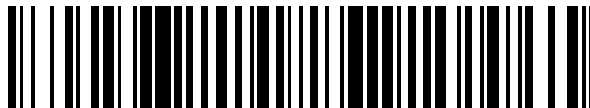


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 068**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2018 PCT/NL2018/050143**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018 WO18164577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2018 E 18710572 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2022 EP 3592867**

54 Título: **Clasificador de metilación para detección de cánceres invasivos inducidos por HPV, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV y sus lesiones precursoras de alto grado**

30 Prioridad:  
**10.03.2017 EP 17160346**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2022**

73 Titular/es:  
**SELF-SCREEN B.V. (100.0%)  
Biothof 15 1  
1098 RX Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:  
**MEIJER, CHRISTOPHORUS JOHANNES  
LAMBERTUS MARIA;  
STEENBERGEN, RENSKÉ DANIËLA MARIA;  
SNIJDERS, PETRUS JOSEPHUS FERDINANDUS y  
HEIDEMAN, DANIËLLE ANNE MARIE**

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 2 928 068 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

Clasificador de metilación para detección de cánceres invasivos inducidos por HPV, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV y sus lesiones precursoras de alto grado

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere al campo de la prevención del cáncer y el diagnóstico médico; y se refiere a un ensayo de diagnóstico molecular para cánceres, especialmente cánceres invasivos inducidos por virus del papiloma humano (HPV) y lesiones precursoras de alto grado de los mismos tales como cáncer cervicouterino invasivo y lesiones cervicouterinas premalignas, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV. En particular, la presente invención se refiere al uso de un clasificador de metilación basado en los genes LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 y sus secuencias reguladoras como marcador para cánceres invasivos inducidos por hrHPV, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV y sus lesiones premalignas con potencial invasivo.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer cervicouterino es el cuarto cáncer más común en las mujeres a nivel mundial y es responsable de aproximadamente 250.000 muertes por cáncer al año.

El desarrollo del carcinoma cervicouterino de células escamosas se caracteriza por una secuencia de lesiones premalignas, denominadas neoplasia intraepitelial cervicouterina (CIN), que se clasifican del 1 al 3, y se refieren a displasia leve (CIN 1), displasia moderada (CIN 2) y displasia grave/carcinoma *in situ* (CIN 3), respectivamente. CIN 1 también se denomina lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y CIN 2 y CIN 3, conjuntamente, lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL). Para el adenocarcinoma cervicouterino, el adenocarcinoma *in situ* (ACIS) es una lesión precursora establecida. En principio, estas lesiones premalignas son reversibles aunque, cuanto más grave sea la lesión, menor será la probabilidad de regresión espontánea. El cáncer cervicouterino se considera una enfermedad prevenible debido a que los estadios premalignos pueden detectarse mediante citología exfoliativa y tratarse cuando sea necesario con relativa facilidad únicamente con efectos secundarios menores. El cribado cervicouterino tiene como objetivo el diagnóstico precoz de las lesiones premalignas de alto grado (es decir, CIN 2/3 y adenocarcinoma *in situ*) y las lesiones cancerosas tratables, para reducir de ese modo la mortalidad del cáncer cervicouterino invasivo. La práctica médica general comprende el tratamiento de todas las mujeres con CIN 2, CIN 3 y adenocarcinoma *in situ* confirmadas morfológicamente para prevenir el desarrollo del cáncer cervicouterino.

Durante la última década se ha establecido bien que la carcinogénesis cervicouterina se inicia con una infección del virus del papiloma humano de alto riesgo (hrHPV). Se ha demostrado que la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, que alteran las vías supresoras tumorales p53 y Rb, respectivamente, es esencial tanto para el inicio de la oncogénesis como para el mantenimiento de un fenotipo maligno. Por tanto, los ensayos de hrHPV aparecieron como una herramienta atractiva de cribado primario. Sin embargo, de forma consecuente con un proceso de carcinogénesis de múltiples etapas, se requieren alteraciones adicionales en el genoma de la célula hospedadora para la progresión de una célula infectada por hrHPV a una célula cancerosa invasiva. Solo una pequeña proporción de mujeres infectadas con HPV de alto riesgo desarrollará lesiones cervicouterinas premalignas de alto grado (CIN 2/3) y, si permanecen sin tratamiento, cáncer cervicouterino. En la mayoría de las mujeres con lesiones premalignas cervicouterinas, las lesiones remiten espontáneamente. De las mujeres que participan en el cribado de población, aproximadamente un 5-6 % presentan un ensayo positivo para hrHPV. Sin embargo, solo un máximo de un 20 % de las mismas (1 % de las mujeres participantes) presentan  $\geq$ CIN 2/3. Por tanto, el cribado primario mediante ensayo de hrHPV tendrá que ir acompañado de un número considerable de procedimientos de seguimiento redundantes y de una ansiedad innecesaria entre las mujeres, a menos que puedan aplicarse marcadores a los frotis cervicouterinos que permitan la estratificación de las mujeres positivas para hrHPV para riesgo de  $\geq$ CIN 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma *in situ*.

Un desafío principal es reducir el porcentaje de mujeres con ensayo positivo para HPV a las que presentan lesiones clínicamente significativas. Una forma es usar la citología como ensayo secundario (denominado triaje) para mujeres positivas para hrHPV. Aún así, esto deja fuera un número considerable de mujeres positivas para hrHPV con citología normal (3,5 % de las mujeres en la población de cribado), de las cuales aún un 10 % presentan o adquieren  $\geq$ CIN 3. Además, la citología no es una opción para muestras cervicovaginales automuestreadas que puedan tomarse en casa, dado que estas no serían representativas del estado citológico cervicouterino. Otra forma es usar genotipado de HPV16/18. Sin embargo, esto deja fuera a mujeres con tipos distintos al HPV16/18 que, aunque en menor grado, también presentan alto riesgo de  $\geq$ CIN 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma *in situ*. Por tanto, existe la necesidad de herramientas de triaje complementarias o alternativas para estratificar mujeres positivas para hrHPV en aquellas con y sin  $\geq$ CIN 2/3 y  $\geq$ adenocarcinoma *in situ*.

El cribado primario de cáncer cervicouterino usando marcadores de enfermedad basados en cambios de la célula hospedadora en los genes cancerosos proporciona una alternativa prometedora, siempre que la especificidad y la sensibilidad sean suficientemente altas. Esta opción es de interés particular para países de ingresos bajos a medios,

donde no existe citología de calidad controlada y es complicada la implementación de algoritmos de seguimiento para mujeres positivas para HPV. En estos países, el automuestreo ha demostrado facilitar el acceso al cribado cervicouterino (Laczano-Ponce *et al.*, Lancet. 2011; 378: 1868-1873). En este sentido, es extremadamente útil tener marcadores que también prevalezcan en automuestras. Parece que existe una gran diferencia en el "comportamiento" de los marcadores entre los frotis vaginales obtenidos por personal médico especializado, tal como médicos o enfermeras, y los hisopos vaginales recogidos por la propia mujer. Parece que muchos marcadores que serían adecuados para muestras proporcionadas por médicos no son útiles en las automuestras. La necesidad de trabajar con automuestras, en lugar de muestras médicas, es elevada en los países de ingresos bajos y medios, dado que en esos países hay menos personal médico per cápita y a menudo el hecho de dejar que otras personas tomen una muestra vaginal representa un problema cultural. Además, incluso en los países altamente desarrollados, la automuestra es una forma ideal de reducir los costes de obtención de muestras vaginales para el cribado del cáncer cervicouterino a gran escala. Cabe esperar una tasa de aceptación aún mayor cuando puedan usarse muestras de orina para la detección precoz de cáncer.

El cáncer endometrial es la neoplasia maligna ginecológica más común en numerosos países desarrollados (Siegel *et al.*, CA Cancer J. Clin., 64 (2014), pág. 9-29). El cáncer endometrial en estadio precoz tiene un pronóstico muy bueno. Por tanto, la detección precoz aumentará las posibilidades de curación y evitará o reducirá una intervención terapéutica problemática y costosa. Dado que se ha demostrado el desprendimiento de células tumorales en los raspados cervicouterinos, es factible la detección precoz de cáncer endometrial mediante toma de muestra no invasiva. Sin embargo, la citología convencional en raspados cervicouterinos tiene una sensibilidad muy baja para la detección de cáncer endometrial. Someter a ensayo alteraciones moleculares, tales como metilación de ADN, asociadas al cáncer endometrial, puede proporcionar un enfoque prometedor para la detección precoz de cáncer endometrial (de Strooper *et al.*, J Clin Pathol. 2014;67(12):1067-71, Bakkum-Gamez *et al.* Gynecol Oncol. 2015; 137(1):14-22). Asimismo, recientemente se ha propuesto someter a ensayo alteraciones de ADN específicas de cáncer en raspados cervicouterinos para la detección de cáncer ovárico (Kindle *et al.*, Sci Transl Med. 2013; 5(167):1-21). El documento de Patente WO2016/048138 desvela un método para identificar si una célula cervicouterina es neoplásica o está predispuesta a neoplasia en una muestra aislada, que comprende determinar la hipermetilación en genes marcadores que incluyen LHX8. SANJA A FARKAS *et al.* (EPIGENETICS, vol. 8, n.º 11, 1 de noviembre de 2013, 1213-1225) también desvela genes altamente metilados en cáncer cervicouterino, incluyendo ST6GALNAC5 y LHX8. MICHAEL P. TRIMARCHI *et al.* (PLOS ONE, vol. 12, n.º 3, 9 de marzo de 2017, e0173 242) desvela ASCL1 en una firma de metilación capaz de detectar cáncer endometrial. El documento de Patente WO2017/034407 desvela un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV y cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV, comprendiendo dicho método la detección de hipermetilación en GHSR y/o ZIC1. El documento de Patente WO2016/115354 desvela un método para evaluar si un sujeto tiene una neoplasia de ovario, que comprende las etapas de determinar la hipermetilación de al menos un gen diana seleccionado entre un grupo que comprende ZIC1. El documento de Patente WO2013/174432 desvela la hipermetilación de ASCL1 en cáncer ovárico.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Los presentes inventores han descubierto un método para detectar cánceres invasivos inducidos por HPV, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV, y sus lesiones precancerosas de alto grado, en donde dicho método comprende la detección de hipermetilación en la secuencia génica de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 o en la secuencia reguladora de estos genes en una célula, mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, cánceres invasivos inducidos por HPV y/o cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV. Preferentemente, en tal método, dicha lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV es una lesión cervicouterina premaligna de alto grado o cáncer cervicouterino invasivo, más preferentemente un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo. Preferentemente, dicho cáncer ginecológico no inducido por HPV es un cáncer endometrial. Preferentemente, dicho cáncer anogenital no inducido por HPV es un cáncer vulvar.

En la presente invención también está comprendido un método para detectar cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1 y LHX8 y opcionalmente uno o más de ZIC1 y ZNF-582 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo.

También es parte de la presente invención un método para la detección de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1, y LHX8 y opcionalmente ZIC1 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras.

En una realización preferente de la invención, la hipermetilación se detecta en las secuencias indicadas en las Figuras 1, 2, 3, 7 y 8. En una realización preferente adicional, dicha hipermetilación es un aumento de metilación de las secuencias promotora y/o génica ricas en CpG de LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 y ST6GALNAC5 del clasificador de metilación, tales como secuencias reguladoras, en una célula de ensayo en comparación con una célula normal

comparable.

En una realización preferente de la invención, la detección de (hiper)metilación se realiza usando una endonucleasa de restricción sensible a metilación, elegida entre el grupo que consiste en BssHII, MspI, NotI y HpaII. En otra realización preferente de la invención, la detección de (hiper)metilación se realiza usando nanotecnología. En una realización preferente alternativa de la invención, la detección de (hiper)metilación se realiza mediante una PCR específica de metilación, que se basa en modificación con bisulfito de ADN, seguido de reacciones de PCR específicas que fijan como diana secuencias ricas en CpG. Preferentemente, en tal método, el reactivo es una sonda o cebador de ácido nucleico que se une al ácido nucleico como se expone en las Figuras 1, 2 3, y más preferentemente dicha sonda o cebador de ácido nucleico tiene una marca detectable.

