



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 467**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03075928 .6**
86 Fecha de presentación : **31.03.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1464709**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2004**

54 Título: **Detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras con potencial invasivo.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **Stichting Researchfonds Pathologie
Jekerstraat 19 2HG
1078 LW Amsterdam, NL**

72 Inventor/es: **Meijer, Christophorus, Joannes,
Lambertus, Maria;
Snijders, Petrus, Josephus, Ferdinandus y
Steenbergen, Renske, Daniela, Maria**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 298 467 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

Detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras con potencial invasivo.

5 Campo de la invención

La presente invención es del campo de la medicina y se refiere a un marcador molecular para el diagnóstico de cáncer invasivo inducido por el papilomavirus humano (HPV) y sus lesiones precursoras, tales como cáncer invasivo cervical, lesiones premalignas cervicales con potencial invasivo y cáncer no cervical invasivo de alto riesgo inducido por el papilomavirus humano (HPV). En particular, la presente invención se refiere al uso del gen *TSLC1* como marcador para el cáncer invasivo inducido por el HPV y sus lesiones precursoras.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer del cérvix uterino es el segundo cáncer más común en las mujeres en todo el mundo y es el responsable de aproximadamente 250.000 muertes por cáncer cada año.

El desarrollo del cáncer cervical está caracterizado por una secuencia de lesiones premalignas, denominada neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que está clasificada en grados del I al III, refiriéndose a displasia leve (CIN I), displasia moderada (CIN II) y displasia severa/carcinoma *in situ* (CIN III).

En la década pasada estaba bien establecido que la carcinogénesis cervical se iniciaba por una infección con papilomavirus humano (HPV) de alto riesgo. La expresión de los oncogenes virales E6 y E7, que alteraban la ruta de los supresores de tumores p53 y Rb, respectivamente, ha mostrado ser esencial tanto en el comienzo de la oncogénesis como en el mantenimiento de un fenotipo maligno. Sin embargo, siguiendo el patrón de un proceso de carcinogénesis multietapas, se requieren alteraciones adicionales en el genoma de la célula huésped para la progresión de una célula infectada por el hr-HVP a un carcinoma invasivo.

Conforme a los múltiples eventos inherentes a la carcinogénesis cervical está la observación de que sólo una pequeña proporción de mujeres infectadas con HPV de alto riesgo desarrollarán lesiones cervicales premalignas de alto grado (CIN III) o cáncer cervical, y en la mayoría de las mujeres con lesiones cervicales premalignas, las lesiones remiten espontáneamente.

Sin embargo, en la actualidad no existen marcadores para predecir que lesiones premalignas remitirán o en última instancia progresarán a cáncer cervical. Por lo tanto, la práctica médica general comprende el tratamiento de todas las mujeres con CIN II y CIN III morfológicamente confirmado, con el objetivo de prevenir el desarrollo de cáncer cervical. En consecuencia, muchas mujeres son tratadas innecesariamente e innecesariamente preocupadas.

Características de la invención

Sorprendentemente se ha encontrado que el gen supresor de tumor de cáncer de pulmón (*TSLC1*) está implicado como gen supresor de tumor en la carcinogénesis cervical y que el silenciamiento de *TSLC1*, o un bajo nivel de expresión del gen *TSLC1*, es un determinante importante en la carcinogénesis cervical. Comparado con su papel en el desarrollo de un subconjunto de carcinomas de pulmón, el silenciamiento de *TSLC1* juega un papel aún más predominante en la carcinogénesis cervical. Por lo tanto, *TSLC1* y los productos génicos del mismo proporcionan marcadores moleculares valiosos para diagnosticar las lesiones cervicales invasivas y/o predecir (mejor) que lesiones premalignas tienen mayores posibilidades de progresar a cáncer cervical.

El cáncer cervical está casi exclusivamente asociado con la infección con papilomavirus humano (HPV). El papilomavirus humano constituye un grupo de más de 100 tipos de virus, identificados por variaciones en la secuencia de ADN. Los diversos HPVs causan una variedad de enfermedades cutáneas y mucosales. Ciertos tipos pueden causar verrugas, o papilomas, que son tumores benignos (no cancerosos). Se ha encontrado que otros causan carcinoma invasivo del cérvix uterino.

Los HPVs están generalmente clasificados en tipos de alto riesgo y de bajo riesgo, basados en su capacidad de inducir cambios malignos en las células infectadas. Los HPVs de bajo riesgo, tales como 1, 2, 4, 6, 11, 13 y 32, están asociados principalmente con lesiones benignas o verrugas comunes, mientras que los de alto riesgo, tales como 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, están asociados principalmente con lesiones epiteliales premalignas y malignas. Estos HPVs de alto riesgo causan crecimientos que son usualmente planos y casi invisibles, comparados con las verrugas causadas por los del tipo de bajo riesgo, por ejemplo HPV-6 y HPV-11.

Por lo tanto, la presente invención no es adecuada solamente para detectar el cáncer cervical invasivo asociado con el gen supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*), sino también para otros cánceres invasivos que son inducidos por HPV, particularmente de los del tipo de alto riesgo, y proporciona un método para la estimación del riesgo de que las lesiones premalignas se conviertan en invasivas.

