

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 119**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2011 PCT/KR2011/004594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2011 WO11162558**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2011 E 11798393 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2586865**

54 Título: **Vector recombinante para suprimir la proliferación de células del papilomavirus humano que incluyen el gen del polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) y composición farmacéutica para tratar el papilomavirus humano**

30 Prioridad:

24.06.2010 KR 20100060196

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

09.05.2018

73 Titular/es:

**GENOMICTREE, INC. (100.0%)
829 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR**

72 Inventor/es:

**AN, SUNG WHAN;
MOON, YOUNG HO;
OH, TAE JEONG y
LEE, SENG-HOON**

74 Agente/Representante:

BOTELLA REYNA, Antonio

ES 2 667 119 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

Vector recombinante para suprimir la proliferación de células del papilomavirus humano que incluyen el gen del polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) y composición farmacéutica para tratar el papilomavirus humano

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer de cuello uterino, que comprende un vector recombinante que comprende un gen de SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) o un gen que codifica un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 como un principio activo, o el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) o SEQ ID NO: 2, o un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 como un principio activo. Más en particular, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer de cuello uterino, que comprende un vector recombinante que contiene bien un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) cuya región promotora está metilada específicamente en células de cáncer de cuello uterino para inhibir significativamente la expresión del gen, o un fragmento del gen, en el que el vector recombinante inhibe la proliferación de células de cáncer de cuello uterino cuando se introduce en células de cáncer de cuello uterino.

Técnica anterior

Los oncogenes, genes supresores de tumores y genes reguladores de la apoptosis en células normales están controlados de forma complementaria de modo que están equilibrados el crecimiento y mantenimiento de las células. Sin embargo, cuando se repite el crecimiento y proliferación de células anómalo producido por diferentes factores, se produce el cáncer. Las causas principales de la carcinogénesis son las anomalías de genes en células. Dichas anomalías genéticas típicamente incluyen variaciones genéticas y variaciones epigenéticas.

Se encuentran islas de CpG en muchas regiones, incluyendo la secuencia codificante ascendente de la región reguladora que incluye la región promotora de un gen específico, la región codificante (p. ej., región de exones) y la región descendente de la región codificante (p. ej., región potenciadora e intrón). La metilación del ADN que es una de las variaciones epigenéticas que se produce principalmente en la citosina de las islas de CpG en la región promotora de un gen específico, y la metilación de las islas de CpG en el promotor que regula la expresión génica, inhibe la expresión del gen diana. En particular, se describió que los genes supresores de tumores, genes reparadores de ADN, genes reguladores del ciclo celular y similares, en diferentes células de cáncer, son hipermetilados, sugiriendo que la expresión de esos genes es silenciada. Se encontró también que la expresión de oncogenes es inducida por hipometilación. En particular, la hipermetilación y la hipometilación se encuentran en la etapa inicial de la carcinogénesis. Por consiguiente, la metilación de las islas de CpG en la región promotora de un gen específico en células de cáncer inhibe o silencia la expresión del gen, y finalmente inhibe o inactiva la actividad del gen en las células. Por lo tanto, parece en general que un gen que es metilado en células de cáncer es muy probable que sea un gen supresor de tumores (Baylin et al., *Adv. Cancer Res*, 72: 141, 1998; Jones and Laird, *Nat. Genet.*, 21: 163, 1999).

Para el tratamiento del cáncer que es la primera causa principal de muerte en seres humanos, se han llevado a cabo estudios amplios. Los procedimientos de tratamiento del cáncer conocidos hasta la fecha incluyen la cirugía, radioterapia, quimioterapia antineoplásica, inmunoterapia y terapia génica. Dichos estudios sobre el tratamiento del cáncer han sugerido la necesidad de un nuevo procedimiento terapéutico de introducción y expresión selectivamente de un gen terapéutico para el cáncer en células de cáncer y células en el tejido canceroso.

Con respecto a la terapia génica reciente, se han realizado estudios sobre procedimientos para descubrir un nuevo gen diana, introducir eficazmente el gen diana descubierto en una célula diana, inducir la expresión a largo plazo del gen introducido y aumentar la eficacia del suministro del gen en terapia clínica.

Los procedimientos de terapia génica conocida que usan un gen o su proteína para tratar el cáncer incluyen un procedimiento que usa un inhibidor tumoral que contiene, como principio activo, una proteína p43 que comprende una secuencia de nucleótidos específica que induce la producción de citoquinas para aumentar una respuesta inmunitaria e inhibe la angiogénesis (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 2001-0112108), un agente antineoplásico que contiene micolactona que mata las células de cáncer, un nucleótido de Rb de sentido contrario que inhibe la expresión de proteína de retinoblastoma, y un agente antineoplásico que contiene micolactona y el nucleótido de Rb de sentido contrario (publicación de patente coreana abierta a consulta por el

público nº 2002-0040521). Además, otros procedimientos conocidos incluyen un procedimiento de inhibición del cáncer usando una composición antineoplásica que comprende un vector recombinante que expresa el gen de importina- α y el gen p53 recombinante (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 10-2005-0098800), y una composición para el tratamiento y diagnóstico del cáncer de próstata, que contiene una proteína específica de próstata o un gen que la codifica (patente de EE.UU. nº 6.329.505).

Además, se han usado con frecuencia genes o sus proteínas para el tratamiento del cáncer, y se han continuado los estudios de los mismos. Actualmente, se están llevando a cabo estudios sobre el descubrimiento de genes deficientes en pacientes de cáncer, o genes que inducen cáncer y genes antineoplásicos en paralelo con el proyecto del genoma humano. En particular, se necesita con mucha urgencia el descubrimiento de nuevos genes supresores de cáncer que se puedan usar más eficazmente para la terapia génica del cáncer.

Los autores de la presente invención encontraron previamente que la expresión de un gen en células de tejido canceroso es inhibida por la metilación del ADN en las islas de CpG en la región promotora del gen (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público nº 10-2007-0109811).

Por consiguiente, los autores de la presente invención han hecho grandes esfuerzos para desarrollar un agente para tratar el cáncer de cuello uterino usando un gen, y como resultado, han encontrado que la región promotora de un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) es metilado específicamente en una línea celular, tejido y raspado de cáncer de cuello uterino, para inhibir la expresión del gen, y también han descubierto que, cuando un vector recombinante que contiene un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) se introduce en las células de cáncer de cuello uterino, muestra el efecto de inhibir la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino, completando de esta forma la presente invención.

Descripción de la invención

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica, en donde la composición comprende

- (i) un vector recombinante que comprende un gen de SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733), o un gen que codifica un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10, como un principio activo, o
- (ii) polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 como principio activo, para usar en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un procedimiento en el que se criba el gen *ADCYAP1*, cuya expresión en las células de cáncer de cuello uterino es regulada por disminución, midiendo la metilación usando el análisis de expresión de genes, análisis informático y pirosecuenciación en tejido y línea celular de cáncer de cuello uterino.

La figura 2 muestra el nivel de expresión del gen *ADCYAP1* en tejido de cuello uterino (fig. 2A) y el aumento de expresión del gen *ADCYAP1* después de tratamiento de las células de cáncer de cuello uterino con DAC (fig. 2B).

La figura 3 muestra los niveles de metilación del gen *ADCYAP1* en líneas celulares de cáncer de cuello uterino (fig. 3A) y tejido de cáncer de cuello uterino (fig. 3B).

La figura 4 muestra los resultados de medir los niveles de metilación del gen *ADCYAP1* en raspados normales y de cáncer de cuello uterino (fig. 4A) y los resultados de medir la sensibilidad y especificidad del gen *ADCYAP1* al diagnóstico de cáncer de cuello uterino por análisis de la curva ROC (fig. 4B).

La figura 5 muestra los resultados de medir el efecto del gen *ADCYAP1* en la proliferación de una línea celular de cáncer de cuello uterino (fig. 5A: los resultados de la observación microscópica de si una línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa introducida con el vector recombinante p*ADCYAP1* proliferaba; fig. 5B: los resultados de medir el número de células muertas por ELISA).

La figura 6 muestra los resultados del ensayo de WST (fig. 6A) y la observación por microscopio óptico (fig. 6B) de una línea celular de cáncer de cuello uterino con un fragmento de péptido de la proteína *ADCYAP1*.

