 ttctagccta cgtgttaatg gtgtgctgta agctgatgtc cgcctcaagc cagcacctcc 240
 ggggacatgc aggtcaccac caaatcaagc aaggacactg tgagggtgtc gccgtgcaca 300
 ggtgctgcaa taagaaccgc atagaagagc ggtcacaac ggtcaagtgc tcttgcttcc 360
 cgggacaggt ggcgggcaca actcgggctc aaccttcttg tgttgaagct tccattgtga 420
 ttcagaaatg gtgggtgcac atgaatccgt gtttggaaag agaggattgt aaagtgctgc 480
 cagattactc aggttggctc tgtagcagt gcaataaagt caaaactacg aagtaacgc 540
 ggtagcgaag agagagggtg gcttcaatcc tggaggggca gcaggaggcg gagctctttt 600
 gcttggattc ccatcatggc ccctttgcag aaaattgtct aggatttcag caacttcata 660
 tttgtatatg tgagctgtga gaggtggcat tcaacttaact ggcccagccc tctctgcttc 720
 gtgattttat ttcattgaat tataaccaca agccaccacc catttgacat cctctctgga 780
 ttcccaagga gcatacctcc aaaatccgag aagagcaaat cagagtcttc aaaatggatc 840

ES 2 664 923 T3

accactaagg gcatgttcat tcttcacttt ctttctgctt ttacaaaaga acttggatgt	900
atgttccaaa gggcctcat tctgttcctc ttttgaactt ttccttttgt ccttgtatta	960
aagtggtttt aaaggggtct aaaaagattt tggcaaaaca tatttgcaga ttagattag	1020
ctggggaaga aaattactgc tagagatcaa ctgattaact ggtaaagaac gtttatttta	1080
taacccttga agaatagaag gacatagttg gattattgtg tgtgcattgt attttactt	1140
ctatTTTTTT tttgctttcc attttccagt tagcagagat aaaatgagag cgttttaact	1200
tcaatgtacc attttactga gtgctaagga agcatatcaa ttccaatatt ttataaccaa	1260
agctctatca gaacatattt ataaaacttg ttggaatttt tacggctttt gtgtagtcat	1320
gtaggtaa attttaaa ataaaacaat ctcaatttag atcaagggtt atttcttaga	1380
tcaaatttat gccaaattata tgaagagatt ttaactccga gacaggagtc tttcagtgc	1440
gaatttttag actgtaa atgttcttctt aacttagctg tttccctact tctgtgactt	1500
ctgtgttagc catcttattt ctttaaaatc tgagtcctga ttggcttaat gattttgcag	1560
cagacatgtc tccacatatt ctcaatgct gtcatgCGGA aacgtatgaa acagatgaag	1620
aatgactgac ccagatttta gatgtataat gttgttaaag tacatactac tgtaaaaata	1680
tgggatgaat tttatatatt aagaaatgcc aaaaacatag tttctgcacc aagttaatta	1740
tcctgtcct ttcacattta taggggaaa ataaactt taatggtgtt tatagcctaa	1800
cagttatttg attttattct tgcagagga atggaaagga atggaaagat ttgttgCGGT	1860
aatTTTTGaa tatttGttat gatcatatga ataagtaaaa aaattcatcc tgctgatggc	1920
ata	1923