Por consiguiente, la presente invención, como se define en la reivindicación 1, da a conocer métodos de detección de cáncer invasivo inducido por HPV y sus lesiones precursoras asociadas al gen supresor de tumor de cáncer de

pulmón (*TSLC1*), en una persona que los necesite, comprendiendo dicho método el contacto de un componente celular de una célula de prueba del sujeto con un reactivo, que detecte los niveles del componente celular en la célula de prueba y determine una modificación en el nivel del componente celular en la célula de prueba, en comparación con una célula comparable saludable, en el que el componente celular indica el nivel de *TSLC1* en la célula y la modificación indica la presencia de cáncer invasivo inducido por HPV.

Los cánceres invasivos inducidos por HPV o las lesiones precursoras de los mismos muy adecuados en el contexto de la presente invención son cánceres cervicales invasivos y las lesiones cervicales premalignas con potencial invasivo, pero también cánceres invasivos y lesiones premalignas que son inducidas por HPV en otros tejidos, tales como los de la cavidad oral, orofaringe, ano, recto, pene, vulva, etc.

Una célula de prueba puede ser una célula neoplásica, una célula de proliferación cervical o cualquier otra célula en la que ha de ser detectada la presencia de un cáncer invasivo inducido por HPV o una lesión precursora del mismo asociada con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1.

En otra realización, la presente invención, como se define en la reivindicación 1, da a conocer métodos de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*) en una persona que lo necesite, comprendiendo dicho método el contacto de un componente celular determinado de una célula de prueba con un reactivo que detecta *TSLC1* y detecta una reducción de *TSLC1*, en comparación con una célula comparable normal, preferiblemente en dicha detección se determina un aumento de la metilación del promotor *TSLC1* en la célula de prueba y/o una producción reducida de *TSLC1* en la célula de prueba, si se comprara con una célula comparable normal.

En otra realización, la presente invención da a conocer métodos de tratamiento de cánceres invasivos inducidos por HPV de alto riesgo y sus lesiones precursoras, asociados a la modificación de la producción de *TSLC1* en células de prueba en una persona que lo necesite, comprendiendo dicho método el contacto de células de un paciente que sufre de dicho cáncer con una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo que incrementa el nivel de *TSLC1* en las células de prueba.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de marcadores moleculares para el diagnóstico, como se define en la reivindicación 21, para la detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras, asociados con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*), en los que dichos marcadores indican la metilación del promotor *TSLC1*, la expresión de ARNm asociado con la producción del polipéptido TALC1 y/o la pérdida alélica del cromosoma 11q23. Mediante dicho uso, se puede determinar el riesgo de progresión a cáncer invasivo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la región regulatoria 5' *TSLC1* (-894 a -1) y las secuencias codificante y transcrita no codificante 3' (1 a 1456), derivadas de los códigos de acceso al Genbank AP_003172 y NM_014333, respectivamente. Los codones de inicio y parada se representan en cursiva y están subrayados.

Descripción detallada de la invención

“Expresión” se refiere a la transcripción de un gen a ARN (ARNr, ARNt) estructural o ARN mensajero (ARNm) y, si es aplicable, a la posterior traducción a proteína.

El término “cáncer invasivo inducido por HPV” se refiere a un carcinoma inducido por un HPV de alto riesgo, que invade el tejido circundante.

El término “cáncer cervical invasivo” se refiere a un carcinoma cervical que invade el tejido circundante.

Los términos “lesión premaligna” y “lesión precursora” se refieren a un estado en la evolución celular multietapas del cáncer con una posibilidad fuertemente incrementada de progresar a carcinoma. Con la morfología clásica, el patólogo es incapaz de predecir en el paciente individual cuál de estas lesiones progresará o remitirá. La presente invención se refiere a un método que puede predecir la progresión a cáncer invasivo.

El término “potencial invasivo” se refiere al potencial para invadir el tejido circundante y consecuentemente convertirse en maligno.

El término “lesión premaligna cervical” se refiere a un estado en la evolución celular multietapas a cáncer cervical con una posibilidad fuertemente incrementada de progresar a carcinoma cervical. Con la morfología clásica, el patólogo es incapaz de predecir en el paciente individual cuál de estas lesiones progresará o remitirá.

El término “capaz de hibridarse específicamente a” se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de realizar un apareamiento específico con bases de una secuencia complementaria de ácido nucleico y enlazarse a las mismas para formar un ácido nucleico doble.

ES 2 298 467 T3

Un “complemento” o “secuencia complementaria” es una secuencia de nucleótidos que forma un puente de hidrógeno doble con otra secuencia de nucleótidos, según las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de bases complementaria de 5'-AAGGCT-3' es 3'-TTCCGA-5'.

5 El término “condiciones severas de hibridación” se refiere a condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración salina, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones son optimizadas empíricamente para maximizar las uniones específicas y minimizar las uniones no específicas del cebador o la sonda a su secuencia diana del ácido nucleico. El uso de los términos incluye referencias a las condiciones bajo las que una sonda o cebador se hibridará con su secuencia diana, en un grado detectablemente mayor que otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces por encima del fondo). Las condiciones severas son secuencias dependientes y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridarán específicamente a temperaturas mayores. Generalmente, las condiciones severas son seleccionadas para que estén 5°C por debajo del punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria híbrida con una sonda o cebador coincidiendo perfectamente. Comúnmente, las condiciones severas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de ión Na, comúnmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ión Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas o cebadores pequeños (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60°C para sondas o cebadores grandes (por ejemplo, más de 50 nucleótidos). Las condiciones severas pueden ser logradas también con la adición de agentes desestabilizadores, tal como formamida. Condiciones ejemplares de baja severidad o “condiciones de severidad reducida” incluyen la hibridación con una solución tampón de 30% de formamida, 1M NaCl, 1% SDS a 37°C y un lavado en 2x SSC a 40°C. Condiciones ejemplares de alta severidad incluyen la hibridación en 50% formamida, 1M NaCl, 1% SDS a 37°C, y un lavado en 0,1x SSC a 60°C. Los procedimientos de hibridación son bien conocidos en el estado de la técnica y se han descrito en, por ejemplo, Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., 1994.