5 Mejor modo de llevar a cabo la invención

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos experimentales que se describirán más adelante, son los conocidos y usados normalmente en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un vector recombinante para inhibir la proliferación de células de cáncer de cuello uterino, que contiene un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) o un gen que codifica un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10.

En la presente invención, la proteína *ADCYAP1* se puede representar por la SEQ ID NO: 2 (GenBank NP_001093203), y el gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) en el vector recombinante puede ser un cADN humano representado por la SEQ ID NO: 1.

Se describen ahora genes cuyos promotores son metilados específicamente en células de cáncer de cuello uterino. Se analizó la relación entre la hipermetilación de un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) y el nivel de expresión del gen, y se construyó un vector recombinante que contenía el gen y se introdujo en células de cáncer de cuello uterino para determinar si puede inhibir la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino, determinando así si se puede usar el vector recombinante o *ADCYAP1* para el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Se describe además, un fragmento del gen que codifica *ADCYAP1*, que preferiblemente tiene 30-527 nucleótidos del gen que codifica *ADCYAP1*.

En un ejemplo de la presente descripción, con el fin de examinar la expresión del gen *ADCYAP1* en las células de cáncer de cuello uterino, se llevó a cabo la hibridación en micromatriz. Específicamente, se midieron los niveles de expresión del gen *ADCYAP1* en los ARN totales aislados de tejidos tumorales de pacientes con cáncer de cuello uterino y tejidos normales cerca de los tejidos tumorales, respectivamente, por un procedimiento de comparación indirecto. Además, con el fin de examinar si la expresión del gen es regulada por la metilación del promotor del gen, el gen se trató con 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) que es un agente de desmetilación, y como resultado, aumentó la expresión del gen por tratamiento con DAC, sugiriendo que la expresión del gen era inhibida por la metilación del promotor.

También se describe un vector recombinante que contiene el gen *ADCYAP1*, que se introdujo en células de cáncer de cuello uterino, y como resultado se encontró que el gen *ADCYAP1* de SEQ ID NO: 1, cuya región promotora no estaba metilada, era expresado en las células de cáncer de cuello uterino, y por lo tanto, la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino era inhibida. Además, se encontró que cuando las células de cáncer de cuello uterino son desmetiladas por tratamiento con un agente de desmetilación, el gen *ADCYAP1* de SEQ ID NO: 1, cuya región promotora no está metilada, o un gen que tiene secuencia similar al mismo, es expresado, de modo que se puede inhibir la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino. El agente de desmetilación que tiene dicho efecto se puede usar como una sustancia antineoplásica para inhibir la proliferación de células de cáncer de cuello uterino. Se describe además que se puede seleccionar una sustancia antineoplásica por tratamiento del gen *ADCYAP1*, cuya región promotora estaba metilada, con diferentes sustancias candidatas antineoplásicas, examen el grado de desmetilación del gen, y selección de una sustancia que muestre un grado alto de desmetilación entre las sustancias candidatas.

En otro ejemplo de la presente descripción, se examinó por pirosecuenciación si el promotor del gen *ADCYAP1* estaba metilado en células de cáncer de cuello uterino. Como resultado, se podía ver que el promotor del gen *ADCYAP1* estaba metilado en las células de cáncer de cuello uterino.

En otro ejemplo más de la presente descripción, con el fin de suministrar el gen *ADCYAP1* en células de cáncer de cuello uterino, el gen *ADCYAP1* se insertó en el vector pcDNATM3 (Invitrogen), construyendo así un vector de expresión del gen *ADCYAP1* (p*ADCYAP1*) capaz de expresar el gen *ADCYAP1*. Además, con el fin de examinar si las células de cáncer de cuello uterino proliferan cuando se introduce el vector de expresión del gen *ADCYAP1*

(pADCYAP1) en las células de cáncer de cuello uterino, se introdujeron 0,1-2 µg del vector de expresión pADCYAP1 por 10⁵ células y 1-20 µg de liposomas por 10⁵ células, en células de cáncer de cuello uterino las cuales después se cultivaron. Como resultado, se encontró que el gen ADCYAP1 era expresado con alta eficacia debido a la introducción del vector de expresión del gen ADCYAP1 (pADCYAP1), inhibiendo de esta forma la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino.

El gen ADCYAP1 se puede aislar de tejido humano o sintetizar de acuerdo con cualquier procedimiento de síntesis de ADN conocido en la técnica. En la presente invención, entre la secuencia de nucleótidos de 531 -pb del cADN de *Homo sapiens*, se usó el gen ADCYAP1 (GenBank NM_001099733, SEQ ID NO: 1).

En la presente invención, se puede usar preferiblemente la proteína ADCYAP1 representada por la SEQ ID NO: 2. La proteína ADCYAP1 se puede preparar por cultivo de microorganismos transformados con un vector recombinante que contiene un gen que codifica la proteína ADCYAP1 para expresar la proteína y recuperar la proteína expresada por un procedimiento convencional.

Se usó un vector pcDNA3 para introducir el gen ADCYAP1 en células de cáncer de cuello uterino y se pueden usar diferentes vectores dependiendo del propósito de la expresión. Además, el tamaño, la secuencia de nucleótidos y similares del gen que se inserta en la región de inserción del gen extraño del vector de expresión se pueden cambiar de diferentes formas por un procedimiento conocido.

Se describe además un vector recombinante construido, que se puede introducir en células de cáncer de cuello uterino por un procedimiento convencional. Los procedimientos para introducir el vector recombinante en las células incluyen cualquier procedimiento para la introducción de ácido nucleico en células, y la introducción del vector recombinante se puede llevar a cabo usando una técnica adecuada conocida seleccionada dependiendo de una célula hospedante. Los ejemplos de los procedimientos para introducir el vector recombinante en células incluyen la electroporación, precipitación con fosfato de calcio, precipitación con cloruro de calcio, infección por retrovirus, microinyección, PEG, un procedimiento de liposomas catiónicos, un procedimiento de acetato de litio-DMSO, etc.

En un aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de cuello uterino, que contiene como un principio activo, un vector recombinante que contiene un gen que codifica ADCYAP1 o un fragmento del gen; la proteína ADCYAP1; o un fragmento de la proteína ADCYAP1, como se define en las presentes reivindicaciones.

La presente descripción incluye un fragmento de la proteína ADCYAP1 que tiene los restos de aminoácidos 10-175 de la secuencia de aminoácidos de la proteína ADCYAP1.

En la presente invención, se introdujo un fragmento peptídico de la proteína ADCYAP1 que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9 o 10, en la línea celular de cáncer de cuello uterino Hela, y como resultado se encontró que el fragmento peptídico de la proteína ADCYAP1 inducía la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino e inhibía el crecimiento de las células de cáncer de cuello uterino.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular o usar en combinación con uno o más agentes seleccionados de entre agentes antihistamínicos, agentes inflamatorios, agentes antineoplásicos y antibióticos.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en forma de una de sus sales farmacéuticamente aceptables y se puede usar sola o en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, así como por unión a otros compuestos farmacéuticamente activos.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede formular de acuerdo con un procedimiento convencional. Por ejemplo, se puede formular en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles, agentes para aplicaciones externas, supositorios y soluciones de inyección estéril. Los vehículos, excipientes y diluyentes que puede contener la composición de acuerdo con la presente invención incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato magnésico y aceite mineral.

Una composición farmacéutica que comprende (i) el vector recombinante que comprende un gen de SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (ADCYAP1; NM_001099733), o un gen que codifica un fragmento de ADCYAP1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10, como un principio activo,

o

(ii) el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de *ADCYAP1* que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 como principio activo, se formula usando diluyentes o excipientes tales como cargas, extendedores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes o tensioactivos, que se usan normalmente. Las formulaciones sólidas para administración oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc. Dichas formulaciones sólidas se preparan mezclando el extracto de la presente invención con al menos un excipiente, tal como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Además de excipientes simples, se pueden usar también lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, etc. Las formulaciones líquidas para administración oral, tales como suspensiones, soluciones internas, emulsiones, jarabes, etc., pueden incluir diluyentes simples, p. ej., agua y parafina líquida, así como diferentes excipientes, p. ej., agentes humectantes, edulcorantes, agentes aromáticos, conservantes, etc. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, agentes liofilizados, supositorios, etc. Los disolventes y suspensiones no acuosas se pueden preparar usando propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, o ésteres inyectables tales como oleato de etilo. Como base para supositorios, se pueden usar Witespol, Macrogol, Tween 61, grasa de cacao, grasa de laurina, glicerolgelatina, etc.