Reivindicaciones

1. Un método para detección mejorada de lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV, comprendiendo dicho método detección de hipermetilación en el gen *FAM19A4* e hipermetilación de *hsa-miR124-2* en una célula por lo que dicha hipermetilación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con cánceres potencialmente invasivos y/o invasivos inducidos por HPV, en el que dicha lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o cáncer invasivo inducido por HPV es una lesión cervical premaligna de alto grado, de cabeza y cuello, anal o vulvar o cáncer cervical invasivo, de cabeza y cuello, anal o vulvar.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer invasivo inducido por HPV es un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo.
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hipermetilación de *FAM19A4* indica la presencia de una lesión avanzada de CIN3.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha hipermetilación se detecta en las secuencias ricas en CpG como se indica en la Figura 2.
5. Un método para detectar una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha hipermetilación es una metilación incrementada del promotor rico CpG de *FAM19A4* y/o secuencias genómicas en la célula de prueba en comparación con la célula normal comparable.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que usa un reactivo que es una endonucleasa de restricción sensible a la metilación, escogida del grupo que consiste en BssHII, MspI, NotI y HpaII.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se realiza una PCR específica de metilación, que se basa en la modificación con bisulfito del ADN, seguido de reacciones de PCR específicas que se dirigen a secuencias ricas en CpG.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que se usa una sonda o cebador de ácido nucleico que se une a la secuencia de ácido nucleico de *FAM19A4* como se expone en la Figura 2.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha sonda o cebador de ácido nucleico tiene una etiqueta detectable.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 6, 7 u 8, en el que la sonda de ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una secuencia de polinucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones rigurosas con la secuencia de *FAM19A4* como se expone en la Figura 2;
 - b) un polinucleótido que tiene al menos 70% de identidad con el polinucleótido de a);
 - c) un polinucleótido complementario al polinucleótido de a); y
 - d) un polinucleótido que comprende al menos 15 bases de un nucleótido de a) o b).
11. Uso de una combinación de *FAM19A4* y *hsa-miR124-2* como marcador de diagnóstico molecular para la detección de una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o cánceres invasivos inducidos por HPV, en la que dicha lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o cáncer invasivo inducido por HPV es una lesión cervical premaligna de alto grado, de cabeza y cuello, anal o vulvar o cáncer cervical invasivo de cabeza y cuello, anal o vulvar.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión o carcinoma.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que *FAM19A4* se usa como marcador de diagnóstico molecular para la detección de una lesión avanzada de CIN3.
14. Kit de partes para uso en un método para detectar una lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV, comprendiendo dicho kit
 - medio para la detección de metilación de *FAM19A4* y metilación de *hsa-miR124-2* en el que dicho medio comprende sondas y/o cebadores específicos para la secuencia de nucleótidos de *FAM19A4* de la Figura 2 y sondas y cebadores específicos para la secuencia de *hsa-miR124-2*;
 - medio para la detección de infección por HPV, en el que dicho medio comprende sondas y cebadores específicos para HPV,

y en el que dicha lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o cáncer invasivo inducido por HPV es una lesión cervical premaligna de alto grado, de cabeza y cuello, anal o vulvar o un cáncer cervical invasivo, de cabeza y cuello, anal o vulvar.