El término “oligonucleótido” se refiere a una secuencia corta de monómeros nucleotídicos (usualmente de 6 a 100 nucleótidos) unidos por enlaces de fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, alquil y aril fosfatos, fosforotioato), o por enlaces no fosfóricos (por ejemplo, peptídico, sulfamato y otros). Un oligonucleótido puede contener nucleótidos modificados que tengan bases modificadas (por ejemplo, 5-metil citosina) y grupos azúcares modificados (por ejemplo, 2'-O-metil ribosil, 2'-O-metoxietil ribosil, 2'-fluoro ribosil, 2'-amino ribosil y similares). Los oligonucleótidos pueden ser moléculas naturales o sintéticas de ADN de doble o simple cadena y ARN de doble o simple cadena, con formas circulares, ramificadas o lineales e incluyen opcionalmente dominios capaces de formar estructuras secundarias estables (por ejemplo, estructuras de tallo-bucle y bucle-tallo-bucle).

El término “cebador”, tal como se usa en el documento, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de aparearse con la diana de amplificación, permitiendo que una ADN polimerasa se una, sirviendo de esta manera como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca bajo condiciones en la que es inducida la síntesis del producto de extensión del cebador, que es complementario con una cadena de ácido nucleico, es decir, en la presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador (de la amplificación) es preferiblemente de cadena simple para una eficiencia máxima en la amplificación. Preferiblemente, el cebador es un ribonucleótido oligodeoxi. El cebador tiene que ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura y el origen del cebador. Un “par de cebadores bidireccionales”, como es usado en este documento, se refiere a un cebador directo y a un cebador inverso, como es comúnmente usado en el estado de la técnica de la amplificación de ADN, tal como en la amplificación PCR.

El término “sonda” se refiere a una secuencia de un oligonucleótido de cadena simple que reconocerá y formará un doble enlace de hidrógeno con una secuencia complementaria en una secuencia de ácido nucleico diana de un analito o su ADNc derivado.

El gen *TSLC1* (supresor de tumor de cáncer de pulmón 1)(Código de acceso al GenBank NM_014333) ha sido identificado como un gen supresor de tumor en la línea celular A549 de cáncer de pulmón mediante estudios funcionales de complementación (Kuramochi y otros, 2001; *Nature Genet* 27, 427-430). Se mostró que la reexpresión de *TSLC1* en la línea celular A549 de cáncer de pulmón suprimió la tumorigenicidad en ratones desnudos. Además, la pérdida o supresión de la expresión de *TSLC1* en otras líneas celulares de cáncer de pulmón mostró estar correlacionada tanto con la tumorigenicidad como con la metástasis de bazo a hígado en ratones desnudos. Se encontró que la supresión de ARNm de *TSLC1* en estas líneas celulares correlacionó con la hipermetilación del promotor de *TSLC1*.

Un análisis posterior de cánceres de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) reveló una pérdida alélica en 11q23.2, el locus de *TSLC1*, en aproximadamente el 40% de los cánceres de pulmón y dentro de este grupo de tumores con pérdida alélica pudo ser detectada la hipermetilación del promotor del otro alelo en un 85% de los casos.

TSLC1 codifica un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina de las moléculas de adhesión a células (Ig-CAMs), que consisten en una amplia variedad de moléculas de la superficie celular que están caracterizadas por una unidad de inmunoglobulina. La proteína *TSLC1* es una glicoproteína ligada a N de 75 kDa, que está localizada en la membrana celular y está involucrada en la adhesión intracelular a través de una trans-interacción homofílica (Masuda y otros, 2002; *J Biol. Chem.*, 31014-31019).

Los presentes inventores han establecido que el silenciamiento de *TSLC1* es un evento frecuente en la líneas celulares de cáncer cervical. Se ha descubierto que el silenciamiento de *TSLC1* es resultado de la hipermetilación del promotor *TSLC1*, ya sea en combinación o no con una pérdida alélica. Estudios *in vitro* mostraron una relación funcional de la inactivación de *TSLC1* tanto en el crecimiento de anclaje independiente como en la tumorigenicidad de las células de cáncer cervical, mientras que la inmortalidad y la proliferación no se vieron afectadas. Esto apunta a una función del silenciamiento de *TSLC1* en la invasión del tumor en lugar de en la proliferación. Se sabe que la pérdida de un gen putativo supresor de tumor en el cromosoma 11 está involucrada en la tumorigenicidad de células SiHa de cáncer cervical, y la pérdida alélica en 11q22-23 ha sido detectada frecuentemente en el carcinoma invasivo cervical. Estos resultados indican que la inactivación de *TSLC1* en 11q22-23 podría desempeñar un papel crucial en la invasión del cáncer cervical.