En otra realización de la invención, la sonda de ácido nucleico tiene una secuencia nucleotídica seleccionada entre el grupo que consiste en:

- a) una secuencia polinucleotídica capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con la secuencia ASCL1 como se expone en la Figura 1 o con la secuencia LHX8 como se expone en la Figura 2 o con la secuencia ST6GALNAC5 como se expone en la Figura 3; o con la secuencia ZIC1 como se expone en la Figura 8 o con la secuencia ZNF-582 como se expone en la Figura 7;
- b) un polinucleótido que tiene al menos un 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).

También preferente en el presente método de la invención, se determina la metilación de la secuencia génica de LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 y ST6GALNAC5 o la secuencia reguladora de estos genes.

También es parte de la presente invención el uso de LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 y ST6GALNAC5 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de carcinoma invasivo inducido por HPV, carcinoma ginecológico o anogenital no inducido por HPV, y sus lesiones precancerosas de alto grado. Es parte adicional de la invención del uso del clasificador de metilación LHX8, ASCL1, y ST6GALNAC5 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV o cáncer ginecológico o anogenital no inducido por HPV, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión, carcinoma o cáncer. También es parte de la invención el uso del clasificador de metilación ASCL1, y LHX8 y opcionalmente uno o más de ZIC1 y ZNF-582 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer de vulva o lesión vulvar precancerosa de alto grado inducida por HPV, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión o cáncer. A continuación, parte de la invención se forma mediante el uso del clasificador de metilación ASCL1, y LHX8 y opcionalmente ZIC1 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer ovárico, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicho cáncer.

La invención también comprende un kit de partes para uso en un método para detectar carcinoma invasivo inducido por HPV, carcinoma ginecológico o anogenital no inducido por HPV y su lesión precancerosa de alto grado, comprendiendo dicho kit - medios para la detección de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en donde dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para la secuencia nucleotídica de ASCL1 de la Figura 1 y la secuencia nucleotídica de LHX8 de la Figura 2 y la secuencia nucleotídica de ST6GALNAC5 de la Figura 3; o - medios para la detección de la metilación de ASCL1 y LHX8 en donde dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para la secuencia nucleotídica de ASCL1 de la Figura 1 y la secuencia nucleotídica de LHX8 de la Figura 2.

El kit comprende además - medios para la detección de infección por HPV, en donde dichos medios comprenden sondas y cebadores específicos para HPV.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la región promotora y la secuencia rica en CpG de ASCL1, exón 1; la secuencia codificante se da en mayúsculas.

La Figura 2 muestra la región reguladora 5' y la secuencia codificante de LHX8 (exón 1). La secuencia codificante está en mayúsculas.

La Figura 3 muestra la región reguladora 5', la secuencia codificante (exones 1 y 2) y el intrón 1 de ST6GALNAC5. La secuencia codificante está en mayúsculas.

La Figura 4 muestra los gráficos de caja de los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en muestras cervicovaginales autorrecogidas positivas para hrHPV medidos mediante PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP) en muestras de lavado (A) y automuestras de cepillado (B). En el análisis de qMSP, los valores de metilación de las dianas se normalizan con respecto al gen de referencia *ACTB* usando el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta Ct}$ ). En los ejes de ordenadas se presentan los niveles de ADN metilado; en los ejes de abscisas los grupos representan controles (es decir, mujeres con  $\leq$ CIN1), mujeres con CIN2, CIN3, y cáncer cervicouterino escamoso. Los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 aumentan con la gravedad de la enfermedad y

presentan un aumento significativo en CIN3 y SCC en comparación con los controles. Se indican las diferencias significativas en los niveles de metilación entre grupos: \* indica <0,05, \*\* indica <0,005, \*\*\* indica <0,0005. C muestra curvas de característica operativa del receptor (ROC).

La Figura 5 A muestra gráficos de caja de los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en raspados cervicouterinos y orina de controles (es decir, mujeres con  $\leq$ CIN1) y mujeres con cáncer cervicouterino medidos mediante PCR cuantitativa específica de metilación (qMSP). En el análisis de qMSP, los valores de metilación de las dianas se normalizan con respecto al gen de referencia *ACTB* usando el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta Ct}$ ). En los ejes de ordenadas se presentan los niveles de ADN metilado; en los ejes de abscisas los grupos representan controles (verde; mujeres con  $\leq$ CIN1) y mujeres con cáncer cervicouterino (rojo). Los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 presentan un aumento significativo tanto en raspados como en orina de las mujeres con cáncer cervicouterino en comparación con los controles. Se indican las diferencias significativas en los niveles de metilación entre grupos: \* indica <0,05, \*\* indica <0,005, \*\*\* indica <0,0005. B. muestra la curva de característica operativa del receptor (ROC) de cualquier combinación de marcadores en raspados cervicouterinos hrHPV+, mostrando que una combinación de marcadores permite la detección de todos los cánceres con la máxima especificidad. C. muestra la curva de característica operativa del receptor (ROC) de los marcadores individuales (izquierda) y de cualquier combinación de marcadores en orina, mostrando que una combinación de 3 marcadores permite la detección de todos los cánceres con la máxima especificidad.

La Figura 6 muestra los gráficos de caja de los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en raspados cervicouterinos de mujeres con cáncer endometrial medidos mediante PCR cuantitativa específica de metilación. En el análisis qMSP, los valores de metilación de las dianas se normalizan con respecto al gen de referencia *ACTB* usando el método Ct comparativo ( $2^{-\Delta Ct}$ ). En los ejes de ordenadas se presentan los niveles de ADN metilado: en los ejes de abscisas los grupos representan mujeres de control y mujeres con cáncer endometrial. Los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 presentan un aumento significativo en mujeres con cáncer endometrial en comparación con los controles.

La Figura 7 muestra la región reguladora 5' de ZNF-582 y la secuencia codificante (exón 1). La secuencia codificante está en mayúsculas.

La Figura 8 muestra la región reguladora 5' de ZIC1 y la secuencia codificante (exón 1). La secuencia codificante está en mayúsculas.

La Figura 9 muestra los gráficos de caja de los niveles de metilación de (A) *ASCL1*, (B) *ST6GALNAC5*, (C) *LHX8*, (D) *ZNF-582* y (E) *ZIC1* en muestras de tejido vulvar. Los niveles de metilación del ADN transformados mediante log2 con respecto al gen de referencia *ACTB* (eje de ordenadas) se representan para epitelio vulvar normal (verde), VIN sin (amarillo) y con (naranja) VSCC y VSCC (rojo). Los niveles de metilación del ADN presentan un aumento significativo en VIN con riesgo de cáncer (VIN con VSCC; naranja) y VSCC (rojo) en comparación con VIN sin cáncer (amarillo) y epitelio vulvar normal (verde). VIN: neoplasia vulvar intraepitelial; VSCC: carcinoma vulvar de células escamosas.

La Figura 10 muestra los gráficos de caja de los niveles de metilación de: (A) *ASCL1*, (B) *ST6GALNAC5*, (C) *ZNF-582* y (D) *ZIC1* en muestras de tejido anal. Los niveles de metilación del ADN transformados mediante log2 con respecto al gen de referencia *ACTB* (eje de ordenadas) se representan para las diferentes categorías histológicas de muestras de tejido anal de hombres positivos para VIH (eje de abscisas). Normal y AIN1 (verde), AIN2 y AIN3 (naranja) y cáncer (SCC; rojo) \* y  $\circ$ : muestras atípicas extremas y leves, respectivamente. Los niveles de metilación de los 4 marcadores aumentan significativamente con la gravedad de la enfermedad anal. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , NS: no significativo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La expresión "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 tipos histológicos de carcinoma inducido por HPV, es decir, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos y carcinomas neuroendocrinos en los órganos pertinentes, tales como cuello uterino, cavidad oral, orofaringe, ano, recto, pene, vulva, vagina, etc. Incluye especialmente carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), carcinomas de células escamosas cervicouterinos y adenocarcinomas cervicouterinos.

La expresión "cáncer cervicouterino invasivo" se refiere a un carcinoma cervicouterino que invade el tejido circundante. Esto incluye todos los tipos histológicos de carcinoma, es decir, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células adenoescamosas y carcinomas neuroendocrinos.

La expresión "cáncer ginecológico o anogenital no inducido por HPV" se refiere a cáncer endometrial, cáncer ovárico, cáncer vulvar, cáncer vaginal, cáncer anal o cáncer de pene que son negativos frente a HPV.

Las expresiones "lesión premaligna" y "lesión precursora" se refieren a un estadio en la evolución celular de múltiples etapas a cáncer con un gran aumento de posibilidades de progresar a un carcinoma. Con la morfología clásica, el patólogo es incapaz de predecir en un paciente individual cuales de estas lesiones progresarán o retrocederán. La presente patente se refiere a un método que puede predecir cáncer invasivo o una lesión precursora de alto grado del mismo.

La expresión "lesión cervicouterina premaligna de alto grado" se refiere a un estadio en la evolución celular de

múltiples etapas a cáncer cervicouterino con un gran aumento de posibilidades de progresar a un carcinoma cervicouterino. La expresión "capaz de hibridarse específicamente con" se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de emparejamiento de bases específico con una secuencia de ácido nucleico complementaria y de unirse a la misma para formar un dúplex de ácido nucleico.

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

10 La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones de hibridación que afectan a la estabilidad de los híbridos, es decir, temperatura, concentración salina, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o la sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. La expresión usada incluye la referencia a condiciones en las que una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana con un mayor grado de detectabilidad que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces con respecto al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias de mayor longitud se hibridan específicamente a mayores temperaturas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menores que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) de la secuencia específica para una fuerza iónica y un pH definidos.  $T_m$  es la temperatura (para una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual un 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda o cebador perfectamente emparejado. Habitualmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración salina es menor que aproximadamente 1,0 M de iones de Na, habitualmente una concentración de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de iones de Na (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es 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). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Algunas condiciones poco rigurosas o "condiciones de rigurosidad reducida" a modo de ejemplo incluyen hibridación con una solución tampón de formamida al 30 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 2x a 40 °C. Condiciones muy rigurosas a modo de ejemplo incluyen hibridación en formamida al 50 %, NaCl 1 M, SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en SSC 0,1x a 60 °C. Los procedimientos de hibridación se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994.

El término "oligonucleótido" se refiere a una secuencia corta de monómeros nucleotídicos (habitualmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos mediante uniones fosforosas (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y arilfosfato, fosforotioato), o uniones no fosforosas (por ejemplo, péptido, sulfamato y otras). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos modificados que tienen bases modificadas (por ejemplo, 5-metilcitosina) y grupos de azúcar modificados (por ejemplo, 2'-O-metilribosilo, 2'-O-metoxietilribosilo, 2'-fluororibosilo, 2'-aminoribosilo, y similares). Los oligonucleótidos pueden ser moléculas de origen natural o sintéticas de ADN bicatenario y monocatenario y ARN bicatenario y monocatenario con formas circulares, ramificadas o lineales y que incluyan opcionalmente dominios capaces de formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, estructuras tallo-bucle y bucle-tallo-bucle).

El término "cebador", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con la diana de amplificación para permitir que se una ADN polimerasa, sirviendo de ese modo como punto de iniciación para la síntesis de ADN cuando se encuentra en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión de cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización tal como ADN polimerasa y a una temperatura y un pH adecuados. El cebador (de amplificación) es preferentemente monocatenario para la máxima eficacia de amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de numerosos factores, incluyendo temperatura y fuente del cebador. Una "pareja de cebadores bidireccionales", como se usa en el presente documento, se refiere a un cebador directo y un cebador inverso usados habitualmente en la técnica de amplificación de ADN, tal como en amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

55 El término "sonda" se refiere a una secuencia oligonucleotídica monocatenaria que reconocerá y formará un dúplex unido por hidrógeno con una secuencia complementaria de un analito de secuencia de ácido nucleico diana o su derivado de ADNc.