Figura 1: Promotor de PRDM14, secuencia de codificación, secuencia rica en CpG del intrón 1 y 3'UTR

```
>hg19_Gen Conocido_uc003xym.Intervalo 3=cromosoma8: 70963886-70984562 5'pad=0 3'pad=0
cadena= -repetición de enmascaramiento=ninguno
ccccccagcttttagggactctggcggcgtctcttagccgggtagatgttc
ctcctttccctctctctccaagccgctgccagggcgggggtgaggctgc
acctcagtetttcagccccgaaggccgcgcccggggcgggtcgctccccat
tcagctaagaggaagcagcggccggggggcaggcgaggaacctgtccgg
ctcaccggcaagactgcgtttccccaccctcggcgtctctttctgtga
atgtgaatggaactaagcgttctctctccctcaatggccggcgagga
gaattcaaatgcggtctttgggcgctcggatgggtctggacctggttt
tcagagcctgcgcgtccaaggtcgctagcctttcccgaaggaagtgcag
ctgcggcggcgcgaggcccatcctcggtcggttaaaagccaactaagga
ataaaagccccgagagagcaaaacgaccaccgaaacctcggaagcgtc
gggggtgcggggcccaacgctcccacgtgtcactgccggggactcgcgag
gcaagcttcccagcgtcaaggcgtcccgcctcgtcccagggtatcag
gaacagacaccaccagggtccaccagcgggtcagacgcgccttcgggca
ggctgggatcttcogaactgggagcggagagtaaggggtcgcacccggg
acgcgagtcggcctctctggactccggttcagggtgtgtgtgcgcgcgga
ggggcttatctggggccctgggtagcacacgtgttcggtttttttctcc
ccgactccgcacgcctggagcggcaataactgctgccctagaaggccagc
ggcagtgctcgcactagggtcccaggagggtttggaaaactgatgag
ttaagtgcgcgaccccaggggacagagggcgagtcgagagtcggccaatg
gctgcggtgggcccgggagaagacgacgcgggatctgcgtgggcgggtc
AATTCCCTACCCCTCGACCTGTGATGCCCGCGGCCCGCCCGCCCTCTT
AAGCCTGGCTCAGCCCTCAGGGCCGCCCCAAGTCTACCGAGCCCGAGTG
GCCTACCGAGCCCGAGTGGCCCCGAGCGTCCAGGAGGCGCCCGCTCCGC
GGTGGCGCTCTTGGAGGTGGTGTGCGGAGgtaggcacgggacaggacgcgc
ctggggcccggggcgggtggtcttccagggccgttggggaggggcggcagca
ctcgtgcgcgcagttcgttttggatggtcgttctgcccctctcgggggctt
tgaatcccaagttgcagatccctgaggtcggaggaggctaggagaagggc
gcctttggaggatcgggaggagacgggcccgtgcctgtgtcgtggctgac
ctctctcctgaccccggttctttaaattctgagtcataccctgcttg
gttttctattgggctcattgatctcaagaccgcggccctgaaggggc
ttcattcttcagcctcgggtgaacttgcctgctctatataaacgccatc
ctttcccggcgggtcggggggcgggaggactggcagtcgcccaggctctc
gctcccacctggccagggtcgtccaacggcctcccaggggctacccca
ggcccaaatagtcctggtagaatgattggagtttccgaggaaccgggga
atgtggcgacgctcccgcgagggaaaagaggttcaggcggcgcacctc
agggcagccaaaagtggcgcgcccctcccctcgggcagtcaggaccgcc
aggaccgcggggctcacaccgctgggcccagagcaggtcgcggggtccctg
gacctgcccggggctctgggagcgcgtctccatctgcgcgggtgcgacc
agggctcctcggctcttccctcccagcggaggcccaggagcgcctggagc
tgtcgttgcctccattgccctccgaccgctgcgctcggctcccggccca
gccccagggttggcaggggcccgcggctcccacagaccctaccaacgagt
ttttaggactgagaagaaggaaggaaaggaaacttcaatgggttttga
ggaaccgggttggggccgaaaagcggagagcgggtgtgggaaggcggccg
ggcttagggaagggtgcttggagagggaaagggaaggcaactaacc
ggaatttagagtagggcaggatcccggcagatttccggttggggctttt
tgtgttgcctctattgctgtttttcgttttgtcttaattgtgggagcg
ggctggcgggatcggactggggcggttatcctgttccctgggatctggg
gctggctggggtggaggaggctggtggggaggcgggtcggaccccggg
```