El análisis de muestras de tejido cervical reveló que la hipermetilación del promotor *TSLC1* está limitada a solamente un subconjunto de lesiones CIN de alto grado, pero es detectable en hasta el 58% de los carcinomas cervicales invasivos. Además, la hipermetilación del promotor *TSLC1* puede ser detectada específicamente en frotis cervicales provenientes de mujeres con cáncer cervical. El análisis de las líneas celulares de cáncer cervical reveló que el silenciamiento de la expresión de *TSLC1* está presente en tanto como en el 91% (10/11) de las líneas celulares. El silenciamiento de *TSLC1* apareció no solamente asociado con la metilación del promotor, sino también con la pérdida alélica en el locus *TSLC1* y en eventos aún desconocidos, sugiriendo que el porcentaje de cáncer cervical que muestra la metilación del promotor *TSLC1* es aún una subestimación del porcentaje real de casos en los que el gen *TSLC1* es silenciado.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer, como se define en la reivindicación 1, métodos de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas con el supresor de tumor de cáncer de pulmón (*TSLC1*) en un sujeto que lo necesite, o indicativo de los mismos, comprendiendo dicho método el contacto de un componente celular de una célula de prueba del sujeto con un reactivo que detecta el nivel del componente celular en la célula de prueba y la determinación de una modificación en el nivel del componente celular en la célula de prueba, si se compara con una célula comparable saludable, en el que el componente celular indica el nivel de *TSLC1* en la célula y la modificación indica la presencia de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras.

La célula de prueba del sujeto puede comprender una célula proveniente de una muestra de células de la piel (por ejemplo, en el caso de verrugas y similares, presumiblemente causadas por infecciones cutáneas de HPV), una muestra de células mucosales, tales como las células cervicales y también otros tejidos, tales como los de la cavidad oral, orofaringe, pene, vulva, ano, recto y otros tejidos en los que serán detectado el cáncer asociado con HPV. Todas estas muestras pueden ser utilizadas como muestras en un método de la presente invención. Preferiblemente, una muestra de células de un paciente comprende células cervicales como células de prueba.

Un método de la presente invención es particularmente adecuado para la detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas al supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*) que son inducidos por HPV de alto riesgo. Un método de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas al supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*), por consiguiente, puede estar relacionado con la medición de la expresión de *TSLC1*, tal como en la forma de medir los transcritos del gen *TSLC1* y/o proteínas traducidas posteriormente por dichos transcritos. También un método de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras puede comprender la medición de la metilación del promotor *TSLC1* como una indicación de la capacidad de expresión de *TSLC1* y/o de la capacidad de producción de la proteína *TSLC1*.

La figura 1 muestra la región del promotor rica en cg anterior al codón de inicio atg en el gen *TSLC1* y la región de codificación para la proteína *TSLC1*. La metilación de la región del promotor rica en cg resultará en una disminución brusca de la transcripción o incluso en un bloqueo completo de la transcripción. Por lo tanto, la región del promotor proporciona una secuencia marcadora positiva para la potencial expresión de este gen. Alternativamente, la expresión del gen *TSLC1* puede ser detectada mediante la medición de los transcritos del gen. Como tal, la región codificante para la proteína *TSLC1* en este gen proporciona una secuencia marcadora para la detección de los transcritos de este gen. En otra alternativa, la expresión del gen *TSLC1* puede ser detectada mediante la medición de la proteína *TSLC1* directamente.

El componente de la célula de prueba con el que se hace contacto puede así ser un ácido nucleico, tales como ADN o ARN, preferiblemente ARN, o proteína. Cuando un componente celular es proteína, el reactivo es comúnmente un anticuerpo anti-*TSLC1*. Cuando el componente es un ácido nucleico, el reactivo es comúnmente una sonda de ácido nucleico (ADN o ARN) o un cebador (PCR). Usando dichas sondas o cebadores, los productos de la expresión del gen, tales como ARNm, pueden, por ejemplo, ser detectados. Alternativamente, cuando el componente celular es un ácido nucleico, el reactivo puede ser también una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para la detección de la presencia de grupos metilo en el ácido nucleico de la célula de prueba, siendo entonces dicho ácido nucleico de la célula de prueba preferiblemente ADN.

El componente de la célula de prueba puede ser detectado directamente *in situ* o puede ser aislado de otros componentes celulares mediante métodos comunes conocidos para alguien experto en la materia, antes de ponerse en contacto con el reactivo (ver por ejemplo "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel y otros 1995. 4th edi-

tion, John Wiley and Sons; "A Laboratory Guide to RNA: Isolation, analysis and synthesis", Krieg (ed.), 1996, Wiley-Liss; "molecular Cloning: A laboratory manual", J. Sambrook, E.F. Fritsch. 1989. 3 Vols, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5 Los métodos de detección incluyen análisis, tales como los análisis por transferencia "Southern" y transferencia "Northern", protección a Rnasas, inmunoensayos, hibridización *in situ*, PCR (Mullis 1987, Pat. U.S.A. No. 4 683 195, 4 683 202 y 4 800 159), LCR (Barany 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:189-193; Solicitud EP No. 320 308), 3SR (Guatelli y otros, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), SDA (Pat. USA. Nos. 5 270 184 y 5 455 166), TAS (Kwoh y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Replicasa Q-Beta (Lizardi y otros, 1988, Bio/Technology 6:1197), Amplificación en Círculo Rodante (RCA) u otros métodos para la amplificación del ADN. En un método alternativo, el ARN puede ser detectado por métodos tales como NASBA (L. Malek y otros, 1994, Meth. Molec. Biol. 28, Ch. 36, Isaac PG, ed., Humana Press, Inc. Totowa, N.J.) o TMA.