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

65 Usando un cribado de metilación de ADN de genoma completo en muestras cervicovaginales autorrecogidas y evaluación exhaustiva de una gran serie de genes que se fijan como diana por metilación en las muestras

5 cervicovaginales autorrecogidas de mujeres con CIN3 y cáncer cervicouterino, se ha descubierto que un clasificador de metilación que consiste en los genes codificantes del factor de transcripción 1 bHLH de la familia Achaete-Scute (también denominado *ASCL1*; Registro Genbank NM\_004316), el gen codificante caja homeótica 8 LIM (también denominado *LHX8*; Registro Genbank NM\_001001933), y el gen codificante ST6 N-Acetilgalactosaminida Alfa-2,6-Sialiltransferasa 5 (también denominado *ST6GALNAC5*; Registro Genbank NM\_030965) y sus secuencias reguladoras, es un determinante importante de carcinogénesis inducida por hrHPV. Los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras proporcionan de ese modo marcadores valiosos para diagnosticar cáncer cervicouterino invasivo y las lesiones precursoras de alto grado del mismo en diferentes tipos de muestras, es decir, raspados cervicouterinos, muestras cervicovaginales autorrecogidas, así como muestras de orina. Además, la presente invención es adecuada para diagnosticar cánceres invasivos asociados a hrHPV no cervicouterinos y sus lesiones precursoras de alto grado. Además, su metilación es adecuada para diagnosticar cáncer endometrial y otros cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV.

10 Otros genes que se ha descubierto que son útiles para la detección de estos tipos de cánceres y lesiones precancerosas asociados a hrHPV son *ZIC1* y *ZNF-582*.

15 El gen *ZIC1* codifica una proteína de 48 kDa que actúa como factor de transcripción y es un miembro de la familia *ZIC* de proteínas de dedos de cinc de tipo C2H2. Los miembros de esta familia son importantes durante el desarrollo. *ZIC1* está implicado en la neurogénesis. Desempeña papeles importantes en el estadio precoz de organogénesis del SNC, así como durante el desarrollo de la médula espinal dorsal y la maduración del cerebelo (revisado en Grinberg y Millen, Clin Genet. 2005, 67(4):290-6). Se ha descrito hipermetilación de *ZIC1* en cáncer colorrectal, gástrico, ovárico y hepatocelular (Gan *et al.*, PLoS One. 2011, 6(2):e16916; Wang *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. 2009,379(4):959-63; Huang *et al.*, Epigenetics. 2013, 8(6):624-34; Wang *et al.*, Tumour Biol. 2014,35(8):7429-33). Se ha mencionado como uno de los factores descubiertos en un cribado de genes hipermetilados en carcinoma *in situ* y cáncer en hisopo cervicouterino (Wang *et al.*, Cancer Med. 2015, 4(1):43-55), pero solo como uno de más de 2200 genes. Además, en el documento de solicitud WO 2017/034407 anterior de los presentes inventores, se ha descrito que la metilación de promotor de *ZIC1* y *GHSR* es un determinante importante de carcinogénesis inducida por hrHPV. Las secuencias genómicas reguladoras de *ZIC1* y *GHSR* proporcionan de ese modo marcadores valiosos para diagnosticar cáncer cervicouterino invasivo y las lesiones precursoras de alto grado del mismo.

20 *ZNF-582* es un miembro de la familia *KRAB-ZNF* y estos miembros de familia actúan como correpresores de la transcripción génica en procesos biológicos relacionados con respuesta al daño del ADN, proliferación, control del ciclo celular y transformación neoplásica (Urrutia 2003; Genome Biol. 4: 231). Se ha descubierto que este marcador se va a metilar en leucemia mieloide aguda (Figueroa *et al.* 2010; Cancer Cell. 17: 13-27) y también se ha descrito en cáncer cervicouterino (Huang *et al.* 2012; PLOS one. 7: e41060).

25 El cáncer cervicouterino está casi exclusivamente asociado a infección por virus del papiloma humano (HPV). Los virus del papiloma humano constituyen un grupo de más de 150 tipos de virus identificados por variaciones en la secuencia de ADN. Los diversos HPV causan una diversidad de enfermedades cutáneas y mucosas. Los HPV se clasifican en términos generales en tipos de bajo riesgo y alto riesgo, basándose en su capacidad para inducir cambios malignos en las células infectadas. Los tipos de HPV de bajo riesgo, tales como 1, 2, 4, 6, 11, 13 y 32, están principalmente asociados a lesiones benignas y 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, están principalmente asociados a lesiones epiteliales premalignas y malignas. Se ha descubierto que los tipos de HPV de alto riesgo causan carcinoma invasivo cervicouterino, así como carcinoma invasivo en otros lugares del tracto anogenital y/o la región de la cabeza-cuello. Por tanto, la presente invención no solo es adecuada para detectar cáncer cervicouterino invasivo y estadios precusores del mismo, sino también otros cánceres invasivos y los estadios precusores correspondientes que están inducidos por HPV, en particular del tipo de alto riesgo. De ese modo, la presente invención proporciona un método para la evaluación de riesgo de cualquier lesión premaligna de alto grado o cáncer invasivo inducido por HPV.

30 Lesiones precursoras y cánceres invasivos inducidos por HPV muy adecuados en el contexto de la presente invención son lesiones precancerosas cervicouterinas y cánceres cervicouterinos invasivos, pero también lesiones precursoras y cánceres invasivos inducidos por HPV de alto riesgo en otros tejidos tales como cavidad oral, orofaringe, ano, recto, pene, vulva, vagina, etc.

35 Como se ha indicado anteriormente, el clasificador de metilación que consiste en marcadores de metilación *ASCL1*, *LHX8*, y *ST6GALNAC5* también es capaz de detectar lesiones precursoras y cánceres invasivos no inducidos por HPV. En el contexto de la presente invención, tales cánceres son preferentemente cáncer endometrial, cáncer ovárico y cáncer vulvar.

40 Una célula de ensayo puede ser una célula (pre)neoplásica, una célula proliferativa cervicouterina, o cualquier otra célula, en donde se va a detectar la presencia de una lesión precursora inducida por HPV con potencial invasivo, cáncer invasivo inducido por HPV, cáncer ginecológico y anogenital no inducido por HPV.

- 5 El marcador ASCL1 es un factor de transcripción proneural y actúa como regulador principal en el inicio de diferenciación en neurogénesis (Vasconcelos *et al.* 2014; *Front. Cell. Neurosci.* 8: 412). Se descubrió que ASCL1 se va a metilar en cáncer oral y colorrectal (Jin *et al.* 2009; *Cancer Res.* 69:7412-21; Li *et al.* 2015; *Epigenetics* 10:229-36). El marcador LHX8 actúa como factor de transcripción altamente conservado para regular el destino celular en neurogénesis, morfogénesis dental y oogénesis (Zhou *et al.* 2015; *FASEB J.*; 29:4083-91). Se ha descrito metilación de LHX8 para cáncer cervicouterino, mama y colorrectal (Tommasi *et al.* 2009; *Breast cancer Res.* 11: R14; Øster, B. *et al.* 2011; *Int. J. Cancer* 129:2855-66; Farkas *et al.* 2013; *Epigenetics* 8:1213-25; Boers *et al.* 2016; *Clin. Epigenetics* 8:29).
- 10 El marcador ST6GALNAC5 es una sialiltransferasa transmembrana implicada en la biosíntesis de gangliósidos de la superficie celular (Drolez *et al.* 2016; *Int. J. Mol. Sci.* 17:1309). Se ha descrito metilación de ST6GALNAC5 en cáncer cervicouterino, mama y colorrectal (Tommasi *et al.* 2009; *Breast cancer Res.* 11: R14; Øster, B. *et al.* 2011; *Int. J. Cancer* 129:2855-66; Farkas *et al.* 2013; *Epigenetics* 8:1213-25; Boers *et al.* 2016; *Clin. Epigenetics* 8:29).
- 15 Aunque se han descrito marcadores individuales que están metilados en cáncer cervicouterino, su valor diagnóstico para detectar cáncer cervicouterino y CIN3 tras someter a ensayo material cervicouterino obtenido mediante cualquier método de muestreo, recogido usando cualquier dispositivo de automuestreo, orina y raspados cervicouterinos, es nuevo. Lo más importante, los tres genes se complementan sorprendentemente entre sí en términos de detección de cáncer cervicouterino y CIN3 en todos los tipos de muestras. Se ha descubierto que el
- 20 marcador ST6GALNAC5 que tiene un rendimiento de diagnóstico intermedio permite la detección de lesiones individuales que no son detectadas por los marcadores LHX8 y/o ASCL1. Además, los dos últimos muestran complementariedad entre sí como se ha descubierto tras análisis de regresión logística.
- 25 Los presentes inventores han establecido que la detección de un clasificador de metilación basado en una combinación de metilación de promotor de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* es un suceso frecuente en carcinomas cervicouterinos de los histotipos carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinoma y carcinoma neuroendocrino, y sus lesiones precursoras de alto grado. Lo más interesante, los presentes inventores han descubierto que el clasificador de metilación que detecta hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras puede detectarse tanto en automuestras cervicovaginales recogidas
- 30 por lavado y recogidas por cepillado como en raspados cervicouterinos recogidos por médicos y que esta característica es capaz de predecir la presencia de lesión CIN de alto grado o carcinoma invasivo. Además, la hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras también puede detectarse en muestras de orina recogidas por automuestreo y se ha descubierto que la metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* está asociada a la presencia de una lesión CIN de alto grado o cáncer cervicouterino invasivo
- 35 subyacente.
- La hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras también puede detectarse en cánceres vulvares y anales positivos para HPV y negativos a HPV y sus lesiones precursoras de alto riesgo.
- 40 Además, la detección de hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras es adecuada para diagnosticar cáncer endometrial, ovárico y otros cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV.
- 45 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV, cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV tales como carcinoma endometrial y ovárico, comprendiendo dicho método la detección de hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y sus secuencias reguladoras en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo y cánceres
- 50 invasivos inducidos por HPV y cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV tales como carcinoma endometrial.
- La célula de ensayo del sujeto puede comprender una célula de una muestra de células mucosas, tales como células cervicouterinas, y también otros tejidos tales como cavidad oral, orofaringe, pene, vulva, ano, recto, endometrio, ovario y otros tejidos en donde vaya a detectarse una lesión precursora o cáncer asociado a cáncer ginecológico, anogenital u orofaríngeo inducido o no inducido por HPV. La totalidad de tales muestras puede usarse como muestra en un método de la presente invención. Preferentemente, una muestra de una célula de paciente comprende células cervicouterinas u otras células epiteliales del tracto anogenital u orofaringeo como células de ensayo. Las células cervicouterinas pueden presentarse, por ejemplo, como una muestra histológica o citológica.
- 60 Las muestras citológicas comprenden frotis cervicouterinos convencionales así como preparaciones de capa fina de muestras cervicouterinas y muestras cervicovaginales o vaginales recogidas por automuestreo. Alternativamente, las células pueden presentarse en muestras de orina. Una célula de ensayo en donde la presente invención es especialmente ventajosa con respecto a otros métodos conocidos de detección de cánceres en el cuello uterino y tejidos adyacentes es una célula de ensayo obtenida por automuestreo.
- 65 Un método de la presente invención es particularmente adecuado para la detección de lesiones precancerosas de

alto grado y cánceres invasivos asociados a LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 que está inducidos por HPV de alto riesgo o derivados del tracto anogenital (femenino). Un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV con potencial invasivo, cánceres invasivos inducidos por HPV y cáncer ginecológico y anogenital no inducido por HPV puede comprender medir promotor de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5.

5 La Figura 1 muestra la región promotora rica en CpG del gen ASCL1 así como parte del exón 1 de la secuencia codificante.

La Figura 2 muestra la región promotora rica en CpG del gen LHX8 así como parte del exón 1 de la secuencia codificante.

10 La Figura 3 muestra la región promotora rica en CpG del gen ST6GALNAC5 así como el exón 1, intrón 1 y parte del exón 2 de la secuencia codificante.

La invención también comprende un método para detectar cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1 y LHX8 y opcionalmente uno o más de ZIC1 y ZNF-582 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo. Como se ha mostrado en la parte experimental de la presente invención, la combinación de ASCL1 con uno o más de los genes mencionados forma un panel de ensayo de metilación muy útil para detectar estos tipos de cánceres/lesiones. De ese modo, también se incluye el uso del clasificador de metilación ASCL1, y uno de ZIC1, ZNF-582 y LHX8 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer de vulva o lesión vulvar precancerosa de alto grado inducida por HPV, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión o cáncer.

25 Además, se ha demostrado en la parte experimental de la presente invención que la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1 y uno o más de ZIC1 y ZNF-582 en una célula puede usarse para detectar cáncer anal y lesiones anales precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo. En tal caso, la hipermetilación indica la presencia de cáncer anal y lesiones anales precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo.