aagctcccgcgcggtgtcctcagcggcgcccgttttctgag.....
intrón 1.....exón 2-14: AGCCGCCGAGCGTGCCGTCCCG
GG**ATG**GCTCTACCCCGGCCAAGTGAGGCCGTGCCTCAGGACAAGGTGTGC
TACCCGCCGGAGAGCAGCCCGCAGAACCTGGCCGCGTACTACACGCCTTT
CCCGTCTATGGACACTACAGAAACAGCCTGGCCACCGTGGAGGAAGACT
TCCAACCTTTCCGGCAGCTGGAGGCCGAGCGTCTGCTGCCCCGCCATG
CCCCCTTCCCCTTCCGGATGCGCCCTCCCTTGCTGAGCCCGGGTCTGGG
CCTACAGAGGGAGCCTCTCTACGATCTGCCCTGGTACAGCAAGCTGCCAC
CGTGGTACCCAATCCCCACGTCCCCAGGGAAGTGCCGCCCTTCTGTGAGC
AGCAGCCACGAGTACCGGGTGCCAGCAGTGAAGATCTGGGCCACCAAAAT
CATTGGTGGCGACAACGAGAGTGGCCCGTGTGTGGACCTGACACITTA
TTCCACCGCCCCCTGCGGATGCTTCTCTGTTACCTGAGGGGCTGAGGACC
TCCCAGTTATTACCTTGCTCAGCCAGCAAGCAGTCAGAGGATGGTCCCAA
ACCCTCCAACCAAGAAGGGAAGTCCCCTGCTCGGTTCAGTTCCAGTTCCAGGAGG
AGGACCTGCACCTCGTTCTGTACGGGGTCACTCCCAGCCTGGAGCACCCA
GCCAGCCTGCACCATGCGATTTCCAGCCCTCCTGGTCCCCCCAGACAGCTC
TGGATCTGATTCTCTTCCCAAACCTCTGGATAAAAGACTCCCTTCAACTTC
CAGAAGGTCTATGCCTCATGCAGACGGTGTGGTGAAGTCCCACATTTT
GGTGTCTTCTGCAGTAGTTTTATCGCCAAAGGAGTCAGGTTTGGGCCCTT
TCAAGGTAAGTGGTCAATGCCAGTGAAGTGAAGACCTACGGAGACAATT
CTGTGATGTGGGAGATCTTTGAAGATGGTCATTTGAGCCACTTTATAGAT
GGAAAAGGAGGTACGGGGAAGTGGATGTCTATGTCAACTGTGCCCGCTT
CCCCAAGGAGCAGAACCTAGTTGCTGTGCAGTGTCAAGGCATATATTTT
ATGAGAGCTGCAAGAGATCCATCAGAACCAAGAGCTCCTTGTGTGGTAT
GGAGACTGCTATGAGAAATTTCTGGATATTCCTGTGAGCCTTCAGGTAC
AGACCCGGGGAAGCAGCCATCTGGGCCCTCTGAAGAGTCTGCAGAAGGCT
ACAGATGTGAAAGATGTGGGAAGGTATTTACCTACAAATATTACAGAGAT
AAGCACCTCAAGTACACCCCTGTGTGGACAAGGGCGATAGGAAATTTCC
CTGTTCTCTGCAAACGATCCTTTGAGAAGCGGGACCGGCTTCGGATCC
ACATTTCTCATGTTTCATGAGAAGCACCGGCCCTCACAAGTGTCTACATGT
GGGAAATGTTTTCTCAATCTTCCAGCCTAAACAAACACATGCGAGTCCA
CTCTGGAGACAGACCATAACCAGTGTGTGATTGTAAGAGGTTACAG
CCTCCAGCATACTCCGCACACACATCAGGCAGCACTCCGGGGAGAAGCCC
TTCAAATGCAAGTACTGTGGTAAATCTTTTGCATCCCATGCTGCCCATGA
CAGCCATGTCCGGCGTTACACAAGGAGGATGATGGCTGCTCATGCAGCA
TCTGTGGGAAAATCTTCTCAGATCAAGAAACATTCTACTCCACATGAAG
TTTCATGAAGACTACTAGCCCTGCCAGGCACAATGACTCAGCCCTGTAAT
CCCAGCACTTTGGGAGGCAGAGGTGGTGGATCACTCAAGTCCAGGAGTT
CGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAATCCTGTCTCTACCAAAAAAATA
CAAAAATCAGCTGGGGGTGGTGGCACATGCCTGTGGTTCCAGCCACTCAG
GAGGTCGAGGTGGCAGGATGGTTTGGAGCACAGGAGACGGAGGTTGCTGTG
AGCTGAGATCGCCCCACTGCTTTTCAACCTGGGTGACAGAACCAGACCCT
GTCTCAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAATGAGTAGCCCTCAAGAGTGTGG
AGACAAATGTA AAAACAAGAGATTCGGATTCTCTCTATTTCTTTTATGGG
TTATAGAAGTCCCTGCAGTTGGCTGTGTGTGGTGGCTCAGCCCT