La dosis preferida de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar de forma adecuada dependiendo de diferentes factores que incluyen el estado y peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco, la vía y periodo de administración, y un experto en la materia lo puede determinar de forma adecuada. Sin embargo, con el fin de lograr los efectos deseados, el extracto de la presente invención se puede administrar en una dosis diaria de 0,0001 a 100 mg/kg, y preferiblemente de 0,001 a 100 mg/kg. El extracto se puede administrar en una sola dosis diaria o en múltiples dosis diarias. No se pretende que la dosis limite la presente invención de ninguna forma.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por diferentes vías a mamíferos, que incluyen ratas, ratones, ganado y seres humanos. Pueden estar contempladas todas las vías de administración e incluyen, por ejemplo, la oral, rectal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intrauterina o inyecciones intracerebrovasculares.

Un compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables que está contenido en la composición de la presente invención, se puede usar como un componente principal, aditivo o complemento para diferentes alimentos funcionales y alimentos complementarios para la salud.

En otro aspecto más, la presente descripción se dirige a un agente terapéutico génico para el cáncer de cuello uterino, en el que un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*; NM_001099733) se introduce en un vehículo de suministro in vivo.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico génico” se refiere a un agente terapéutico que se usa en terapia génica para tratar una enfermedad por suministro y expresión de genes. La terapia génica tiene varias ventajas, que incluyen el suministro preciso de un factor genético en un sitio de la enfermedad, la degradación completa del factor genético in vivo, la ausencia de toxicidad y antigenicidad inmunitaria, y expresión estable a largo plazo del factor genético.

Las técnicas para suministrar un gen diana incluyen un procedimiento de transferencia basado en vector vírico que usa virus como un vehículo, un procedimiento de suministro no vírico que usa fosfolípido sintético o un polímero catiónico sintético, y un procedimiento físico, tal como electroporación para la introducción de un gen aplicando estimulación eléctrica transitoria a una membrana celular. Entre las técnicas de suministro de genes, se considera que es preferido el procedimiento de transferencia basado en vector vírico para la terapia génica porque la transferencia de un factor genético se puede hacer de forma eficaz con un vector con la pérdida de una parte o toda la capacidad de replicación, el cual tiene un gen sustituido por un gen terapéutico. Los ejemplos de virus usados como el vehículo o vector vírico incluyen vectores víricos de ARN (vectores de retrovirus, vector de lentivirus, etc.), y vectores víricos de ADN (vectores adenovirus, vectores víricos adenoasociados, etc.). Además, sus ejemplos incluyen vectores víricos del herpes simple, vectores víricos alfa, etc.

El vehículo de suministro in vivo sirve para suministrar un gen diana in vivo y puede ser un vehículo vírico, fosfolípido sintético o un polímero catiónico sintético, que se usa en tecnologías para suministrar un gen diana.

La presente descripción se dirige además, a un procedimiento para el cribado de una sustancia antineoplásica para

tratar el cáncer de cuello uterino, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) tratar una muestra, que contiene un gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada, con una sustancia candidato antineoplásica; y

5

(b) seleccionar la sustancia candidato como una sustancia antineoplásica si la sustancia candidato desmetila el gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada.

Como se describe además, la muestra que contiene el gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada se puede preparar usando una línea celular, tejido o raspado de cáncer de cuello uterino. La etapa de tratar la muestra con la sustancia candidato se lleva a cabo poniendo en contacto entre sí la sustancia candidato antineoplásica y la muestra por un procedimiento convencional.

Los ejemplos de sustancias candidato que desmetilan el gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada, incluyen 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC), el inhibidor de histona desacetilasa tricotatina A, trapoxina, oxamflatino, N-hidroxi-N'-fenilactanodiamida (SAHA), CBHA (bis-hidroxiamida del ácido m-carboxicinámico), ácido butírico, ácido fenilbutírico, toxina HC, depsipéptido, N-acetildinalina, MS-275, y similares.

La etapa de seleccionar una sustancia candidato, que desmetila el gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada, como una sustancia antineoplásica, se puede llevar a cabo por comparación de la secuencia del gen *ADCYAP1* antes y después del tratamiento con la sustancia candidato antineoplásica.

La "comparación indirecta" se lleva a cabo evaluando el nivel de un ácido nucleico aislado de una primera fuente y el nivel de un ácido nucleico aislado de una segunda fuente, mediante el uso de una sonda de referencia que hibrida con cada uno de los ácidos nucleicos aislados de la primera y segunda fuentes, y comparando los resultados de la evaluación, determinando así las cantidades relativas de ácidos nucleicos en la muestra sin unión competitiva directa con las sondas de referencia. Como resultado, se pudo ver que la expresión de genes en el tejido tumoral era regulada por disminución y la expresión del gen *ADCYAP1* también era regulada por disminución.

Como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está operativamente unida a una secuencia de control adecuada capaz de llevar a cabo la expresión del ADN en un hospedante adecuado. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente un potencial inserto genómico. Una vez transformado en un hospedante adecuado, el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma del hospedante, o en algunos casos, puede integrarse en el propio genoma. Como se usa en el presente documento los términos "plásmido" y "vector, se usan a veces de forma intercambiable, porque el plásmido es la forma de vector más habitualmente usada en este momento. Para el fin de la presente invención, se usa preferiblemente el vector plasmídico. Un vector plasmídico típico que se puede usar para este fin contiene lo siguiente: (a) un origen de replicación mediante el cual se produce la replicación de forma eficaz de modo que se crean varios cientos de vectores plasmídicos por célula hospedante; (b) un gen resistente a antibiótico mediante el cual se pueden seleccionar las células hospedantes transformadas con el vector plasmídico; y (c) sitios de digestión de enzimas de restricción en los que se pueden insertar fragmentos de ADN extraño. Incluso si los sitios de digestión de enzimas de restricción no están presentes en el vector, el uso de un adaptador y conector oligonucleótido sintético convencional permite el ligado fácil entre el vector y los fragmentos de ADN extraño.

45

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la introducción de ADN en una célula hospedante de modo que el ADN se puede replicar, sea como un integrante cromosómico o como un elemento extracromosómico. En otras palabras, se refiere a introducir ADN externo en una célula para causar un cambio genético. En general, los procedimientos de transformación incluyen electroporación, precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2), microinyección, un procedimiento con acetato de litio-DMSO y similares. En general se usa una célula hospedante en la que un ADN introducido es introducido de forma muy eficaz y se expresa con alta eficacia, como un microorganismo recombinante transformado. Se usan todas las células microbianas incluyendo células procariotas y eucariotas. Específicamente, se pueden usar bacterias, levaduras, hongos y similares.

55

EJEMPLOS

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sera evidente para una persona experta en la materia que estos ejemplos son solo con fines ilustrativos.

60

En los siguientes ejemplos, solo se usó en particular un vector pcDNA3 como un vector de expresión, y no se ha descrito el uso de vectores víricos tales como un virus adenoasociado (AAV) como un vector de expresión. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia, que se puede usar un vector vírico conocido que es un vehículo génico para suministrar un gen para el tratamiento del cáncer de cuello uterino in vivo.

5

Además, en los siguientes ejemplos, se encontró que, cuando se introducía un vector recombinante que contiene un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*), se inhibía la proliferación de las células de cáncer de cuello uterino por el exceso de expresión del gen *ADCYAP1*. Sin embargo, será evidente para los expertos en la materia, que cuando el gen *ADCYAP1* cuya región promotora estaba metilada, se trata con un agente de desmetilación, el gen cuya expresión era inhibida se reactiva para inhibir la proliferación de células de

10

Ejemplo 1: Medición de la expresión del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) en tejido de cáncer de cuello uterino y línea celular de cáncer de cuello uterino

15

Con el fin de examinar la expresión de un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*) en tejido de cáncer de cuello uterino o una línea celular de cáncer de cuello uterino, se llevó a cabo hibridación en micromatrices de acuerdo con un protocolo estándar (Schena y col., *Science*, 270:467, 1995).

20

Se obtuvieron tejido tumoral de una paciente con cáncer de cuello uterino y tejido normal de una paciente con mioma que se había sometido a histerectomía, del Centro de Investigación de Metástasis del Cáncer, Yonsei University, y se aisló el ARN total de los tejidos. Para comparar de forma indirecta los niveles de expresión de genes entre el tejido normal y el tejido tumoral, se construyó ARN para la comparación de referencia (comparación indirecta).