30 Además, se ha mostrado que la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1, y uno o más de LHX8 y ZIC1 en una célula es muy adecuada para la detección de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras, mediante lo cual la hipermetilación de los genes mencionados indica la presencia de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras. Por consiguiente, en la presente invención también se prevé el uso del clasificador de metilación ASCL1, uno de LHX8 y opcionalmente ZIC1 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer ovárico, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicho cáncer.

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

45 El componente celular de ensayo puede detectarse directamente *in situ* o puede aislarse de otros componentes celulares mediante métodos comunes conocidos por los expertos en la materia antes de ponerse en contacto con el reactivo (véanse, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel *et al.* 1995. 4ª edición, John Wiley & 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 Vol, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

50 Dado que los ejemplos presentados muestran metilación frecuente de la secuencia génica y reguladora de ASCL1, es deseable determinar directamente si la secuencia génica y reguladora de ASCL1 está hipermetilada. Asimismo, también es deseable determinar directamente si la secuencia génica y reguladora de LHX8 y ST6GALNAC5 está hipermetilada. En particular, las áreas ricas en citosina denominadas "islas de CpG", que están situadas principalmente en las regiones reguladoras 5' de los genes, están normalmente sin metilar. El término "hipermetilación" incluye cualquier metilación de citosina en una posición que esté normalmente sin metilar en la secuencia génica y reguladora de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 (por ejemplo, la secuencia reguladora y primer exón de LHX8 y ASCL1 y la secuencia reguladora, primer exón, primer intrón y parte del segundo exón de ST6GALNAC5, véanse las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente). La metilación de ADN puede detectarse mediante los siguientes ensayos usados habitualmente en investigación científica:

60 • PCR específica de metilación (MSP), que se basa en una reacción química de bisulfito sódico con ADN que convierte las citosinas sin metilar de dinucleótidos de CpG en uracilo o UpG, seguida de PCR tradicional. Sin embargo, las citosinas metiladas no se convertirán en este proceso, y se diseñan cebadores para superponer el sitio de CpG de interés, que permite determinar el estado de metilación como metilado o sin metilar.

65 • Secuenciación con bisulfito del genoma completo, también conocida como BS-Seq, que es un análisis genómico completo de alto rendimiento de metilación de ADN. Se basa en la conversión con bisulfito sódico de ADN genómico

mencionada anteriormente, que a continuación se secuencia en una plataforma de secuenciación de próxima generación. A continuación, las secuencias obtenidas se realinean con el genoma de referencia para determinar los estados de metilación de dinucleótidos de CpG basándose en las disparidades resultantes de la conversión de citosinas sin metilar en uracilo.

- 5 • 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 sin metilar.
- Ensayos de ChIP sobre chip, que se basan en la capacidad de anticuerpos preparados comercialmente para unirse a proteínas asociadas a metilación de ADN tales como MeCP2.
- 10 • Exploración genómica por sitios de restricción, un ensayo complicado y poco usado en la actualidad basado en reconocimiento diferencial de enzimas de restricción de sitios de CpG metilados y sin metilar; el ensayo es similar al concepto del ensayo HELP.
- Inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP), análoga a la inmunoprecipitación de cromatina, usa inmunoprecipitación para aislar fragmentos de ADN metilados para introducción en métodos de detección de ADN tales como micromatrices de ADN (MeDIP-chip) o secuenciación de ADN (MeDIP-seq).
- 15 • Pirosecuenciación de ADN tratado con bisulfito. Esta es la secuenciación de un amplicón preparado con un cebador directo normal, pero con un cebador inverso biotinado para PCR del gen de elección. A continuación, el pirosecuenciador analiza la muestra por desnaturalización del ADN y adición de un nucleótido cada vez a la mezcla de acuerdo con una secuencia dada por el usuario. Si existe una disparidad, se registra y se indica el porcentaje de ADN para el que está presente la disparidad. Esto da al usuario un porcentaje de metilación por isla de CpG.
- 20 • Ensayo ligero de ruptura molecular para actividad de ADN adenina metiltransferasa - 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 desactivador. La adenina metiltransferasa metila el oligonucleótido convirtiéndolo en un sustrato para DpnI. El corte del oligonucleótido con DpnI da lugar a un aumento de fluorescencia.
- 25 • La transferencia de Southern sensible a metilo es similar al ensayo HELP, aunque usa técnicas de transferencia de Southern para sondear diferencias específicas de gen en la metilación usando digestión de restricción. Esta técnica se usa para evaluar la metilación local cerca del sitio de unión de la sonda.
- Ensayo de metilación basado en puntos cuánticos - un ensayo descrito en Bailey, V. *et al.* (Genome Res. 19:1455-1461, 2009) en el que se combina la alta especificidad de MSP y la alta sensibilidad y simplicidad de la tecnología FRET de puntos cuánticos (QD-FRET) (Zhang, C. *et al.*, 2005, Nat. Mater. 4:826-831).
- 30 • Detección de metilación de ADN usando tecnología de nanochip. Esta técnica es capaz de detectar metilación de ADN con alta sensibilidad y especificidad en cantidades mínimas de material clínico, sin la necesidad de conversión con bisulfito y amplificación por PCR. Se han descrito métodos que usan nanoporos en estado sólido en Shim, J. *et al.* (Sci. Rep. 3:1389, 2013). Se describe un dispositivo de tecnología de laboratorio en un chip (*lab on a chip*) en el documento de publicación de Patente WO2009104967 (A1).

La hipermetilación puede detectarse preferentemente mediante PCR específica de metilación, que se basa en modificación con bisulfito del ADN, seguida de reacciones de PCR específicas que fijan como diana secuencias ricas en CpG.

40 Un medio preferente alternativo para someter a ensayo las secuencias metiladas es por secuenciación de próxima generación de ADN modificado con bisulfito.

45 Un tercer medio preferente para detectar secuencias metiladas y para discriminar entre ADN metilado y sin metilar se basa en nanotecnología.

50 Para los fines de la invención, puede usarse una sonda de ácido nucleico específica para LHX8, ASCL1 y/o ST6GALNAC5 para detectar la presencia de polinucleótido de LHX8, ASCL1 y/o ST6GALNAC5 (usando sonda de ácido nucleico) en fluidos o tejidos biológicos. Los cebadores de oligonucleótido basados en cualquier región de secuencia codificante y región de secuencia reguladora de la secuencia de LHX8, ASCL1 y/o ST6GALNAC5 son útiles para amplificar ADN, por ejemplo mediante PCR.

55 Cuando se usan cebadores, sondas de ácido nucleico o endonucleasas de restricción de PCR, se analizan la región reguladora 5' y la secuencia codificante de los genes LHX8 y ASCL1 o la región reguladora 5', la secuencia codificante y el primer intrón de la secuencia de ST6GALNAC5 (como se especifica en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente).

60 Puede usarse cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de polinucleótido de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5. Las muestras preferentes para ensayo de acuerdo con los métodos de la invención incluyen muestras tales como raspados (cervicouterinos o vaginales), lavados o hisopos cervicovaginales, orina, sangre y/o biopsias (cervicouterinas), y similares. Aunque el sujeto puede ser cualquier mamífero, el sujeto es preferentemente un ser humano.

65 Los métodos de diagnóstico para la detección de trastornos incluyen métodos en donde se proporciona una muestra para someter a ensayo, muestra que comprende una preparación celular de tejido cervicouterino u otro tejido. Preferentemente, tales muestras se proporcionan como frotis u otras muestras citológicas. Otras muestras

adecuadas incluyen orina y sangre.

Una muestra de célula o tejido obtenida de un mamífero, preferentemente un ser humano, se pretrata adecuadamente para permitir el contacto entre el ADN celular de una célula de ensayo comprendida en dicha muestra con un reactivo que detecta LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 y detecta una alteración en la metilación de los genes LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 o sus secuencia reguladoras en comparación con la de una célula normal comparable. Las muestras pueden montarse sobre un soporte adecuado para permitir la observación de células individuales. Algunos ejemplos de materiales de soporte bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, poliuretano, opcionalmente provisto con capas para mejorar la adhesión celular e inmovilización de la muestra, tales como capas de poli-L-lisina o silano. Los frotis o biopsias cervicouterinas pueden prepararse, por ejemplo, como para el ensayo de Papanicolaou (Pap) o cualquier modificación adecuada del mismo conocida por el experto en la materia, y pueden fijarse mediante procedimientos que permitan el acceso apropiado del reactivo al componente diana. En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan muestras citológicas como muestras de frotis convencionales o preparaciones de capa fina de células cervicouterinas o muestras citológicas basadas en líquidos o cualquier otro tipo de preparación conocida por los expertos en la materia. Si se requiere almacenamiento, los procedimientos de rutina usan formalina tamponada para fijación seguido de embebido en parafina, que proporciona una infraestructura tisular bien conservada.

En una realización de un método de la invención, se detecta un aumento de metilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* o su secuencia reguladora en la célula de ensayo en comparación con la célula normal comparable.

La presente invención también proporciona un kit de partes como se define en las reivindicaciones, para uso en un método para detectar lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, cánceres invasivos inducidos por HPV y cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV. Tal kit puede comprender adecuadamente un cepillo o espátula para tomar un raspado (cervicouterino) con o sin un recipiente lleno con un medio de recogida para recoger las células de ensayo. Alternativamente, se incluirá un dispositivo de muestreo que consiste en una jeringa de irrigación, un catéter urinario femenino desechable y un recipiente con fluido de irrigación para recoger células cervicouterinas mediante lavado cervicovaginal. Además, o alternativamente, es adecuado un recipiente para recoger orina, preferentemente para usarse para recoger la primera orina. Un kit de acuerdo con la presente invención comprende además cebadores y sondas para la detección de secuencias génicas o reguladoras de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5.

Un kit de partes de acuerdo con la invención comprende además medios para la detección de metilación de secuencia génica o reguladora de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5, tales como enzimas de restricción sensibles a metilación, o sondas o cebadores capaces de hibridarse con la secuencia nucleotídica de la Figura 1 y/o la Figura 2 y/o la Figura 3.

Los medios para la detección de metilación de secuencia génica o reguladora de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 se combinan con medios para la detección de infección por HPV, preferentemente para la detección de infección por HPV del tipo de alto riesgo. Tales medios pueden comprender cebadores o sondas específicas de HPV, marcadores proteicos para infección por HPV o incluso marcadores sustitutivos para infección por HPV, como se conoce en la técnica.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Descubrimiento de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 como panel de marcadores de metilación óptimo para detectar cáncer y precáncer cervicouterino en automuestras

Se realizó un análisis exhaustivo de cambios de metilación de ADN de genoma completo detectables en automuestras y asociados a carcinogénesis cervicouterina por medio de la matriz Infinium 450K BeadChip en automuestras positivas para hrHPV. La serie de muestras incluyó en 68 automuestras positivas para hrHPV de 39 mujeres con neoplasia intraepitelial cervicouterina de alto grado de grado 3 (CIN3) y 29 mujeres con neoplasia intraepitelial cervicouterina de bajo grado de grado 0 o 1 ( $\leq$ CIN1). La matriz Infinium HumanMethylation450 BeadChip analiza más de 485.000 sitios de metilación por muestra con resolución de nucleótido individual del genoma humano (Illumina, San Diego, CA, EUA). Mediante este enfoque, los presentes inventores identificaron 12 dianas de metilación que estaban asociadas específicamente a la presencia de CIN3. A continuación, se analizaron los 12 genes metilados más discriminativos usando ensayos qMSP múltiples en dos grandes series separadas que consistieron en automuestras de lavado positivas para hrHPV (n = 245) o automuestras de cepillado positivas para hrHPV (n = 246) de mujeres con y sin CIN3. En las automuestras tanto de lavado como de cepillado, 11 de los 12 genes seleccionados mostraron un aumento significativo de niveles de metilación (p < 0,0005) en automuestras de mujeres con CIN3 en comparación con controles positivos de hrHPV (véase también la Figura 4).