GAATTTGGAGTCACTCTGAAATATATCCTGGAATAAGTGTGTTTGACTAG
AACCACATCTT**ATG**AGGTCCCCAAGGATGAGAGTCTGTGCTAAGTCAGTG
TTGCTGTGCGCACTGGCTCTTTCTAGCCTACGTGTTAATGGTGTGCTGTAA
GCTGATGTCCGCCTCAAGCCAGCACCTCCGGGGACATGCAGGTCAACCACC
AAATCAAGCAAGGGACCTGTGAGGTGGTCGCCGTGCACAGGTGCTGCAAT
AAGAACCGCATAGAAGAGCGGTACAAAACGGTCAAGTGTCTTTGCTFCCC
GGGACAGGTGGCGGGCACAACCTCGGGCTCAACCTTCTTGTGTTGAAGCTT
CCATTGTGATTCAGAAATGGTGGTGTACATGAATCCCTGTTTGGAAAGGA
GAGGATTGTAAAGTGTGCTGCCAGATTACTCAGGTTGGTCTGTAGCAGTGG
CAATAAAGTCAAACTACGAAGGTAACGGGTAGCGAAGACAGAGGTGTG
CTTCAATCCTGGAGGGGCAGCAGGAGGGGAGCTCTTTTGCTTGGATTCC
CATCATGGCCCTTTGCAGAAAATGTCTAGGATTTACGCAACTTCATAT
TTGTATATGTGAGCTGTGAGAGTGGCATTACCTAACTGGCCAGCCCT
CTCTGCTTCGTGATTTTATTTTCATTGAATTATAACCACAAGCCACCACC
ATTTGACATCCTCTCTGGATTCCCAAGGAGCATACCTCCAAAATCCGAGA
AGAGCAAATCAGAGTCTTCAAAATGGATCACCCTAAGGGCATGTTTCATT
CTTCACTTTCTTTCTGCTTTTACAAAAGAAGTGGATGTATGTTCCAAAAG
GGTCTCATTCTGTTCTCTTTTGAACCTTTCTTTTGTCTTGTATTAA
AGTGGTTTTAAAGGGGTCTAAAAAGATTTTGGCAAAACATATTTGCAGAT
GTAGATTAGCTGGTGAAGAAAATTAAGTGTAGAGATCAACTGATTAAGTGT
GTAAAGAACGTTTATTTTATAACCCCTTGAAGAATAGAAGCATAAGTTGG
ATTATTGTGTGTCATTGATTTTACTTCTATTTTTTTTTTGTCTTCCA
TTTTCCAGTTAGCAGAGATAAAAATGAGAGCGTTTTAACTCAATGTACCA
TTTTACTGAGTGCTAAGGAAGCATATCAATTCCAATATTTTATAACCAAAA
GCTCTATCAGAACATATTTATAAACTTGTGGAATTTTTACGGCTTTTG
TGTAGTCATGTAGGTAATCATTTAAAATATAAAACAATCTCAATTTAGA
TCAAGGGTTATTTCTTAGATCAAATTTATGCCAATTATATGAAAAGATTT
TAACTCCGAGACAGGAGTCTTTCAGTGTGAATTTTACTGTAATGA
GTTCTTCTTAACTTAGCTGTTTCCCTACTTCTGTGACTTCTGTGTTAGCC
ATCTTATTTCTTTAAAATCTGAGTCTGATTGGCTTAATGATTTTGCAGC
AGACATGTCTCCACATATTCTCAAATGCTGTGATGCGCAACGTATGAAA
CAGATGAAGAATGACTGACCCAGATTTTAGATGTATAATGTTGTTAAAGT
ACATACTACTGTAAAAATATGGGATGAATTTTATATATTAAGAAATGCCA
AAAACATAGTTTCTGCACCAAGTTAATTATCCCTGTCCTTTCACATTTAT
AGGGGAAAATAAATACTTTAATGTTGTTTATAGCCTAACAGTTATTGTA
TTTTATTCTTGCAGAGGAATGAAAAGGAATGAAAAGATTTGTTGGCGTA
ATTTTGAATATTTGTTATGATCATATGAATAAGTAAAAAAATTCATCTT
CCTGATGGCATA

Figura 3:

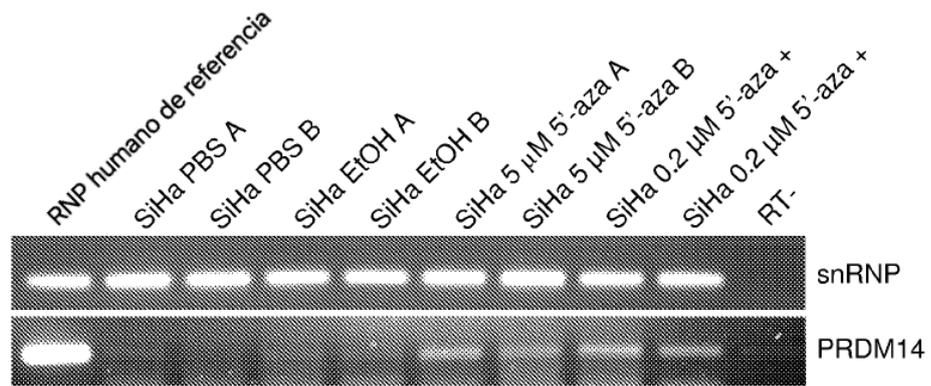


Figura 4:

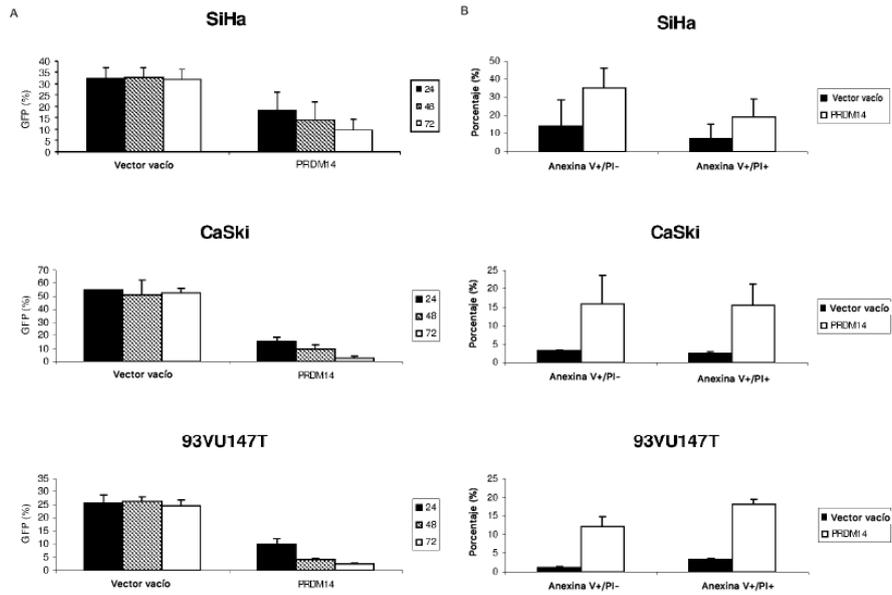


Figura 4: Efectos de la expresión ectópica de PRDM14 en células SiHa, CaSki y 93VU147T. (A) El porcentaje de células GFP+ declina en las células transfectadas con PRDM14, comparado con las células del vector vacío, 24, 48 y 72 horas después de la transfección. (B) El análisis de citometría de flujo de células marcadas doblemente con Annexina V y PI muestra un incremento tanto en células apoptóticas tempranas (Anexina V+/PI-) y tardías (Anexina V+/PI+) en la población de células que expresan PRDM14.