25

Para construir el ARN para la comparación de referencia, el ARN total se aisló de la línea celular de cáncer de cuello uterino A549 (Banco de líneas celulares coreano: KCLB 10185), la línea celular de cáncer de estómago AGS (KCLB 21739), la línea celular de cáncer renal Caki-2 (KCLB 30047), la línea celular de cáncer de colon HCT116 (KCLB 10247), la línea celular de cáncer de cuello uterino Hela (KCLB 10002), las líneas celulares de cáncer de la sangre HK-60 (KCLB 10240) y HT1080 (KCLB 10121), la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 (KCLB 30026), la línea celular de cáncer de hígado SK-hep1 (KCLB 30052), la línea celular derivada de linfocitos T Molt-4 (KCLB 21582) y la línea celular de cáncer de cerebro U-87MG (KCLB 30014) usando el reactivo Tri (Sigma, EE.UU.). Para construir el ARN para la comparación de referencia, el ARN total aislado de las 11 líneas celulares se mezcló en la misma cantidad y se usó como un control interno.

35

Para comparar los niveles de expresión de genes relativos entre el tejido normal y el tejido tumoral, los ARN aislados de los tejidos normales y tumorales se compararon indirectamente con el ARN para la comparación de referencia. Específicamente, 100 µg de ARN total se marcaron con Cy3-dUTP o Cy5-dUTP, el ARN para la comparación de referencia se marcó con Cy3, y los ARN aislados de los tejidos se marcaron con Cy5. Los dos cADN marcados con Cy3 y Cy5 se purificaron usando un kit de purificación por PCR (Qiagen, Alemania). Los cADN purificados se mezclaron y concentraron hasta un volumen final de 27 µl usando Microcon YM-30 (Millipore Co., EE.UU.).

40

80 µl de una solución de reacción de hibridación (27 µl de diana de cADN marcada, 20 µl de 20x SSC, 8 µl de SDS al 1%, 24 µl de formamida (Sigma, EE.UU.) y 20 µl de ADN Cot1 humano (Invitrogen, EE.UU.)) se calentaron a 100°C durante 2 minutos, y después inmediatamente se hibridaron con una micromatriz de oligonucleótido de 35 K humano (GenomicTree, Inc., Corea) en una HybChamber X de humedad controlada (GenomicTree, Inc., Corea) a 42°C durante 12-16 horas. El portaobjetos con las micromatrices hibridadas se escaneó usando Axon 4000B (Axon Instrument Inc., EE.UU.). Se midieron las intensidades de fluorescencia de la señal y de fondo para cada sonda promediando las intensidades de todos los píxeles en un objetivo usando el software GenePix Pro 4.0 (Axon Instrument Inc., EE.UU.). Las manchas que mostraban clara anomalía se excluyeron del análisis. Todos los datos se sometieron a normalización, análisis estadístico y análisis de conglomerados usando GeneSpring 7.3 (Agilent, EE.UU.).

45

50

Además, para determinar la diferencia relativa en el nivel de expresión de genes entre los tejidos normales y tumorales, se llevó a cabo el análisis estadístico (ANOVA, $p < 0,01$) para la comparación indirecta. Como resultado, se mostró que 282 genes en el tejido tumoral eran todos regulados por disminución comparado con el tejido normal (véase la fig. 1).

55

Con el fin de examinar si la expresión de los genes es regulada por la metilación de los promotores de los genes, las líneas celulares de cáncer de cuello uterino C33A (ATCC HTB-31), SiHa (KCLB 30035), HeLa (KCLB 10002) y Caski

60

(KCLB 21550) se trataron con agente de desmetilación 200 nM 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC, Sigma, EE.UU.) durante 3 días. Las líneas celulares tratadas con DAC y las líneas celulares no tratadas con DAC se trataron con reactivo Tri, y se aisló el ARN total de las líneas celulares.

- 5 Con el fin de examinar el cambio en la expresión de genes causado por el tratamiento con DAC, se comparó el nivel de transcripción directamente entre las células no tratadas y las líneas celulares tratadas. Cada una de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino se cultivo en medio RPMI (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) que contenía FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin en las condiciones de 37°C y 5% de CO₂, y después se midieron las expresiones de los genes en el grupo tratado con DAC en comparación con el grupo de control no tratado con DAC. Como resultado se podía ver que aumentaban las expresiones de un total de 2.428 genes en el grupo tratado con DAC.

La lista de los 282 genes cuya expresión era regulada por disminución en el tejido de cáncer de cuello uterino se comparó con la lista de los 2.428 genes reexpresados, y se seleccionaron 34 genes comunes que eran comunes entre las dos listas como genes candidatos cuya expresión es regulada por disminución por metilación en células de cáncer de cuello uterino (véase la fig. 1).

Para encontrar la presencia de islas de CpG en las regiones promotoras de los 34 genes, se usó MethPrimer (<http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html>). Entre los 34 genes, 14 genes no tenían islas de CpG y se excluyeron de la lista común de genes (véase la fig. 1).

Para encontrar un gen que es expresado por metilación entre los 20 genes, se midieron los grados de metilación de los genes en 4 líneas de cáncer de cuello uterino (C33A (ATCC HTB-31), SiHa (KCLB 30035), HeLa (KCLB 10002) y Caski (KCLB 21550)) por pirosecuenciación. Como resultado, se seleccionó el *ADCYAP1* que mostraba hipermetilación en 3 o más de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino como un gen cuya función de supresión de cáncer se va a examinar (véase la fig. 1). La fig. 2 muestra los resultados del análisis de micromatrices, que indica que el gen *ADCYAP1* era expresado por disminución en las células de cáncer de cuello uterino y reexpresado en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino tratadas con DAC.

30 Ejemplo 2: Medición de la metilación del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) en línea celular de cáncer de cuello uterino

Con el fin de examinar si la reexpresión del gen *ADCYAP1* en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino, mostrada en el ejemplo 1, se puede atribuir a la desmetilación, se midió el grado de metilación del gen en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino.

Específicamente, para convertir la citosina no metilada en uracilo por tratamiento con bisulfato, se aisló el gADN total de las líneas celulares de cáncer de cuello uterino C33A (ATCC HTB-31), SiHa (KCLB 30035), HeLa (KCLB 10002) y Caski (KCLB 21550), y 200 ng de gADN se trató con bisulfito usando un kit EZ DNA Methylation-gold kit (Zymo Research, EE.UU.), después de lo cual se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se usó en la pirosecuenciación.

Los cebadores de PCR y secuenciación para llevar a cabo la pirosecuenciación del gen *ADCYAP1* se diseñaron usando el programa de diseño de ensayo PSQ (Biotage, EE.UU.). Los cebadores de PCR y secuenciación para medir la metilación del gen *ADCYAP1* se muestran en la siguiente tabla 1.

45

Tabla 1
Cebadores de PCR y secuenciación para la pirosecuenciación del gen *ADCYAP1*

Cebadores	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')	posición ^a	SEQ ID NO.	Tamaño del producto amplificado
directo	gggtggatt tayggtatt ttgt	-1.210	3	345 bp
inverso	Biotina-aaatttccctccttacc	-884	4	
secuenciación	g gttttgttt agatatta	-1.011	5	

posición^a: posición desde el punto de inicio de la transición (+1): nucleótido

y: C o T

50

La secuencia de nucleótidos amplificada con los cebadores de la tabla 1 después de tratamiento con bisulfito, y la secuencia de nucleótidos analizada para el cebador de secuenciación y la medición de la metilación se muestran en la SEQ ID NO: 6 a continuación. La secuencia de nucleótidos subrayada es una secuencia de nucleótidos analizada para medir la metilación de la región de isla de CpG, y la parte indicada por "y (C o T)" indica citosina de la región de

isla de CpG.

```

      SEQ  ID  NOS:  6:  5'-gggtggatt  tayggttatt  ttgtttttty
gygtttttatt  ttatygtttt  tttttttttt  tttttgtttt  tttttttgyg
tttttttttt  ttygtgttay  gttttttttt  ggttttgygy  gtttataaat
ttttgagtag  aataygagtt  tyggtaaayg  agtttygtag  ttttttttgt .
tgttttygtt  ggtttttgyg  gttttttgtt  agatattaay  gtagayggy
gatgtttttt  gggtggtgat  tttagygtag  gaatttgaag  aagygttttg
tttygtgttt  tttttggtag  ttttttttgt  agygggagga
gttgaagggttaagggagggaaaattt-3'

```

5

Se amplificaron 20 ng de gADN tratado con bisulfito por PCR. Específicamente, una solución de reacción de PCR (20 ng de ADN tratado con bisulfito, 5 µl de 10X tampón de PCR (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), 2 µl de cebadores de la PCR 10 pmol/µl) se trató a 95°C durante 5 minutos, y después se sometió a PCR en las siguientes condiciones: 45 ciclos de 40 s a 95°C, 45 s a 60°C y 40 s a 72°C, seguido de 5 min a 72°C. La amplificación del producto de la PCR se confirmó por electroforesis usando gel de agarosa al 2,0%.