Para construir posteriormente un clasificador óptimo de marcadores de metilación que sea universalmente aplicable

a cualquier tipo de automuestra, se realizó análisis de regresión logística realizado en conjuntos de datos de qMSP de automuestras tanto de lavado como de cepillado. Después de la eliminación del fondo, se compararon los clasificadores de metilación óptimos en ambos tipos de automuestras. La razón para someter a ensayo ambos tipos de automuestras para descubrir un clasificador de metilación que sea universalmente aplicable a muestras cervicovaginales autorrecogidas, independientemente del dispositivo de recogida usado, se basa en los hallazgos de investigaciones previas que indican que el rendimiento clínico de los marcadores de metilación depende del tipo de automuestrador usado. Por ejemplo, se descubrió que los marcadores de metilación MAL y mir124-2 muestran un buen rendimiento clínico para la detección de CIN3+ en automuestras de lavado, pero no en automuestras de cepillado. Sorprendentemente, en este estudio se descubrió un clasificador de metilación óptimo que consiste en los genes *ASCL1*, *LHX8* y *ST6GALNAC5* y su secuencia reguladora para ambos tipos de automuestras. Los niveles de metilación de *ASCL1*, *LHX8* y *ST6GALNAC5* detectados en automuestras de lavado y cepillado se muestran en las Figuras 4A y 4B, respectivamente. Los niveles de metilación de los 3 genes aumentaron significativamente en mujeres con CIN3 y fueron extremadamente altos en mujeres con cáncer cervicouterino. El clasificador de metilación mostró un excelente rendimiento clínico para detección de CIN3 en automuestras positivas para hrHPV tanto de lavado (AUC = 0,90) como de cepillado (AUC = 0,86). El clasificador de metilación tuvo una puntuación de un 83 % (25 de 30) en automuestras de lavado y de un 76 % (52 de 68) en automuestras de cepillado de mujeres con CIN3 positiva para metilación con una especificidad correspondiente en controles positivos de hrHPV de un 80 %. De forma importante, casi todas las mujeres con cáncer cervicouterino sometidas a ensayo fueron positivas para el clasificador de metilación. El rendimiento clínico para la detección de CIN3+ (CIN3 y cáncer) es superior a los paneles de marcadores de metilación publicados anteriormente. El clasificador de metilación tiene una sensibilidad de un 79 %-89 % y una especificidad de un 75 %-77 % para CIN3+ en automuestras de lavado y cepillado. En comparación, el mejor panel de metilación disponible en la actualidad sometido ensayo en grandes series de automuestras es *FAM19A4/miR124-2*, que tiene una sensibilidad de un 69-71 % y una especificidad de un 68-76 % para detección de CIN3+ en automuestras tanto de lavado como de cepillado (De Strooper *et al.* Gynecol. Oncol. 141, 341-347 (2016)). Otros paneles de marcadores, tales como *JAM3/EPB41L3/TERT/C13ORF18*, solo se han sometido ensayo en pequeñas series seleccionadas de automuestras (Boers. *et al.* +Br. J. Cancer 111, 1095-101 (2014); Eijnsink *et al.* Gynecol. Oncol. 120, 280-283 (2011)).

Los cebadores y las sondas usados para análisis de qMSP de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* se muestran en la Tabla 1. El gen constitutivo  $\beta$ -actina (*ACTB*) se eligió como referencia para la medición de entrada de ADN total. La cuantificación se realizó usando el método Ct comparativo (Schmittgen *et al.*, Nat Protoc 2008, 3:1101-1108).

#### Ejemplo 2. Validación de clasificador de metilación en automuestras de lavado y cepillado

Para validar el rendimiento clínico del clasificador de metilación, los presentes inventores analizaron otra gran serie independiente de automuestras de lavado (n = 198) y automuestras de cepillado (n = 278) positivas para hrHPV usando ensayo qMSP múltiple. El clasificador de metilación mostró un rendimiento clínico bueno y comparable para detección de CIN3 como se observa en la serie de muestras descrita anteriormente, para automuestras positivas para hrHPV tanto de lavado (AUC = 0,88) como de cepillado (AUC = 0,90) (véase la Figura 4C para curvas ROC). En el conjunto de validación, un 74 % (26 de 35) de automuestras de lavado y un 88 % (49 de 56) de automuestras de cepillado de mujeres con CIN3 mostraron positividad para metilación con una especificidad correspondiente en controles positivos de hrHPV de un 79 % y un 81 %, respectivamente.

#### Ejemplo 3. Metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* como marcador para cribado primario en muestras cervicovaginales autorrecogidas

Los marcadores de metilación sometidos ensayo hasta el momento no son muy adecuados para uso en cribado primario debido a una especificidad demasiado baja con una sensibilidad aceptable para CIN2/3 y cáncer. Cuando se evalúa el uso del clasificador de metilación que consiste en *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* como marcador para cribado primario, se descubrió sorprendentemente que tras análisis de automuestras negativas a HPV y automuestras de mujeres con CIN3, el clasificador también tiene una AUC muy alta de 0,895 en automuestras de lavado para detectar CIN3 así como en automuestras de cepillado (AUC es 0,828).

Los presentes descubrimientos muestran que un clasificador de metilación que detecta hipermetilación de los genes *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* y su secuencia reguladora permite la detección de CIN2+ subyacente no solo cuando se aplica a muestras de lavado cervicovaginales autorrecogidas, sino también para muestras de cepillado vaginal autorrecogidas. Las últimas son un tipo de muestras en las que los marcadores conocidos previamente a menudo presentaban una sensibilidad clínica baja. Por consiguiente, los marcadores *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* pueden considerarse marcadores de detección total que muestran igual rendimiento independientemente del dispositivo de muestreo usado. De forma importante, los elevados valores de AUC y tasas de especificidad permiten cribado primario sometiendo a ensayo los genes clasificadores de metilación, obviando la necesidad de someter a ensayo hrHPV inicialmente. Como se describe posteriormente (Ejemplo 6), tal aplicación también permite la detección de cánceres negativos a hrHPV que pasan por alto los escenarios de cribado actuales.

#### Ejemplo 4: detección de metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* en raspados cervicouterinos positivos para hrHPV

5 A partir de las mujeres participantes en un cribado basado en población, los presentes inventores estudiaron raspados cervicouterinos de mujeres positivas para hrHPV en las que se diagnosticó CIN3 (n = 56), y mujeres negativas y positivas para hrHPV en las que se diagnosticó como máximo CIN1 (n = 40 y n = 87, respectivamente). Además, se sometieron a ensayo los raspados cervicouterinos de mujeres diagnosticadas con carcinoma de células escamosas (SCC; n = 23) y adenocarcinoma (AdCa; n = 3) cervicouterinos. Los raspados cervicouterinos de estas mujeres se recogieron en un medio de conservación en el que se conservan bien los ácidos nucleicos.

10 La metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* aumentó significativamente en raspados de mujeres con CIN3, SCC y AdCa en comparación con los controles negativo de HPV y positivo de HPV. El análisis de característica operativa del receptor mostró un AUC de 0,890 para detectar CIN3 en una población positiva para HPV y una AUC de 1 para detectar cáncer cervicouterino (Figura 5B).

15 De ese modo, estos genes proporcionan marcadores de triaje prometedores en cribado mediante ensayo de HPV primario, pero también pueden usarse como marcadores de cribado primario para carcinomas relacionados y no relacionados con HPV.

20 Ejemplo 5: metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* en muestras de orina como marcadores para cáncer cervicouterino y sus lesiones precursoras de alto grado

25 Un total de 44 muestras de orina recogidas de pacientes con cáncer cervicouterino y 47 muestras de orina de mujeres de control se sometieron a ensayo para metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5*. En comparación con los controles, los niveles de metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* aumentaron significativamente en muestras de orina de mujeres con cáncer cervicouterino (Figura 5A). De forma importante, un cáncer que no se detectó mediante *LHX8* o *ASCL1* se detectó mediante *ST6GALNAC5*, confirmando la complementariedad de los marcadores del clasificador. Estos resultados muestran que la detección de los genes de clasificador de metilación permite el cribado de cáncer cervicouterino usando orina, proporcionando de ese modo los métodos no invasivos de cribado de cáncer más sencillos y más cómodos para el paciente disponibles en la actualidad. Además, el ensayo de metilación puede usarse para el triaje de mujeres positivas para hrHPV en programas de cribado de HPV basados en orina.

30 Ejemplo 6: metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* en raspados cervicouterinos de mujeres con carcinoma endometrial

35 Un total de 24 raspados cervicouterinos de mujeres con carcinoma endometrial se sometieron a ensayo para metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5*. En comparación con raspados cervicouterinos de mujeres negativas y positivas para hrHPV en las que se diagnosticó como máximo CIN1, los niveles de metilación de *LHX8*, *ASCL1* y *ST6GALNAC5* aumentaron significativamente en mujeres con carcinoma endometrial (Figura 6).

**Tabla 1.** Secuencias de cebador y sonda (5'-3') usadas para análisis MSP cuantitativo de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5

	<b>Cebador directo</b>	<b>Cebador inverso</b>	<b>Sonda</b>
ASCL1	CGTTTAAGTAAGTTAA GCGATAGCGTTC	CCACGACGACCGACTAC TACTAAG	<u>GTTGTAACGTCGGTTTAA</u> <u>TTTTAGC</u>
LHX8	TAGGCGTCGTGACGGT TGTAC	AAACAAATCAAAAATTC CGAAGG	<u>GTTTCGTATTTTIGAGGGTT</u> <u>TTTATTAGTTCGTTTTTCG</u>
ST6GALNAC 5	GACGGTGTTTTTTTTG TTTTAGTTGC	GCAACTAAAACAAAAA AAC	<u>TGCGCGGGGTGGGGTTT</u> <u>A</u>

En la presente invención, también pueden ser útiles cebadores y sondas adicionales (también en vista de los Ejemplos 7-9). Estos se enumeran en la Tabla 2:

5 Tabla 2. Secuencias de cebador y sonda (5'-3') usadas para análisis MSP cuantitativo de ZIC1, ASCL1, LHX8 y ZNF-582

	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
ZIC1	GGGCGGGTTAATGAGTTG C	TCACGTACTACCGACGC TAACG	CGCCGCGCCAACGAAAAAC
ZNF-582	TTTAAGGTCGGGTTGTTG TTTTTAC	GCACAAAACACACCGAT ACTACG	ATAATAAAACCGACGCCGCAAT ATCTTCCG
LHX8	CGTCGTGACGGTTGTAC	CTCGACGCGAAAAACG	TCAAATACGAAACAACG
ASCL1	AGTAAGTTAAGCGATAGC G TTC	ACCGCTAAAATTAAACC GACG	TTCGTTCGAATTGATGCGTT

Ejemplo 7: metilación de LHX8, ASCL1, ST6GALNAC5, ZNF-582 y ZIC1 para la detección de cáncer y precáncer vulvar

10 La neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) es la lesión precursora del carcinoma de células escamosas vulvar (VSCC), pero solo una minoría de VIN progresa a cáncer. La neoplasia intraepitelial vulvar (VIN) de alto grado es el estado precanceroso de los carcinomas de células escamosas vulvares (VSCC), pero solo una minoría de las VIN progresa a cáncer, lo que indica una enfermedad heterogénea. Las clasificaciones clínicas e histológicas actuales son insuficientes para predecir el riesgo de cáncer. Por consiguiente, las mujeres afectadas se tratan del mismo modo con intervenciones mutilantes. Por tanto, existe la necesidad clínica de biomarcadores objetivos que reflejen el riesgo de cáncer. Por tanto, los presentes inventores evaluaron el valor potencial del panel de marcadores de metilación de ADN LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 así como el marcador de metilación ZNF-582 y ZIC1 para la estratificación de riesgo de VIN. El marcador ZNF-582 se identificó en el mismo cribado de genoma completo que se ha descrito en el Ejemplo 1. La Figura 7 muestra la región reguladora 5' y la secuencia codificante (exón 1) de ZNF582. La secuencia codificante está en mayúsculas y la región rica en CpG está subrayada.

ZIC1 se identificó en un cribado de genoma completo para la detección de precáncer y cáncer cervicouterino (Verlaet *et al.*, Clinical Cancer Research, 2017). La Figura 8 muestra la región reguladora 5' y la secuencia codificante (exón 1) de ZIC1. La secuencia codificante está en mayúsculas y las regiones en ricas en CpG se indican en gris.