Figura 5:

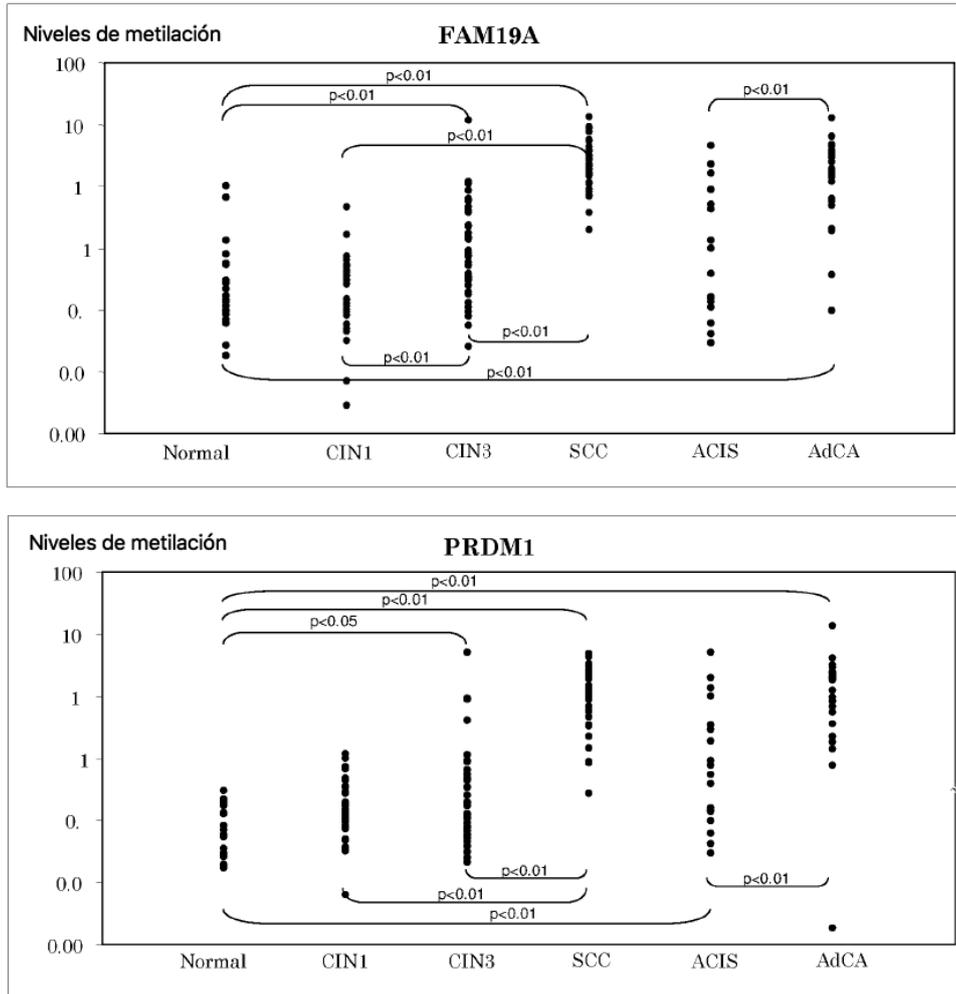


Figura 6:

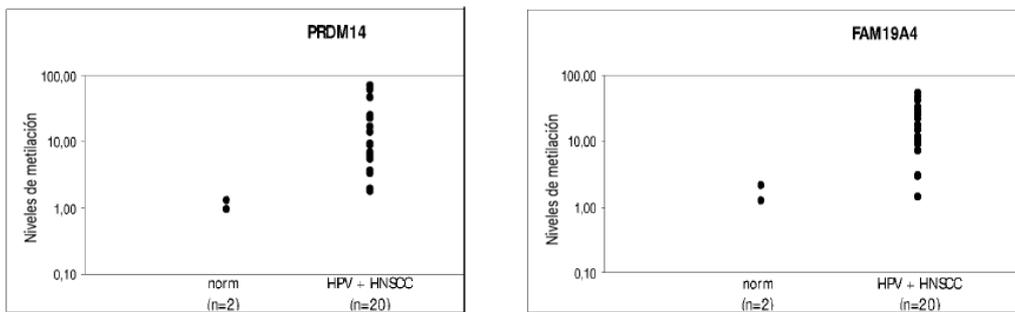


Figura 6: Niveles de metilación de PRDM14 y FAM19A4 en muestras de tejido de cabeza y cuello positivas para hrHPV (HNSCC: SCC de Cabeza y Cuello). Los niveles de metilación son significativamente mayores en carcinomas comparado con controles.