10

El producto de la PCR amplificado se sometió a pirosecuenciación usando el reactivo PyroGold (Biotage, EE.UU.) mediante un sistema PSQ96MA (Biotage, EE.UU.). Después de pirosecuenciación, se determinó el grado de metilación calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa media de unión de citosina a cada isla de CpG. En el caso del gen *ADCYAP1*, se midió el grado de metilación de las 4 regiones de islas de CpG.

15

Como resultado, la región promotora del gen *ADCYAP1* no estaba metilada (menos de 10%) en la línea celular C33A (ATCC HTB-31) y estaba hipermetilada (50% o más) en las líneas celulares SiHa (KCLB 30035), HeLa (KCLB 10002) y Caski (KCLB 21550) (véase la fig. 3A).

20

Ejemplo 3: Medición de la metilación del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipótesis) en tejido de cáncer de cuello uterino

25

Con el fin de examinar si la disminución en la expresión del gen *ADCYAP1* en el tejido de cáncer de cuello uterino se puede atribuir a la metilación, se analizó cuantitativamente el grado de metilación por pirosecuenciación.

Se obtuvieron tejidos de cuello uterino normales (Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Nacional Universitario de Chungnam) y tejidos quirúrgicos de pacientes de cáncer (Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Nacional Universitario de Chungnam), y se midieron los grados de metilación del gen *ADCYAP1* en los tejidos tumorales y los tejidos normales. Se aisló el ADN genómico de cada uno de los tejidos tumorales y los tejidos normales usando un kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, EE.UU.), y 200 ng del gADN aislado se trataron con bisulfito usando el kit EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo Research, EE.UU.). El ADN tratado con bisulfito se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se usó en la pirosecuenciación.

30

35

Se amplificaron 20 ng de gADN tratado con bisulfito por PCR. Una solución de reacción de PCR (20 ng de ADN tratado con bisulfito, 5 µl de 10X tampón de PCR (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl de cebadores de la PCR 10 pmol/µl) se trató a 95°C durante 5 minutos, y después se sometió a PCR en las siguientes condiciones: 45 ciclos de 40 s a 95°C, 45 s a 60°C y 40 s a 72°C, seguido de 5 min a 72°C. La amplificación del producto de la PCR se confirmó por electroforesis usando gel de agarosa al 2,0%.

40

El producto de la PCR se sometió a pirosecuenciación usando el reactivo PyroGold mediante un sistema PSQ96MA (Biotage, EE.UU.). Después de pirosecuenciación, se determinó el grado de metilación calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa media de unión de citosina que se une a cada isla de CpG.

45

Como resultado, se mostró que el gen *ADCYAP1* era metilado en niveles muy bajos (menos de 20%) en los tejidos normales, pero era metilado en niveles muy altos (20% o superiores) en la mayoría de los tejidos de cáncer (véase la fig. 3B). Dichos resultados indican que la disminución en la expresión del gen *ADCYAP1* en el tejido de cáncer de

Ejemplo 4: Medición de la metilación del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) en raspado de cáncer de cuello uterino

Con el fin de examinar si la disminución en la expresión del gen *ADCYAP1* en el raspado de cáncer de cuello uterino se puede atribuir a la metilación, se analizó cuantitativamente el grado de metilación por pirosecuenciación.

Se obtuvieron raspados de cuello uterino normales (Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Nacional Universitario de Chungnam) y raspados de cuello uterino de pacientes de cáncer (Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Nacional Universitario de Chungnam), y se midieron los grados de metilación del gen *ADCYAP1* en los tejidos tumorales y los tejidos normales. Se aisló el ADN genómico de cada uno de los raspados de cuello uterino de cáncer y normales usando un kit QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN, EE.UU.), y 200 ng del gADN aislado se trataron con bisulfito usando un kit EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo Research, EE.UU.). El ADN tratado con bisulfito se eluyó con 20 µl de agua destilada estéril y se usó en la pirosecuenciación.

Se amplificaron 20 ng de gADN tratado con bisulfito por PCR. Una solución de reacción de PCR (20 ng de ADN tratado con bisulfito, 5 µl de 10X tampón de PCR (Enzynomics, Corea), 5 unidades de polimerasa Taq (Enzynomics, Corea), 4 µl de dNTP 2,5 mM (Solgent, Corea), y 2 µl de cebadores de la PCR 10 pmol/µl) se trató a 95°C durante 5 minutos, y después se sometió a PCR en las siguientes condiciones: 45 ciclos de 40 s a 95°C, 45 s a 60°C y 40 s a 72°C, seguido de 5 min a 72°C. La amplificación del producto de la PCR se confirmó por electroforesis usando gel de agarosa al 2,0%.

El producto de la PCR se sometió a pirosecuenciación usando el reactivo PyroGold (Biotage, EE.UU.) mediante un sistema PSQ96MA (Biotage, EE.UU.). Después de pirosecuenciación, se determinó el grado de metilación calculando el índice de metilación. El índice de metilación se calculó determinando la tasa media de unión de citosina que se une a cada isla de CpG.

Como resultado, se mostró que el gen *ADCYAP1* era metilado en niveles muy bajos (menos de 10%) en los raspados de cuello uterino normales, pero era metilado con niveles altos de 10% o superiores, en la mayoría de los tejidos de cáncer ($p < 0,0001$, fig. 4A). Además, se examinó si el cáncer de cuello uterino se puede diagnosticar usando el grado de metilación del gen *ADCYAP1* por el análisis de la curva ROC usando el programa MedCalc (Bélgica). Como resultado, el gen *ADCYAP1* mostró una sensibilidad muy alta de 85,7% y una especificidad muy alta de 95,2% (véase la fig. 4B). Dichos resultados indican que la expresión del gen *ADCYAP1* disminuye por metilación en el raspado de cáncer de cuello uterino.

Ejemplo 5: Construcción del vector para la expresión del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis)

Con el fin de construir un vector de expresión para la expresión del gen *ADCYAP1* en células, se adquirió un clon de cADN de 531-pb (SEQ ID NO: 1) que comprendía un gen *ADCYAP1* de longitud completa, en Invitrogen. Para clonar la secuencia de nucleótidos de 531-pb en los sitios *HindIII* y *XhoI* de un vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, EE.UU.), se llevó a cabo la PCR. Para la amplificación por PCR, se usaron los cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8. El gen *ADCYAP1* se clonó en los sitios *HindIII* y *XhoI* del vector de expresión pcDNA3, construyendo así un vector de expresión del gen *ADCYAP1* (p*ADCYAP1*).

SEQ ID NO: 7: 5'-ttt aagctt atgacatgt gtagcggagc-3'
SEQ ID NO: 8: 5'-ttc ctcgag ctacaaataagctattcggc-3'

Ejemplo 6: Introducción del gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) en células de cáncer de cuello uterino y medición de si el gen inhibe la proliferación de células de cáncer

Con el fin de examinar el efecto del exceso de expresión del gen que codifica *ADCYAP1* en la apoptosis de células de cáncer de cuello uterino, se llevó a cabo un ensayo TUNEL.

Para llevar a cabo un experimento de apoptosis, se sembró la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa (KCLB

10002) en una cámara de 4 pocillos con una concentración de $1,75 \times 10^4$ células/pocillo y se cultivó en un incubador con 5% de CO₂ (Forma Scientific Inc.) usando un medio DMEM (Gibco, EE.UU.) que contenía FBS al 10% (Sigma, EE.UU.), penicilina (100 unidades/ml, WelGENE, Corea) y estreptomina (100 unidades/ml) a 37°C durante 24 horas.