15 Las sondas de ácido nucleico, cebadores y anticuerpos pueden ser marcados de modo detectable, por ejemplo, con un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un metal quelante o un enzima. Los expertos en la materia conocen otras marcas adecuadas para unir a los reactivos o serán capaces de determinarlos usando experimentación de rutina.

20 Otros métodos de detección incluyen análisis tales como los que pueden ser realizados con conjuntos de ácidos nucleicos (Ver, por ejemplo, Chee y otros, 1996, Science 274(5287):610-614). Por ejemplo, los conjuntos de ADN pueden ser usados para la detección de ácidos nucleicos según la presente invención. Tales conjuntos comprenden oligonucleótidos con secuencias capaces de hibridizar bajo condiciones severas con el componente ácido nucleico celular, del que se detecta su nivel en un método de la presente invención.

25 Debido a que en la presente invención se muestra que una disminución del nivel de la transcripción de *TSLC1* es a menudo el resultado de la hipermetilación del gen *TSLC1*, con frecuencia se desea determinar directamente si el gen *TSLC1* está hipermetilado. En particular, las áreas ricas en citosina denominadas "islas CpG", que están en las regiones reguladoras 5' de los genes, normalmente no están metiladas. El término "hipermetilación" incluye cualquier metilación de citosina en una posición en que está normalmente no metilada en la secuencia del gen *TSLC1* (por ejemplo, el promotor *TSLC1*). La hipermetilación puede ser detectada, por ejemplo, con tratamiento con endonucleasas de restricción del polinucleótido (gen) *TSLC1* y por análisis de transferencia "Southern". Por lo tanto, en un método de la presente invención en el que el componente celular detectado es ADN, el análisis con endonucleasas de restricción es preferible para detectar la hipermetilación del gen *TSLC1*. Se puede utilizar cualquier endonucleasa de restricción que incluya CG como parte de su sitio de reconocimiento y que esté inhibida cuando la C esté metilada. Endonucleasas de restricción sensibles a la metilación, tales como BssHII, MspI, NotI o HpaII, usadas solas o en combinación, son ejemplos de dichas endonucleasas. Otras endonucleasas de restricción sensibles a la metilación serán bien conocidas para un experto en la materia.

40 Otros métodos para la detección de hipermetilación del promotor *TSLC1* incluyen la modificación de ADN por bisulfitos, en el que las citosinas no metiladas son convertidas a un uracilo, mientras que las citosinas metiladas son protegidas de la modificación química. La posterior amplificación por PCR y secuenciación revelan si las citosinas en las islas CpG son mantenidas, en caso de metilación, o sustituidas por un uracilo en caso del estado no metilado. Otro método incluye el tratamiento con endonucleasas de restricción, que incluyen CG como parte de su sitio de reconocimiento, de un producto amplificado por PCR generado a partir de ADN modificado por bisulfitos.

45 Un medio alternativo para analizar las secuencias metiladas es un PCR específico para la metilación, que está también basado en ADN modificado por bisulfitos, seguido de reacciones PCR específicas que se dirigen a las secuencias ricas en CpG objetivo.

50 Para el propósito de la invención, un anticuerpo (es decir, un anticuerpo anti-*TSLC1*) o una sonda específica de ácidos nucleicos para *TSLC1* pueden ser usados para detectar la presencia del polipéptido *TSLC1* (usando anticuerpo) o del polinucleótido *TSLC1* (usando una sonda de ácidos nucleicos) en fluidos biológicos o tejidos. Cebadores oligonucleótidos basados en cualquier región de la secuencia codificante y de la secuencia reguladora en la secuencia de *TSLC1* son útiles para la amplificación del ADN, por ejemplo, por PCR.

55 Cuando se usan cebadores de PCR, sondas de ácidos nucleicos o endonucleasas de restricción, se analizan la región reguladora 5' y la secuencia codificante de la secuencia de *TSLC1*.

60 Cualquier muestra que contenga una cantidad detectable del polinucleótido *TSLC1* o del antígeno polipeptídico *TSLC1* puede ser utilizada. El ácido nucleico también puede ser analizado mediante métodos de ARN *in situ* que son conocidos por los expertos en la materia, tales como la hibridización *in situ*. Preferentemente, las muestras para los análisis según los métodos de la presente invención incluyen muestras, tales como frotis (cervical) y/o biopsias (cervicales) y similares. Preferiblemente, frotis citológicamente anormales (cervicales) y/o biopsias de lesiones (pre) malignas de alto grado son usadas como muestras para el análisis. Aunque el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente el sujeto es un humano.

Los métodos de la presente invención pueden utilizar anticuerpos que inmunorreaccionan con el polipéptido *TSLC1*, cuya secuencia de aminoácidos predicha está disponible en el GenBank No de Acceso BAA75822, o frag-

mentos inmunorreactivos del mismo. Pueden ser usados anticuerpos que consisten esencialmente en una mezcla de anticuerpos monoclonales con diferentes características epítopes, así como diferentes preparaciones de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales son producidos, a partir un antígeno que contiene fragmentos de la proteína, por métodos bien conocidos para un experto en la materia (Kohler, y otros, Nature, 256: 495, 1975).