Se incluyeron ocho muestras de vulva normales (controles), 39 VIN y 75 VSCC en este estudio. De las 39 VIN, 25 estaban asociadas a VSCC (VIN con VSCC) y 14 no (VIN sin VSCC, es decir, sin desarrollo de VSCC durante >10 años de seguimiento. Esta serie única de lesiones de VIN bien caracterizadas con seguimiento clínico permite la identificación de marcadores que distinguen las lesiones de VIN con alto riesgo de cáncer con necesidad de tratamiento agresivo de las lesiones de VIN que presentan bajo riesgo de cáncer y se beneficiarían de una gestión más conservadora, por ejemplo, no invasiva.

35 Someter a ensayo la metilación de LHX8, ASCL1, ST6GALNAC5 y ZNF-582 mostró metilación diferencial entre VIN positiva para HPV sin VSCC y VIN con VSCC de los cinco genes (Figura 9).

Las curvas de característica operativa del receptor (ROC) para la comparación de VIN positiva para HPV sin VSCC frente a VIN positiva para HPV con VSCC basadas en regresión logística proporcionaron valores de AUC de 0,83 (LHX8), 0,80 (ASCL1), 0,69 (ST6GALNAC5), 0,80 (ZNF-582) y 0,78 (ZIC1).

45 El análisis de combinaciones de marcadores reveló un aumento de AUC cuando se combinan dos marcadores: ASCL1 más ZIC1 (AUC = 0,82), ASCL1 más ZNF-582 (AUC = 0,82) y ASCL1 más LHX8 (AUC = 0,83). Estos datos indican que puede usarse una combinación de dos de los marcadores de metilación LHX8, ASCL1, ZIC1 y ZNF-582 para la estratificación de riesgo de cáncer de VIN positivo para HPV y para la detección de VSCC.

Ejemplo 8: marcadores de metilación para la detección de cáncer y precáncer anal

50 El cáncer anal está causado por HPV de alto riesgo y precedido por lesiones precursoras: neoplasia intraepitelial anal (AIN; grados 1-3). Dado que solo una minoría progresará finalmente a cáncer, preferentemente solo se tratan

las lesiones con alto potencial maligno. Desafortunadamente, se carece de un marcador predictivo de progresión a cáncer. En la actualidad, se tratan todas las AIN de alto grado, lo que resulta en un sobret ratamiento significativo. Por tanto, los presentes inventores evaluaron el valor potencial de los marcadores de metilación de ADN ASCL1, ST6GALNAC5, ZIC1 y ZNF-582 para la estratificación de riesgo de AIN. Los marcadores ZIC1 y ZNF-582 se identificaron mediante análisis de genoma completo en muestras que contenían HPV (véase el Ejemplo 1 y Verlaet *et al.*, Clinical Cancer Research, 2017).

Se analizaron muestras de tejido archivadas de hombres VIH+ con carcinoma anal de células escamosas (SCC; n = 26), AIN3 (n = 24), AIN2 (n = 42) y hombres sin AIN2 o peor (normal + AIN1; n = 56) para metilación de ADN de cuatro genes conocidos por presentar hipermetilación durante carcinogénesis inducida por HPV usando PCR cuantitativa específica de metilación. Los niveles de metilación de los 4 genes fueron significativamente mayores con la gravedad creciente de la enfermedad (Figura 10). Se usaron análisis de regresión logística y AUC para determinar el rendimiento de los marcadores de metilación para la detección de cáncer anal y AIN3. Las AUC para detectar AIN3 o peor fueron 0,89 (ASCL1), 0,84 (ST6GALNAC5), 0,87 (ZIC1) y 0,91 (ZNF-582).

Los análisis de combinaciones de marcadores revelaron una mejora de detección incluso mayor de AIN3 o peor, con una AUC de 0,90 para ASCL1 más ZIC1 y 0,92 para ASCL1 más ZNF-582. De forma importante, ambas combinaciones de marcadores detectaron todos los cánceres anales.

Estos datos indican que las combinaciones de marcadores de metilación ASCL1 más ZIC1 y ASCL1 más ZNF-582 pueden usarse para detectar cáncer anal y AIN de alto grado con riesgo de progresión a cáncer, lo que es particularmente importante para la gestión clínica de hombres positivos para VIH que tienen sexo con hombres.

#### Ejemplo 9: metilación de LHX8, ASCL1, y ZIC1 en raspados cervicouterinos de mujeres con cáncer ovárico

Un total de 6 raspados cervicouterinos de mujeres con cáncer ovárico, incluyendo cánceres de células tanto serosas como claras, se sometió a ensayo para metilación de LHX8, ASCL1 y ZIC1. En comparación con raspados cervicouterinos de mujeres sin enfermedad (es decir, mujeres negativas y positivas frente a hrHPV en las que se diagnosticó como máximo CIN1), los niveles de metilación de LHX8, ASCL1 y ZIC1 aumentaron significativamente en mujeres con cáncer ovárico. Estos datos indican que una combinación de cualquiera de estos tres marcadores permite la detección de cáncer ovárico en raspados cervicouterinos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar lesiones precancerosas de alto grado inducidas por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV y cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de lesiones precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, cánceres invasivos inducidos por HPV y cánceres ginecológicos y anogenitales no inducidos por HPV.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV es una lesión cervicouterina premaligna de alto grado o cáncer cervicouterino invasivo, y/o en donde dicho cáncer invasivo inducido por HPV es un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos cánceres ginecológicos no inducidos por HPV son un cáncer endometrial u ovárico.
4. Método para detectar cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1 y LHX8 y opcionalmente uno o más de ZIC1 y ZNF-582 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo.
5. Método para la detección de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras, comprendiendo dicho método la detección de un clasificador de metilación que consiste en secuencias de ASCL1 y LHX8 y opcionalmente ZIC1 en una célula mediante lo cual tal hipermetilación indica la presencia de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha hipermetilación se detecta en las secuencias ricas en CpG indicadas en las Figuras 1, 2, 3, 7 y 8.
7. Un método de detección de lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV y cánceres invasivos inducidos por HPV y cáncer ginecológico o anogenital no inducido por HPV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o detección de cáncer de vulva y lesiones vulvares precursoras inducidas por HPV con potencial invasivo de acuerdo con la reivindicación 4 y/o un método para la detección de cáncer ovárico y lesiones ováricas precursoras de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha hipermetilación es un aumento de metilación de las secuencias promotora y/o génica ricas en CpG de LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 y/o ST6GALNAC5 del clasificador de metilación en una célula de ensayo en comparación con una célula normal comparable.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el reactivo es una endonucleasa de restricción sensible a metilación, elegida entre el grupo que consiste en BssHII, MspI, NotI y HpaII.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en donde el método implica nanotecnología, preferentemente tecnología de laboratorio en un chip.
10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde se realiza una PCR específica de metilación, que se basa en modificación con bisulfito de ADN, seguida de reacciones de PCR específicas que fijan como diana secuencias ricas en CpG, preferentemente en donde el reactivo es una sonda o cebador de ácido nucleico que se une al ácido nucleico como se expone en la Figura 1 o 2, preferentemente en donde dicha sonda o cebador de ácido nucleico tiene una marca detectable.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la sonda de ácido nucleico tiene una secuencia nucleotídica seleccionada entre el grupo que consiste en:
- a) una secuencia polinucleotídica capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con la secuencia ASCL1 como se expone en la Figura 1 o con la secuencia LHX8 como se expone en la Figura 2 o con la secuencia ST6GALNAC5 como se expone en la Figura 3; o con la secuencia ZIC1 como se expone en la Figura 8 o con la secuencia ZNF-582 como se expone en la Figura 7;
  - b) un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad con uno de los polinucleótidos de a);
  - c) un polinucleótido complementario a uno de los polinucleótidos de a); y
  - d) un polinucleótido que comprende al menos 15 bases de uno de los polinucleótidos de a) o b).
12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde se determina la metilación del clasificador de metilación que comprende el gen LHX8, ASCL1, ZNF-582, ZIC1 y/o ST6GALNAC5.
13. Uso del clasificador de metilación LHX8, ASCL1, y ST6GALNAC5 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de lesión precancerosa de alto grado inducida por HPV o carcinoma invasivo inducido por HPV o cáncer ginecológico o anogenital no inducido por HPV, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión, carcinoma o cáncer.

14. Uso del clasificador de metilación ASCL1 y LHX8, y opcionalmente uno de ZIC1 y ZNF-582 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer de vulva o lesión vulvar precancerosa de alto grado inducida por HPV, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicha lesión o cáncer.
- 5
15. Uso del clasificador de metilación ASCL1 y LHX8 y opcionalmente ZIC1 como marcador de diagnóstico molecular para la detección de cáncer ovárico, preferentemente en donde la metilación de dicho marcador es predictiva de la aparición de dicho cáncer.
- 10
16. Kit de partes para uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, comprendiendo dicho kit
- 15
- medios para la detección de metilación de LHX8, ASCL1 y ST6GALNAC5 en donde dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para la secuencia nucleotídica de ASCL1 de la Figura 1 y la secuencia nucleotídica de LHX8 de la Figura 2 y la secuencia nucleotídica de ST6GALNAC5 de la Figura 3; o
  - medios para la detección de metilación de ASCL1 y LHX8 en donde dichos medios comprenden sondas y/o cebadores específicos para la secuencia nucleotídica de ASCL1 de la Figura 1 y la secuencia nucleotídica de LHX8 de la Figura 2; y
  - medios para la detección de infección por HPV, en donde dichos medios comprenden sondas y/o cebadores
- 20
- específicos para HPV.

**Figura 1:** secuencia de ASCL1 (región reguladora y exón 1) obtenida de Refseq NM\_004316 9hg19). La secuencia codificante está en mayúsculas y la región rica en CpG está subrayada.

```

>hg19_refGene_NM_004316
ttctttatgatataccgctaagctggtccggaaataatctttatggggagg
gggtggcggttagggggcgatggtacagggggccagaggatcatcctagggg
gacgtccctgccatatacaccacctacaggacggctcacaaccactcct
cgggtgtcgttccccgcggccccccacacacttgctcagttatggggagc
acatcctagtttttagagctgaatgggacattagagaccatattctgtgg
ctgcagacgagggaagcgaaggctcagagaggatgccacttcgaggagcca
cagagcattgagaggacgccttgggactagaaccacgttttcacatagt
ccagcacttttttactgtttctggacggagtcctcccccaaccatggtt
tctaaacttcaatcgttaatttgctccaatttctaggggtcaccgaggaacc
cgaagagaataacagtgaggagagagagaaaaacaggaaaagtgcagcccc
actccctcctcacctccacacogtccctgtgccattttttctgoccaaac
ccttccctgogctttgcttcaagtctcttagtagaatccaagagagcttca
ccccaaagtctttccacctatacacctcaattcctagagccatttgtcctt
cctgtgacgccccccaccccccttccctaaagccacccccggcagcagcccg
ccccgagcgccgcccctgtttattcagccgggagtcgggcacgcggccagg
cgcacgcactgcaacaacaaaccagctgaatggagagtttgcaaggagc
gggagaaaaggaaacgggaggggggggagaggagaggaggaggagggttag
ggagtgggtgggaggaagaggttaagaggaggggggggagtgggggctgca
ggcgtcgcgtgcagcagcggggagtgggggggcgaggcggggccagggctg
cgcgtggggctgggtgtcccattgaaaaggcggacgcactccggcagccc
AGCACTCTCTCACTTCTGGCCAGGGAACGTGGAAGGCGCACCGACAGGGA
TCCGGCCAGGGAGGGCGAGTGAAAGAAGGAAATCAGAAAGGAAGGGAGTT
AACAAAATAATAAAAACAGCCTGAGCCACGGCTGGAGAGACCGAGACCCG
GCGCAAGAGAGCGCAGCCTTAGTAGGAGAGGAACGCGAGACGCGGCAGAG
CGCGTTCAGCACTGACTTTTGCTGCTGCTTCTGCTTTTTTTTTTTCTTAGA
AACAGAAGGGCGCCAGCGGCAGCCTCACACGCGAGCGCCACGCGAGGCTC
CCGAAGCCAACCCGGAAGGGAGGAGGGGAGGGAGGAGGAGGCGGCTGC
AGGGAGGAGAAAAAGCATTTCCTTTTTTTTGTCTCCCACTCTAAGAAGTC
TCCCGGGGATTTTGTATATATTTTTTAACTTCCGTCCAGGGCTCCCGCTTC
ATAATTCCTTTTCTTTCCCTCTCTGTTCTGCACCCAAGTCTCTCTGTG
TCCCCCTCGCGGGCCCCGCACCTCGCGTCCCGGATCGCTCTGATTCGCG
ACTCCTTGGCCGCCGCTGCGCATGGAAAGCTCTGCCAAGATGGAGAGCGG
CGGCGCCGGCCAGCAGCCCCAGCCGCGAGCCCCAGCAGCCCTTCTGCCGC
CCGCAGCCTGTTTCTTTGCCACGGCCGCGAGCCGCGGGCGCCGAGCCGCC
GCAGCGGCAGCGCAGAGCGCGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGGCGCCGCGAGCTGAGACCGGCGGGCCGACGGCCAGCCCTCAGGGG
GCGGTCACAAGTCAGCGCCCAAGCAAGTCAAGCGACAGCGCTCGTCTTCG
CCCGAACTGATGCGCTGCAAACGCCGGCTCAACTTCAGCGGCTTTGGCTA
CAGCCTGCCGCGAGCAGCAGCCGGCCGCGTGGCGCGCCGCAACGAGCGCG
AGCGCAACCGCGTCAAGTTGGTCAACCTGGGCTTTGCCACCCTTCGGGAG
CACGTCCCCAACGGCGCGGCCAACAGAAGATGAGTAAGGTGGAGACACT
GCGCTCGGCGGTGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAGC
ATGACGCGGTGAGCGCCGCTTCCAGGCAGGCGTCTGTGCCCCACCATC
TCCCCAACTACTCCAACGACTTGAACCTCCATGGCCGGCTCGCCGGTCTC
ATCCTACTCGTCGGACGAGGGCTCTTACGACCCGCTCAGCCCCGAGGAGC
AGGAGCTTCTCGACTTCACCAACTGGTTCTGAGGGGCTCGGCCTGGTCAG
GCCCTGGTGCGAATGGACTTTGGAAGCAG
    
```