5

Las células de cáncer de cuello uterino cultivadas se transfectaron con el vector de expresión del gen *ADCYAP1* (*pADCYAP1*) (construido en el ejemplo 5) usando un reactivo de transfección Eugene HD (Roche Applied Science). Como un control, se transfectaron células con pcDNA3 que no contenía gen *ADCYAP1*. Las células transfectadas se incubaron durante 48 horas, y después se fijaron con PFA al 4% (paraformaldehído). Después, se añadió una
10 mezcla de ensayo TUNEL (Roche Applied Science) a cada pocillo y se incubaron en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C durante 1 hora. Después de separar el reactivo, se observó la apoptosis de las células con un microscopio de fluorescencia.

Como resultado, en las células de cáncer de cuello uterino en las que se introdujo el vector de expresión *pADCYAP1*
15 que contenía el gen *ADCYAP1*, aumentó significativamente la fragmentación de ADN intranuclear (apoptosis) con el paso del tiempo de cultivo de las células (véase la fig. 5A). Además, los resultados de medición de la curva de crecimiento celular después de transfección indicaban que el crecimiento de la línea celular en la que se había introducido el vector de expresión *pADCYAP1* era inhibido significativamente (véase la fig. 5B). Esto sugiere que el gen *ADCYAP1* o su proteína pueden inducir la apoptosis de células de cáncer de cuello uterino y se pueden usar
20 como un agente para el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Ejemplo 7: Medición de si la proliferación de células de cáncer de cuello uterino es inhibida por el tratamiento con fragmento peptídico del polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis)

25 Con el fin de examinar si es inducida la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino cuando las células de cáncer de cuello uterino se tratan con un fragmento de péptido de la proteína *ADCYAP1*, se llevó a cabo un ensayo de WST.

Para llevar a cabo un ensayo de apoptosis, la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa (KCLB 10002) se cultivó
30 en una placa de 6 pocillos en una concentración de 5×10^4 células, y después se trató con 1 nM o 100 nM de cada uno de un fragmento peptídico de *ADCYAP1* (1-27) (GenScript, EE.UU.) y un fragmento peptídico de *ADCYAP1* (1-38) (GenScript, EE.UU.) en agua destilada durante 18 horas.

ADCYAP1 (1-27): HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH₂ (C-terminal NH₂ modificado; SEQ ID NO: 9); un
35 fragmento peptídico que tiene los primeros 27 restos de aminoácidos desde el extremo N de la proteína *ADCYAP1*.

ADCYAP1 (1-38): HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK- NH₂ (C-terminal NH₂ modificado; SEQ ID NO: 10); un fragmento peptídico que tiene los primeros 30 restos de aminoácidos desde el extremo N de la proteína *ADCYAP1*.
40

Se añadieron 10 µl del reactivo (Takara, Japón) a cada grupo de control (no tratado con el fragmento peptídico) y los grupos de células tratados con el fragmento peptídico para inducir desarrollo de color y se midió la absorbancia a 480 nm usando un lector de microplaca. Como resultado, la absorbancia de las células tratadas con cada uno del fragmento peptídico 1 nM y el fragmento peptídico 100 nM disminuyó en 20% o más comparado con la del grupo de
45 control (no tratado con el fragmento peptídico), sugiriendo que el fragmento peptídico de *ADCYAP1* inhibe el crecimiento de la línea celular de cáncer de cuello uterino en 20% o más (véase la fig. 6A).

Además, se cultivó la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa (KCLB 10002) en una placa de 6 pocillos en una concentración de $2,5 \times 10^5$ células, y después se trató con 100 nM de cada uno del fragmento peptídico de *ADCYAP1*
50 (1-27) y el fragmento peptídico de *ADCYAP1* (1-38) en agua destilada durante 18 horas. Se observó el crecimiento de las células no tratadas con el fragmento peptídico de *ADCYAP1* y de las células tratadas con el fragmento peptídico de *ADCYAP1* con un microscopio óptico (véase la fig. 6B). Como resultado, el crecimiento de las células de cáncer de cuello uterino tratadas con cada uno del fragmento peptídico de *ADCYAP1* (1-27) y el fragmento peptídico de *ADCYAP1* (1-38) se inhibió significativamente.
55

Los resultados anteriores sugieren que la proteína *ADCYAP1* o el fragmento peptídico de la proteína *ADCYAP1* pueden inducir la apoptosis de células de cáncer de cuello uterino y se puede usar como un agente para tratar el cáncer de cuello uterino.

60 Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito antes, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la proliferación de células de cáncer de cuello uterino y tratar el cáncer de cuello uterino, que contiene un vector recombinante que comprende un gen de SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (*ADCYAP1*), o un fragmento del gen, o el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 de SEQ ID NO: 2, o un fragmento.

Lista de secuencias

10 <110> GenomicTree, Inc.

<120> Vector recombinante que contiene un gen que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) para la inhibición del crecimiento de células de cáncer de cuello uterino y composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de cuello uterino usando la misma

15

<130> PP-B1005

<150> KR10-2010-0060196

<151> 2010-06-24

20

<160> 10

<170> KopatentIn 1. 71

25 <210> 1

<211> 531

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

atgacccatgt gtagcggagc gaggtctggcc ctgctgggtct atgggataat catgcacagc	60
agcgtctaca gctcacctgc cgccgcccga ctccgggttcc ccgggatcag gccagaggaa	120
gagggctacg gcgaggacgg aaaccgcgtg ccagacttcg atggctcgga gccgccgggc	180
gcagggagcc ccgcctccgc gccgcgcgcc gccgcgcct ggtaccgccc ggccgggaga	240
agagatgtcg ccacgggat ccttaacgag gcctaccgca aagtgtgga ccagctgtcc	300
gccgggaagc acctgcagtc gctcgtggcc cggggcgtgg gtgggagcct cggcggcggc	360
gcgggggacg acgcggagcc gctctccaag cgccactcgg acgggatctt cacggacagc	420
tacagccgct accggaaaca aatggctgtc aagaaatact tggcggccgt cctaggggaag	480
aggtataaac aaagggttaa aaacaaagga cgccgaatag cttatttgta g	531

<210> 2

<211> 176

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Met Cys Ser Gly Ala Arg Leu Ala Leu Leu Val Tyr Gly Ile
1 5 10 15
Ile Met His Ser Ser Val Tyr Ser Ser Pro Ala Ala Ala Gly Leu Arg
20 25 30
Phe Pro Gly Ile Arg Pro Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Glu Asp Gly Asn
35 40 45
Pro Leu Pro Asp Phe Asp Gly Ser Glu Pro Pro Gly Ala Gly Ser Pro
50 55 60
Ala Ser Ala Pro Arg Ala Ala Ala Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Gly Arg
65 70 75 80
Arg Asp Val Ala His Gly Ile Leu Asn Glu Ala Tyr Arg Lys Val Leu
85 90 95
Asp Gln Leu Ser Ala Gly Lys His Leu Gln Ser Leu Val Ala Arg Gly
100 105 110
Val Gly Gly Ser Leu Gly Gly Gly Ala Gly Asp Asp Ala Glu Pro Leu
115 120 125
Ser Lys Arg His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr
130 135 140
Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys
145 150 155 160
Arg Tyr Lys Gln Arg Val Lys Asn Lys Gly Arg Arg Ile Ala Tyr Leu
165 170 175

<210> 3
5 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> cebador

<400> 3
gggtggattt ayggttattt tgt

23

15 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 4
aaattttccc tccttacc

19

25

	<210> 5		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 5		
10	ggttttttggt tagatatta		19
	<210> 6		
	<211> 345		
	<212> ADN		
15	<213> Home sapiens		
	<400> 6		
	gggtggattt aygggttattt tgtttttttyg ygtttttattt tatygttttt tttttttttt		60
	ttttgttttt ttttttgygt tttttttttt tygtgttayg tttttttttg gttttgygyg		120
	tttataaatt tttgagtaga ataygagttt yggtaaayga gtttygtagt tttttttggt		180
	gttttygttg gtttttgygg tttttgttta gatattaayg ttagayggyg atgttttttyg		240
	ggtggtgatt ttagygtagg aatttgaaga agygttttgt tygtygtttt atttggtagt		300
	ttttttggtt gygggaggag ttgaagggtt agggagggaa aattt		345
20	<210> 7		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 7		
30	tttaagctta tgaccatgtg tagcggagc		29
	<210> 8		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 8		
40	ttcctcgagc tacaataag ctattcggc		29
	<210> 9		
	<211> 27		
	<212> PRT		
45	<213> Home sapiens		
	<400> 9		