5

El término anticuerpo, tal como se utiliza en la presente invención, tiene el propósito de incluir moléculas intactas, así como fragmentos de los mismos, tales como Fab y F (ab')₂, que son capaces de enlazarse a un determinante epitópico de TSLC1.

10

Pueden ser utilizados anticuerpos monoclonales en los métodos de diagnóstico de la presente invención, por ejemplo, en inmunoensayos en los que pueden ser utilizados en fase líquida o enlazados a un transportador en fase sólida. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden ser marcados para ser detectados de diferentes maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la presente invención son inmunoensayos de competencia o no competitivos, ya sea en formato directo o indirecto. Ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo sándwich (inmunométrico). La detección de los antígenos utilizando anticuerpos monoclonales de la presente invención puede ser realizada utilizando inmunoensayos que pueden ocurrir en modos directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Un experto en la materia sabrá, o podrá discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayos sin una experimentación indebida.

20

Los anticuerpos monoclonales pueden ser enlazados a diferentes transportadores y utilizados para detectar la presencia de TSLC1. Ejemplos de transportadores muy conocidos son el vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextran, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetitas. La naturaleza del transportador puede ser tanto soluble como insoluble para los propósitos de la presente invención. Un experto en la materia conocerá otros transportadores adecuados para unir a los anticuerpos monoclonales, o será capaz de determinarlos usando experimentación de rutina.

25

Cuando se realizan los ensayos puede ser deseable incluir ciertos “bloqueadores” en el medio de incubación (usualmente añadidos con el anticuerpo marcado soluble). Los “bloqueadores” son añadidos para asegurar que proteínas no específicas, proteasas o inmunoglobulinas antiheterofílicas contra inmunoglobulinas anti-TSLC1, presentes en la muestra experimental, no se enlacen de manera cruzada o destruyan los anticuerpos sobre el soporte en fase sólida o el anticuerpo indicador radiomarcado, para dar resultados falsos positivos o falsos negativos. La selección de los “bloqueadores”, por lo tanto, puede sustancialmente agregar especificidad a los ensayos descritos en la presente invención. Un número de anticuerpos no relevantes (es decir, no específicos) de la misma clase o subclase (isotipo), como los que se usan en los ensayos (por ejemplo, IgG1, IgG2a, IgM, etc.) pueden ser usados como “bloqueadores”. La concentración de los “bloqueadores” (normalmente entre 1 y 100 g/μL) puede ser importante, con el fin de mantener la sensibilidad adecuada pero inhibiendo cualquier interferencia no deseada al producirse proteínas reactivas cruzadas en la muestra.

30

35

40

En la utilización de un anticuerpo monoclonal para la detección *in vivo* de antígeno, el anticuerpo monoclonal marcado para ser detectado se da en una dosis que es diagnósticamente efectiva. El término “diagnósticamente efectiva” significa que la cantidad de anticuerpo monoclonal marcado para ser detectado es administrado en suficiente cantidad para permitir la detección en el sitio que tiene el antígeno TSLC1 para el que el anticuerpo monoclonal es específico. La concentración del anticuerpo monoclonal marcado para ser detectado que es administrado debe ser suficiente, de tal manera que el enlace a aquellas células que tengan TSLC1 sea detectable en comparación con el fondo, dependiendo de las imágenes *in vivo* o del método de detección empleado, tales como MRI, scan CAT y similares. Además, es deseable que el anticuerpo monoclonal marcado para ser detectado sea rápidamente eliminado del sistema circulatorio con el fin de dar la mejor relación de la señal diana/fondo.

45

50

Como regla, la dosis de anticuerpo monoclonal marcado para ser detectado para el diagnóstico *in vivo* variará en dependencia de factores tales como la edad, sexo y extensión de la enfermedad del individuo. La dosis de anticuerpo monoclonal puede variar desde aproximadamente 0,001 mg/m² hasta aproximadamente 500 mg/m², preferiblemente de 0,1 mg/m² hasta aproximadamente 200 mg/m², más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/m² hasta aproximadamente 10 mg/m². Dichas dosis pueden variar, por ejemplo, dependiendo de si se han aplicado inyecciones múltiples, la carga del tumor y otros factores conocidos por un experto en la materia.

55

Para el diagnóstico de imágenes *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal en la selección de un radioisótopo determinado. El radioisótopo escogido tiene que tener un tipo de desintegración que sea detectable para un tipo de instrumento determinado. Otro factor importante en la selección de un radioisótopo para el diagnóstico *in vivo* es que la vida media del radioisótopo sea lo suficientemente larga, de tal manera que sea aún detectable en el momento de máxima absorción de la diana, pero suficientemente corta, de tal manera que la radiación perjudicial con respecto al huésped sea minimizada. Idealmente, un radioisótopo usado para el diagnóstico *in vivo* carecerá de una emisión de partículas, pero producirá un gran número de fotones en el rango de 140 a 250 keV, que puede ser fácilmente detectado por cámaras gamma convencionales.

65

Para el diagnóstico *in vivo*, los radioisótopos pueden enlazarse a las inmunoglobulinas ya sea directa o indirectamente usando un grupo intermedio funcional. Los grupos intermedios funcionales que son usados a menudo para enlazar radioisótopos, que existen como iones metálicos, a inmunoglobulinas son los agentes quelantes bifuncionales,

tales como el ácido dietilendiaminapentaacético (DTPA) y el ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y moléculas similares. Ejemplos típicos de iones metálicos que pueden enlazarse a anticuerpos monoclonales de la presente invención son ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr y ^{201}Tl .