**Figura 2:** secuencia de LHX8 (región reguladora y exón 1) obtenida de Refseq NM\_001001933 (hg19). La secuencia codificante está en mayúsculas y la región rica en CpG está subrayada.

```

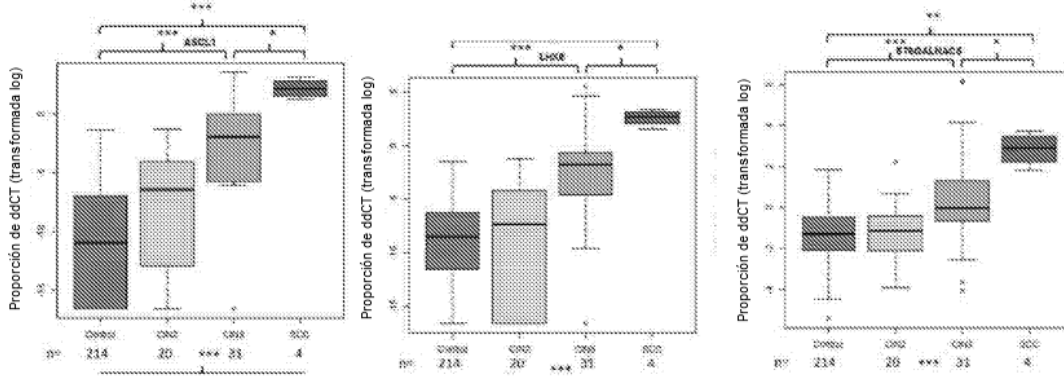
>hg19_refGene_NM_001001933
acatgtagagaaggcgggttttcctgaaagaggcgaagcaatttctccag
gaaagactttccccacacogcccccttctttatattaggtccaccctc
tggaaaaacaaaactttttttttttttcttttctggaggactcaggaaaa
gctcagtgctcacttcaactcagagctcagtgaaagctgggaaaggaattt
aagaacgggttcacagaaaagtggtcaggccacagcggcctcttggacga
agacacactttagcatttatccttctcggcatcagcttttattagtgat
cggggcgggggaggggggagatcggcagacacggacagcctctgacctc
tggagttgggtatgtgataaagcagccctagcagtgccatgtattggaagas
cgatcagatgtttgtgtgtaaaactagtagcaaaggacgtgccggagctgg
cagttccccctgagaaggtgagcagcgcagcctggccagaccagctga
atcgcagtgctccttgaaaactcagagttgtttgggctcctaaaacaaggtca
gaaaactacctgtaacggcctcatcttcagacctggcaattttttttttt
attacgtagtagcgttagtcagtaatcattgcaactccctccccaaaagct
cacttaacctgagacatggagactgtaatttgggagatgaaacctcagac
ctaaggcgcctctcaggtccatgtgagtcgtgcttttgttctatttgcgtg
ggtgatcgtggcgggtccgggagagtggggtcgggaggactggggcgtgctc
gggtggaaccgggagacctggctcgtttcgttcggctgcccgcggaacctt
gcctgccctgaggcacaacctccctctcgggggctccagaaaaggcctccgg
gatccctgggcttggcgggagagccattttacctaaaatgccaaaagaaa
accgcagggcacaaaaacgagtcacogggttgtctgagtagactggggaa
gctgacaagctctcacctcaactcgggaggcaggacctgtgggtatttgggt
gttttaagtttgaatcatctgcagcctgtctgagggcctcagcaggacg
cgcgoggggogccctgactatttcttggctccgaagcgggttggggaca
ccaggcgaagcgggagctgttctgtttaaaccgcccttctgtgtgaggac
goggcctcagtgacgctaocgtgggtcccgctaggggagcgcaccaccaga
aaggggagggtctcggccgaocggtccgggaggcccccagggttgggtatcttg
cctgggtgcttccagagggaggagaaaggggaggcgaacagtcagaaatgc
agaagtgcgagccgctcagagtcggggtaaccacccgcccccgagctaga
gtttttggaaaacgaaaagcgggtctaagcccagggaocgctgcgttttcgtt
aagaacaaaaactccagcaaatacttgaaaacacttgagtaacgcgcgttg
tttctttaaaacattttgtcagaggttgggtgagttcttttaattggcaoa
aattaaattcagctggatattttccattattctacccgctttttgcgctg
gttaaaaataatccttttagtagctcaaatgttgacttactgagcaataag
tggcaatttacaccttaagaaaacgagtgtaaatcactcgcactctaatt
tgctgtaagtttacgaaagagctgctggctcgggttaatctgaaagcattt
tcattcaaatgtctatcggaaacaaacaccaggcttcttaaatcccgcgtg
aattagctttcaagtatcctattaaacctcttcacctttcgggctatcct
attcaaaaagccccctttttaaaatataatgtgtcttggctcttttaatt
gaggttattaaagaaatctagtttcttctcccaccccctcctcaatcctc
ttttctctctcgcactccacctcccactgcccgcaccccccttttagcc
gggtgttccccgctccgctatgattgacgctctggaaagaaagagctttgtg
aggggatgattgttattaaactgttatccccggcggggggggcggggaacc
gacgtgccccgggtgagcgcoggagacccggagcccggggagcgcgggaocg
agctaccagcgtcgggtggcggcogccagcggccagcgaaggaggctgc
gcgccagcccgcccgggcggcccgggctcaggcgcogtgacggctgcaocg
cgctgccccgcactctgagggccttcattagctcgcctcccgcgcccaggg
ctggggcggggcagcacgctcggaaacttctgatctgtttctccatacttctc
tccccctcctactccgcagTGTCAAGGGCTCAITGCAGAGGAGTGCAGGGC
GGACTACAGCCCTGGCGGCCGGGAGGACTCGCAAAGGCGCCGGGGAAGAG
GGACTG
    
```

**Figura 3:** secuencia de ST6GALNAC5 (región reguladora, exón 1, intrón 1 y exón 2) obtenida de Refseq NM\_030965 (hg19). La secuencia codificante está en mayúsculas y la región rica en CpG está subrayada.

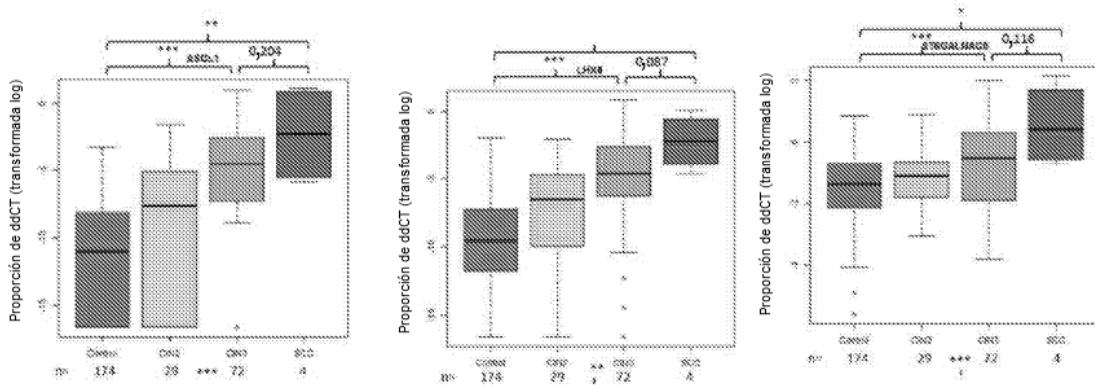
```
>hg19_refGene_NM_030965
agatgttaagtaatacattaagacaactatthttcactgagcaatttcaca
agaaatatgttttttagctaaattagacatttaacaaatgccatttgtaat
tcaatgcagaggagacagcatccttaaaacaagctattgatgtgactttc
ccaacataaaacaataccttatgtttttttaattttaattgaagtcctgaa
tgtgaaactatcgccgtcagtgacagtagaccaacggaaagcaccaaaatac
cttaggattatgaaataagccatattgcagttttatctctagcagacagaa
attcttcatccaaattaggaagaatctacaggtcaagttaatcatgtagc
tgtgacgtgctgaatgttttttaaaactttaagatcatttagatgaacact
aggaaactcagaggtcaggcagaaaatgtaaaattgtaaatattcaatgaaaa
taataaatgaaataattgagatgaaatattatctaaagaatgcatgagaa
taactgaatctgataaaagtataaattaaaattaagagagaagagaaaaataa
gaaagtgagcaattgaaaaacggaataataaataatthtttaagaaaaat
aatttcatcatgtatthttctctatgctacgtacataaacgcaaacgctata
aatagagttattgacatthgggaggttgatttgthttttatcaacatcgca
aaacagaaaaatthagggtgcagatthttcacatggctatcaogttcagaat
ccaatcaggttctccttcttactacttgatgacttctttaaagataaat
aagcccgcggaaccaagaagtgggtacactggctcgggttaactctctctcc
ccagaaatthcactactgaaaagattattatthggggcggggaagggga
tgtagaggtctthaggaccagcagggcggcggcagggcggcagttgtgtag
atcgctgagagactacgagggtecggttcagthtttaattctgtctetaat
CTCTGCAACAGCCGCGCTTCCCGGGTCCCGCGGCTCCCGCGCGCGATCTG
CCGCGGCCCGGCTGCTGGGC AAAAATCAGAGCCGCTCCGCCCCATFACCC
ATCATGGAAACCCCTCCAGGAAAAAGTGGCCCCGGACGCGCGAGCCTGAGG
ATTCTGCACAAAAGAGGTGCCAAAATGAAGACCCTGATGgtgagtcagtc
tgtggcaactccaccgggcaaaagagggggatccccgggctcaggggtccac
gggacgcaccgtggagactccgagacgcctaaccctgggcccgcaggtcg
cctgttacaaagggacaactthctaccgctccgcggttccctcccgatcc
tccagctctgcctggctcggaaatcccagagccaggatgggaactcgggggt
tgcctgcctcctagatctccggcgagaggtccgaggggggtggcggagag
ctgcaggagcagtgaggagtgggcagattgctcaagggatgggggtgcc
caaaagcaacagcctgcaaaaaactaagagggacggggaggggggacctt
tgcagactthctcgtthttcttagatthcaaaacttgcaaggatcgcaagg
atccagggccccaggaaaggaggggtgtgaaggactcaaaatthcagcag
cttggctgggggtggctggccagacgggcocttccccaaagtgcasaacc
accctgtcctcggccccggcgcgctccctcctcagccccggggcgtac
accacctgcccctctaccgagagatctggggcggcggcggccgaaagcagcg
acgcgcccggagcatcccttgcgatacgcctaggggacgggtgctthctctg
tcccagttgcgtgcccgggggtggggcccaggccgccccaaatctcccc
cactagagtgaccaccgcacagttgtccccgctggggcgcgctcctccgggt
gtctgcgctcagccgctctctctctctctccccgcccgcagCGCC
ATGGTCTGGCAGTGTGTTAGCGCTCACCAACATGTGCACCAGCTTGTGTTG
CTAGTGTACAGCAGCCTCGGGCGCCAGAAGGAGCGGCCCCCGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGGCGTCCGCCACCGGCAGCTCGC
AGCCGGCGGGGAGAGCAGCACCCAGCAGCGCCCCGGGGTCCCCGCGGGA
CCGCGGCCACTGGACGGATACCTCGGAGTGGCGGACCA|CAAG
```

Figura 4

A. Automuestras de lavado positivas para hrHPV



B. Automuestras de cepillado positivas para hrHPV



C.