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 10

<211> 38

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, en donde la composición comprende
- 5 (i) un vector recombinante que comprende un gen de SEQ ID NO: 1 que codifica el polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (ADCYAP1; NM_001099733), o un gen que codifica un fragmento de ADCYAP1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10, como un principio activo, o
- (ii) polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1 (hipófisis) (ADCYAP1; NM_001099733) de SEQ ID NO: 2, o un
- 10 fragmento de ADCYAP1 que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9 o 10 como principio activo, para usar en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

FIG. 1

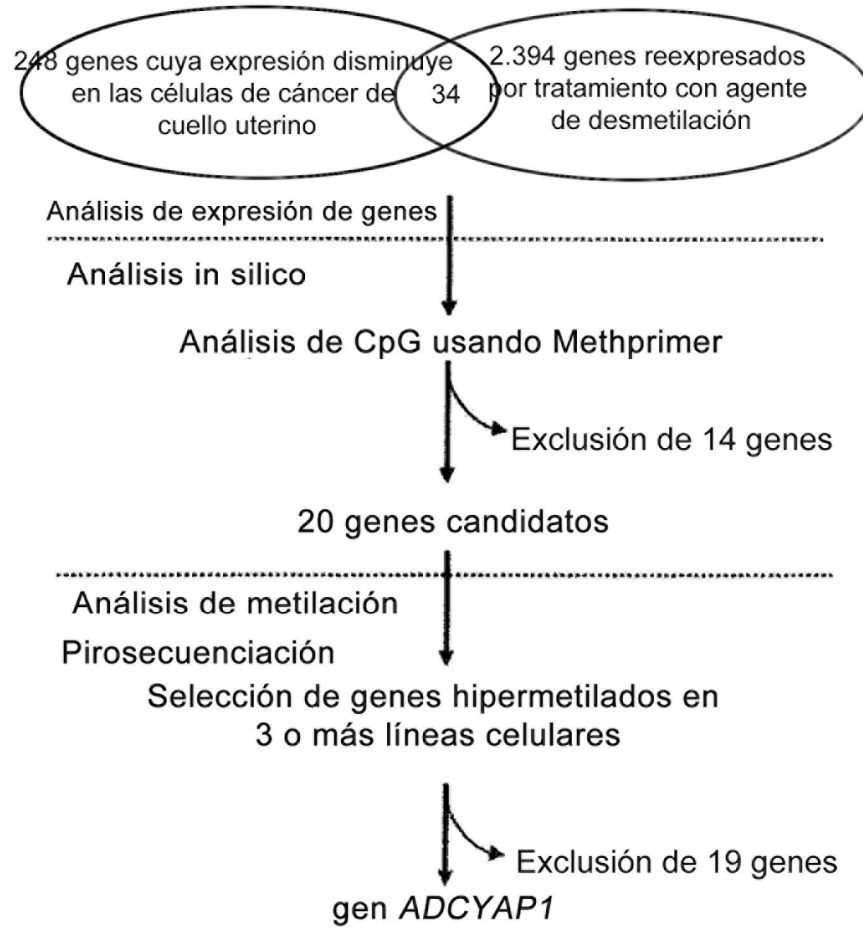


FIG. 2

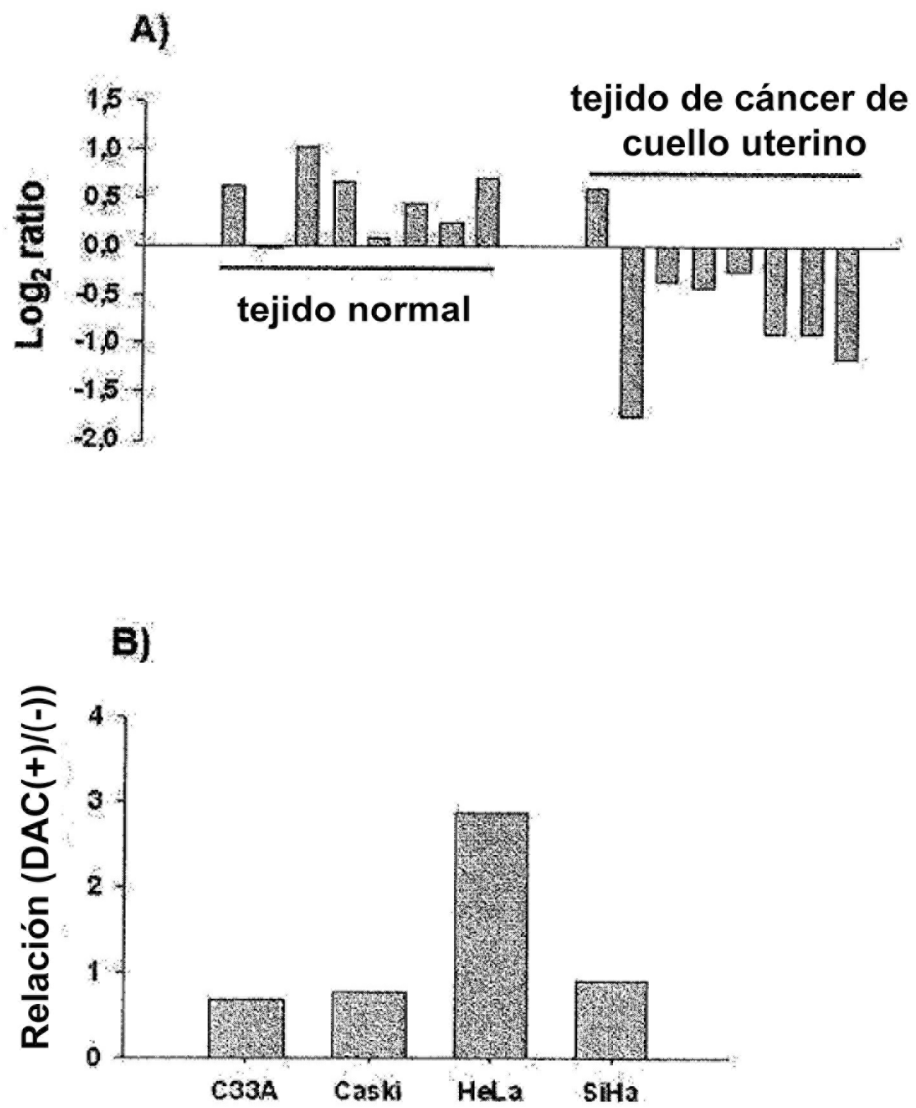


FIG. 3

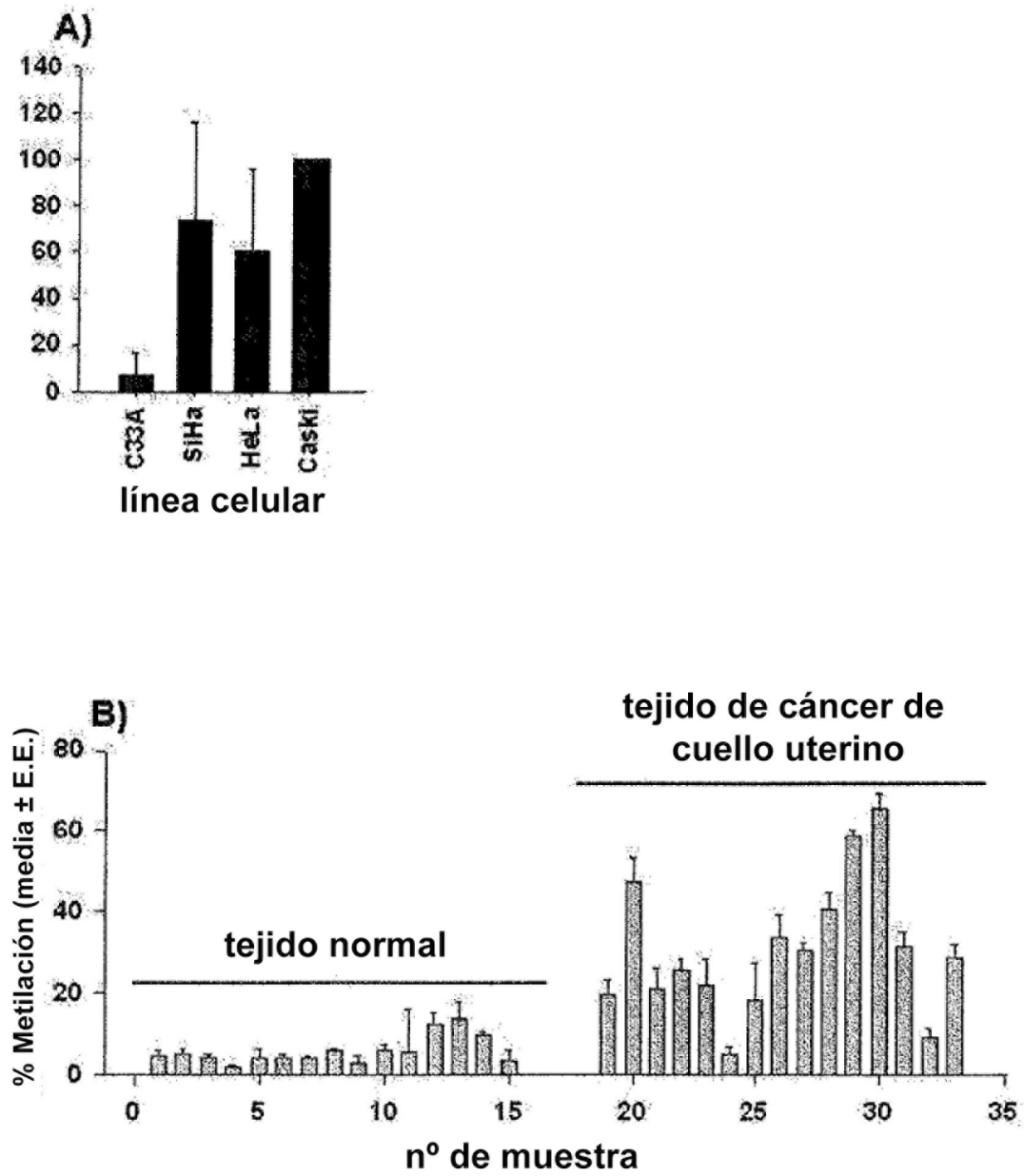
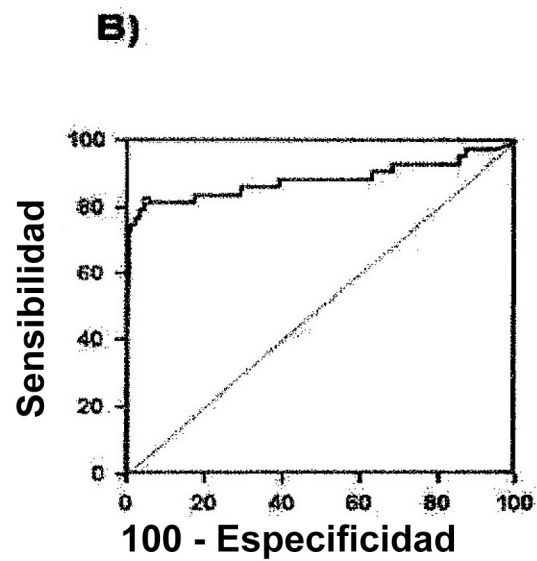
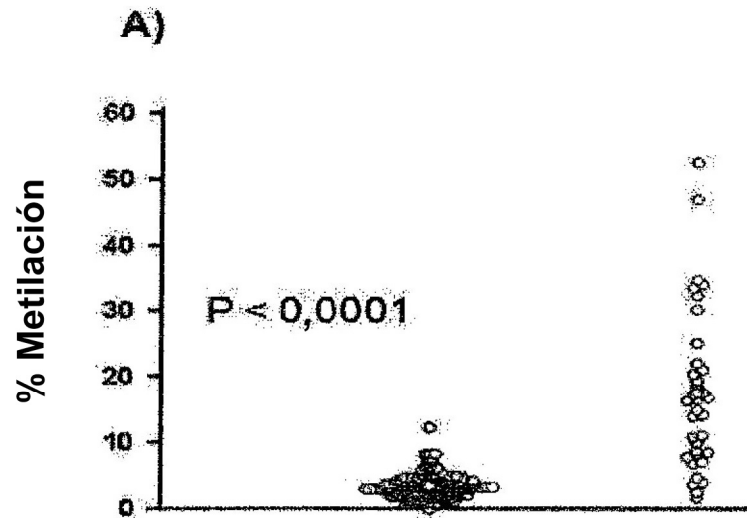


FIG. 4



AUC = 0,923 (0,877 - 0,956)
 Valor de $p = 0,0001$
 Umbral = 6,48
 Sensibilidad = 85,7% (69,7% - 95,1%)
 Especificidad = 95,2% (90,7% - 97,9%)

FIG. 5

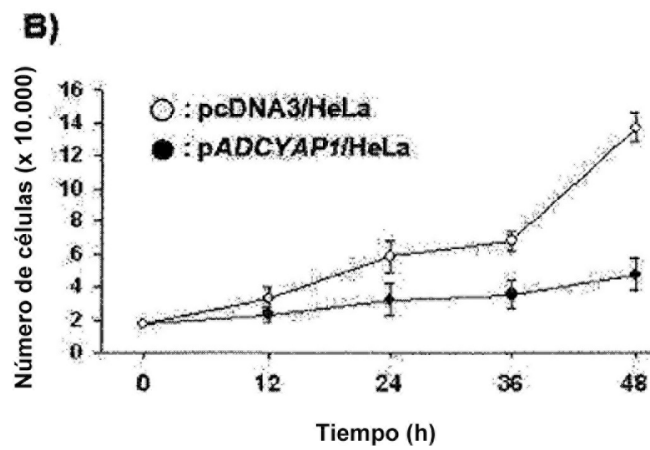
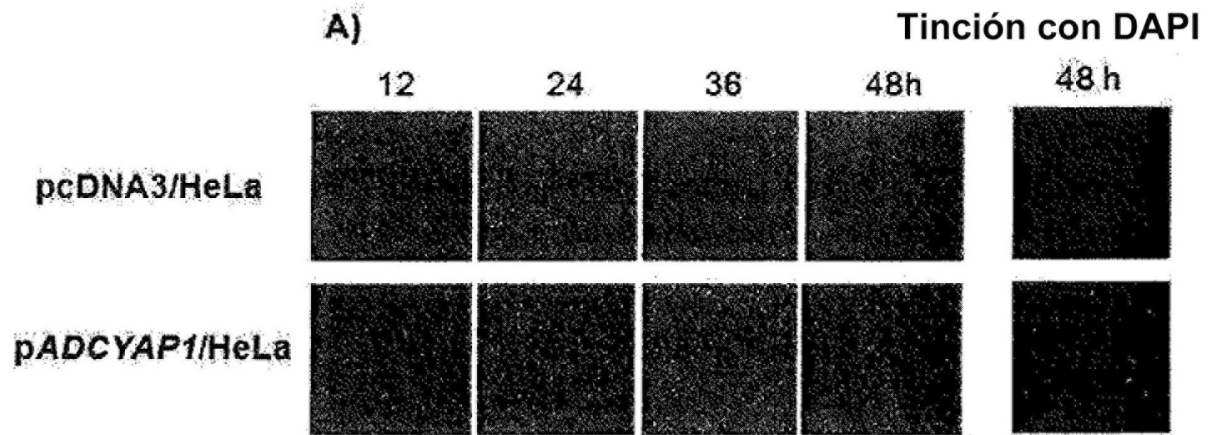
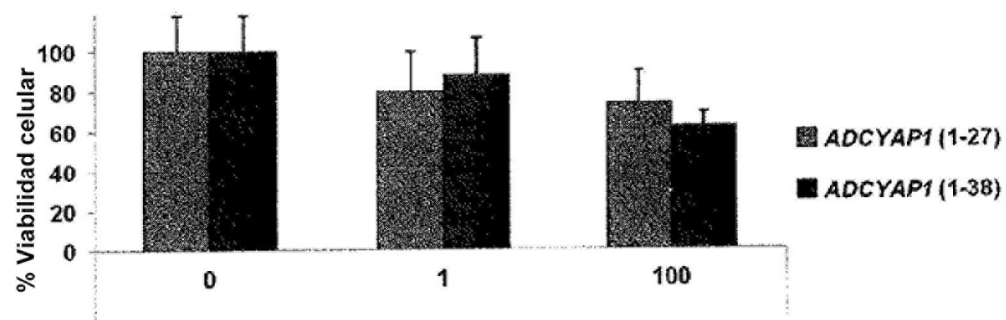


FIG. 6

A



B