5 Un anticuerpo monoclonal útil en los métodos de la presente invención también puede ser marcado con un isótopo paramagnético a los efectos del diagnóstico *in vivo*, tanto en imágenes de resonancia magnética (MRI) o resonancia de espín electrónico (ESR). En general, puede ser utilizado cualquier método convencional para la visualización de imágenes para el diagnóstico. Usualmente, son usados radioisótopos emisores de positrones y gamma para imágenes de cámaras e isótopos paramagnéticos para MRI. Elementos que son particularmente útiles en dichas técnicas incluyen
10 ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr y ^{56}Fe .

Otros métodos diagnósticos, por ejemplo *ex vivo*, para la detección de la producción de TSLC1, de la expresión del gen *TSLC1* o desórdenes en estos, incluyen métodos en los que se proporciona una muestra para el análisis, dicha muestra comprende una preparación celular del cérvix u otro tejido. Preferiblemente dichas muestras son proporcionadas como frotis. Con el fin de proporcionar esquemas de análisis eficientes, son utilizados frotis citológicamente anormales (cervicales) y/o biopsias de lesiones (pre)malignas de alto grado como muestras para el análisis.

Una muestra de tejido obtenido de un mamífero, preferiblemente un humano, es pretratada adecuadamente para permitir el contacto entre un componente celular diana de una célula de prueba, comprendida en dicha muestra, con un reactivo que detecte TSLC1 y detectar una reducción en el TSLC1 en comparación con la de una célula comparable normal. Las muestras pueden ser montadas sobre un soporte adecuado para permitir la observación de células individuales. Ejemplos de materiales de soporte bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, policarbonato, poliuretano, opcionalmente dotados de capas para mejorar la adhesión celular y la inmovilización de la muestra, tales como capas de poli-L-lisina o silano. Los frotis cervicales o biopsias pueden ser preparados, por ejemplo, como para la prueba de Papanicolau (Pap) o cualquier modificación adecuada de esta, conocida por un experto en la materia, y puede ser fijada mediante procedimientos que permitan el acceso adecuado del reactivo al componente diana. Si se requiere almacenamiento, procedimientos de rutina utilizan formalina tamponada para la fijación, seguida de una inclusión en parafina, que proporciona una infraestructura tisular bien preservada. Con el fin de permitir el teñido inmunohistoquímico o inmunofluorescente, la antigenicidad del material de la muestra tiene que ser recuperada o desenmascarada. Un método para recuperar la antigenicidad de proteínas con enlaces cruzados con formaldehído involucra el tratamiento de la muestra con enzimas proteolíticas. Este método resulta en la digestión (parcial) del material y los anticuerpos pueden acceder a simples fragmentos de las proteínas originales.

Otro método para recuperar la inmunorreactividad de antígenos con enlaces cruzados con formaldehído involucra el procesamiento térmico usando calor o alta energía en el tratamiento de las muestras. Dicho método es descrito, por ejemplo, en la Patente USA No. 5 244 787. Otro método para la recuperación de antígenos de tejidos fijados con formaldehído es el uso de una olla a presión, ya sea en combinación con un microondas o en la forma de un autoclave, tal como es descrito por Norton, 1994. J. Pathol. 173(4):371-9 y Taylor y otros 1996. Biotech Histochem 71(5):263-70.

Pueden ser utilizadas varias alternativas al formaldehído, tales como etanol, metanol, methacarn o glioxal, acetona citratada o pueden ser usados fijadores en combinación. Alternativamente, la muestra puede ser secada por aire antes del procesamiento posterior.

Con el fin de permitir la detección con sondas de ácidos nucleicos, el material de muestra tiene que ser recuperado o desenmascarado en el caso de un material fijado con formalina e incluido en parafina. Un método involucra el tratamiento con enzimas proteolíticas y una posterior fijación con paraformaldehído. La digestión proteolítica puede ser precedida por un paso de desnaturalización en HCl. Este método resulta en una digestión (parcial) del material permitiendo la entrada de las sondas hacia la diana. Procedimientos no específicos de desenmascaramiento son requeridos en el caso de un material no fijado con formalina, por ejemplo, material congelado. Antes de la hibridización las muestras pueden ser acetiladas mediante un tratamiento con un tampón de trietanolamina.

Las sondas de ácidos nucleicos o anticuerpos son entonces puestas en contacto con el material de muestra en un tampón adecuado y se le permite hibridizar específicamente o unirse a su ácido nucleico o proteína diana. Después de la unión específica de las sondas de ácido nucleico o anticuerpos a los componentes dianas, las sondas conjugadas y/o los anticuerpos pueden ser detectados mediante métodos tales como microscopía láser confocal, microscopía de campo claro, citometría de flujo opcionalmente en combinación con la clasificación de células asociadas a la fluorescencia, o modificaciones de estas técnicas, que son bien conocidas por un experto en la materia.

En una realización de un método de la presente invención, un incremento en la metilación del promotor *TSLC1* en la célula de prueba y/o reducción de la producción de TSLC1 en la célula de prueba es detectado en comparación con una célula comparable normal.