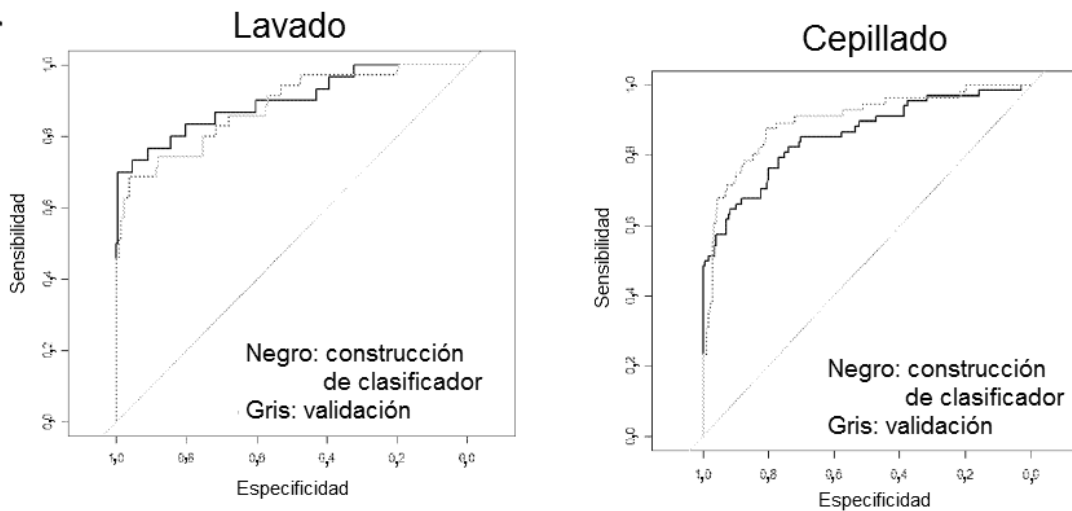
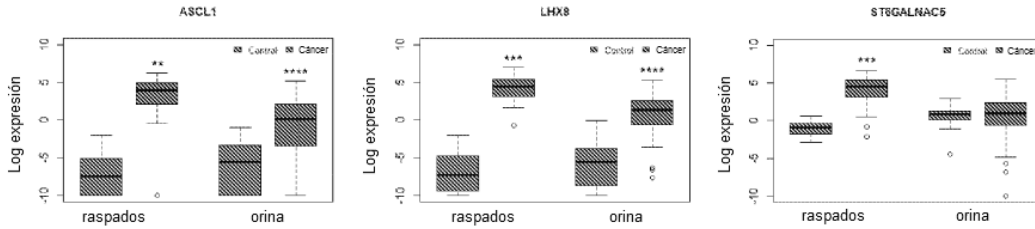
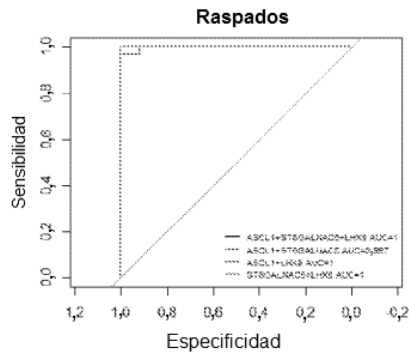


Figura 5

A. Resultados de qMSP en raspados y orina



B. Curvas de características operativas del receptor (ROC) en raspados HPV+



C. Curvas de características operativas del receptor (ROC) en orina

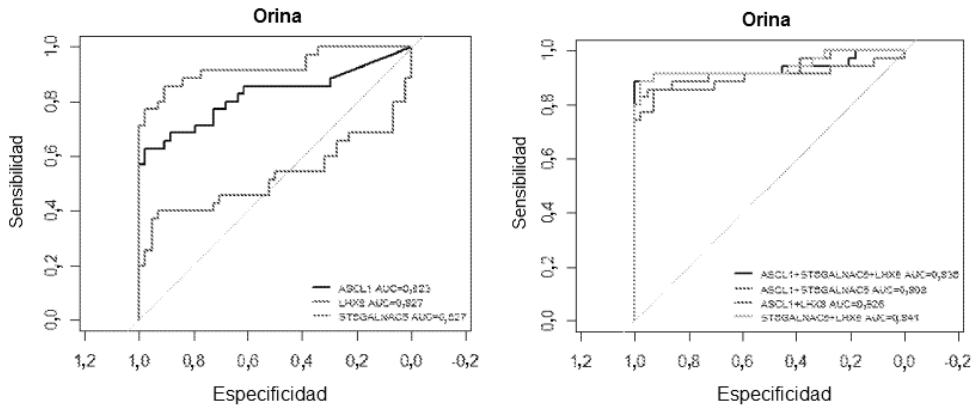
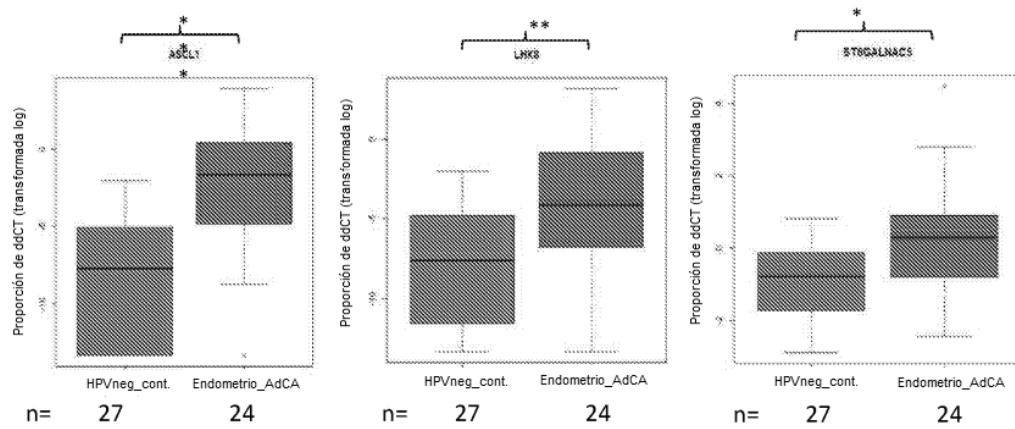


Figura 6

Resultados de qMSP en raspados cervicouterinos de pacientes con cáncer endometrial



**Figura 7:** secuencia de ZNF-582 (región reguladora y exón 1) obtenida de Refseq NM\_144690 (hg19). La secuencia codificante está en mayúsculas y la región rica en CpG está subrayada.

```

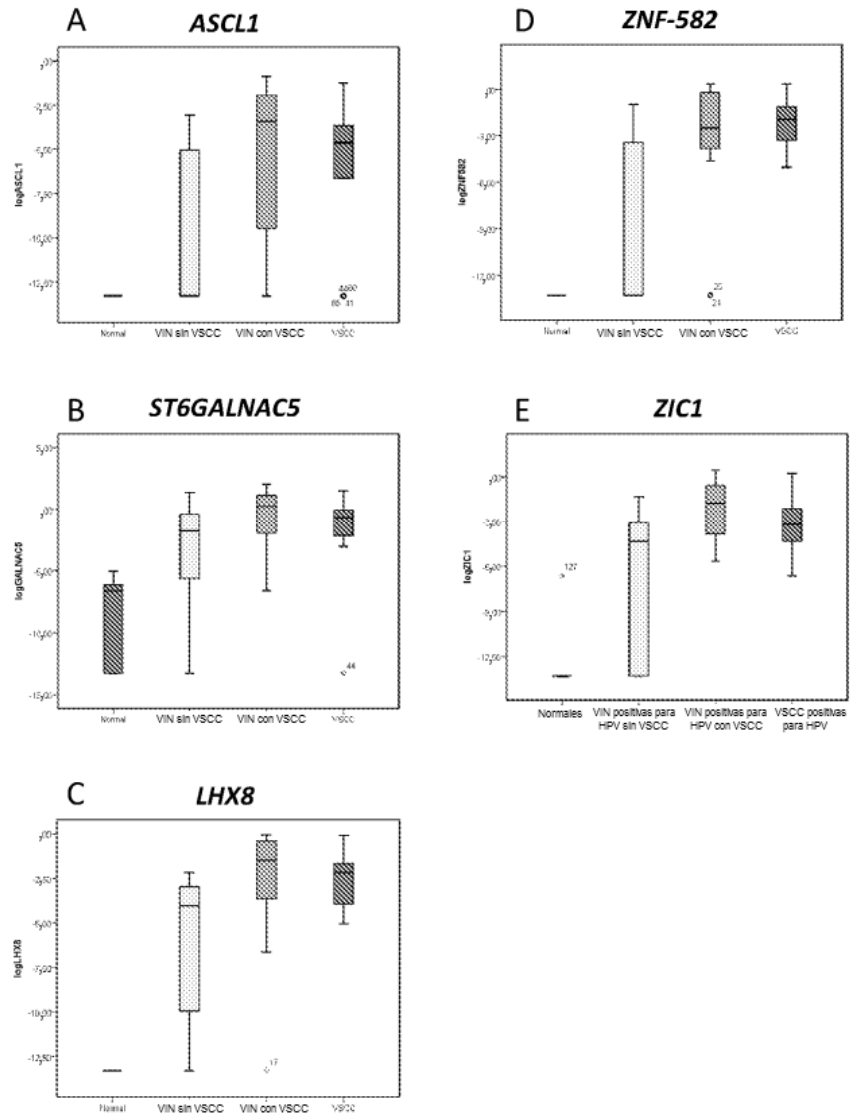
>hg19_refGene_NM_144690
agttcaggcattctggctccagtcttagagatggttaagggttcacactc
ttaaccatttattacaccatagagctcaccaggtttgagggaacaggat
caaatcaaaagagtcactcaggactccagtcctcactcaaggacaaactg
ttccacctcggacagggagagtttccgcattctgagaccagcataacag
gtcctgaccggcatctggcactcggactcccaatcatactggatcacact
ggctcgggatgtgtaaagtccagggttctcacatttgatgacaccaaag
ccgcctaaaaacaagagagaattaacaactacctacggcggctctgatatt
tgcccaagagatgccgccccataaaactcctttacatctttataacgttt
ttatthttgcgttctccttcataaccacatttaactcaccatagatgtaa
tgthtaaaattagttaccagataaaactcttacgcttccaaactttaaggt
tccttcgaaaccttctggtaaaactgthgttccacggaaatgggaacgta
acggatgaggcaatcttcacagccgcacacagttgtgtatccaccgcta
aacggtcccagtcatacattcaacgacccacgaggagtcagaagctacca
ccacacactgtcaaaatcacgcacacacagtgacggccccttgcccactc
ggtcactcgcaccacaatctctcgttagagaatcacacgcagatagcacac
ccagcaccacagaccccaggaagcaaccaggactcgaacacacgaaaca
gcaactcctccggcactgcgcaggcacgcctgcgtccggctcacctgaa
acatcgcgagatccggcttcaaggccgggtgctgcctttacgcctaaag
actatgthtcccggaagacactcgggcgcccgcctatcatggcgagca
tcggtgtgctthgtgcgtctgcgcatcttccggctgcgcacggcgaatc
CACCGGTACCGTGGTGGGAAGCGCGCCCTGGGCTGCCGGGGGCGCGGCCGC
GGTGGCACTTGGACCCGAGGAGGCGGCAG

```



**Figura 9**

Resultados de qMSP en muestras vulvares



**Figura 10**

Resultados de qMSP en muestras anales