La presente invención también da a conocer métodos para el tratamiento de un sujeto con cánceres invasivos inducidos por HPV asociados con la modificación de la producción de TSLC1, o indicativo de ello, que comprende la administración a un sujeto con el cáncer de una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo que incremente la expresión de *TSLC1*. En los cánceres invasivos inducidos por HPV asociados al supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*), la secuencia nucleotídica de *TSLC1* es subexpresada en comparación con la expresión de una célula

normal, por lo tanto, es posible diseñar técnicas terapéuticas o de diagnóstico adecuadas dirigidas a esta secuencia. Por lo tanto, las secuencias de ácidos nucleicos que incrementen la expresión de *TSLC1* a nivel transcripcional o traduccional puede ser usado y, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen para *TSLC1* (mismo sentido) podrían ser administradas al sujeto con cáncer invasivo inducido por HPV, tal como el cáncer cervical invasivo.

5 El término “cáncer cervical invasivo” indica tanto poblaciones de células malignas como a premalignas, que a menudo parecen diferenciarse del tejido circundante tanto morfológicamente como genotípicamente. Estos desórdenes se han encontrado que están asociados con la ausencia o la reducción de la expresión de *TSLC1*. Esencialmente, cualquier anomalía en la célula de prueba que esté etiológicamente vinculada a la expresión de *TSLC1* podría ser considerada susceptible al tratamiento usando los métodos de la presente invención que empleen un reactivo para aumentar la expresión de *TSLC1*.

10 El aumento de la expresión de *TSLC1* puede ser logrado mediante la supresión de la metilación del polinucleótido *TSLC1* cuando *TSLC1* esté subexpresado. Cuando al diagnosticar según la presente invención, el cáncer inducido por HPV detectado esté asociado con la expresión de *TSLC1*, dichos reactivos supresores de la metilación, como 5-azacitadina, pueden ser introducidos en una célula. Alternativamente, cuando al diagnosticar según la presente invención, el cáncer cervical invasivo detectado esté asociado con la subexpresión del polipéptido *TSLC1*, una secuencia polinucleótida en el mismo sentido (la cadena de ADN codificante) que codifica para el polipéptido *TSLC1*, o secuencias nucleotídicas reguladoras 5' (es decir, promotor) de *TSLC1* en un enlace operable con el polinucleótido *TSLC1* puede ser introducido en la célula. Demetilinas conocidas en el estado de la técnica podrían también ser utilizadas para eliminar la metilación.

15 La presente invención también da a conocer terapia génica para el tratamiento del cáncer inducido por HPV asociado con la modificación de la producción de *TSLC1*. Dicha terapia puede lograr su efecto terapéutico mediante la introducción del polinucleótido *TSLC1* apropiado que contiene un gen *TSLC1* estructural (mismo sentido), en células de sujetos que tienen cáncer inducido por HPV. Los esquemas y el procedimiento para efectuar el tratamiento terapéutico del gen son conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo en el documento WO 02/14557. La entrega de las construcciones del polinucleótido *TSLC1* en el mismo sentido puede ser lograda usando un vector de expresión o usando un sistema de dispersión coloidal, preferiblemente un vector de expresión recombinante, siendo preferiblemente dicho vector de expresión recombinante un plásmido, una partícula viral o un fago.

20 Las secuencias de polinucleótidos utilizadas en los métodos de la presente invención pueden ser secuencias nativas no metiladas, o alternativamente, pueden ser una secuencia en la que un análogo no metilable es sustituido en la secuencia. Preferiblemente, el análogo es un análogo no metilable de citidina, tal como 5-azacitadina. Otros análogos serán conocidos por los expertos en la materia. Alternativamente, dichos análogos no metilables pueden ser administrados a un sujeto como terapia de drogas, sola o simultáneamente con un gen estructural en el mismo sentido de *TSLC1* o un promotor en el mismo sentido de *TSLC1* operablemente unido a un gen estructural de *TSLC1*. Preferiblemente, el polinucleótido *TSLC1* utilizado en los métodos de la presente invención es derivado de un organismo mamífero y más preferiblemente de un humano.

25 La pérdida alélica del locus *TSLC1* (o LOH) puede ser detectada mediante amplificación PCR de secuencias polimórficas que flanquean al gen *TSLC1*. Tanto el ADN de las células de prueba como de las células saludables del mismo individuo son amplificadas por PCR. Los dos fragmentos PCR que representan a ambos alelos son separados en un gel de poliacrilamida o por electroforesis capilar. Los productos PCR derivados del ADN de células saludables y de células de prueba son comparados, en los que la pérdida de uno de dos fragmentos PCR en las células de prueba es indicativo de una pérdida alélica/supresión genética del locus *TSLC1*.

30 La presente invención también da a conocer un equipo (“kit”) de piezas, como se define en la reivindicación 22, para usar en un método de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*) en células de pruebas de un sujeto. Dicho equipo (“kit”) puede comprender adecuadamente un cepillo o espátula para tomar una raspadura (cervical) junto con un recipiente lleno con medio de colección para colectar las células de prueba. Alternativamente, un dispositivo de muestreo que consiste en una jeringuilla de irrigación, un catéter de orina femenino desechable y un recipiente con fluido de irrigación estarán incluidos para colectar células cervicales mediante un lavado vaginal.

35 Un equipo (“kit”) según la presente invención puede comprender cebadores y sondas para la detección de la metilación del promotor *TSLC1*, para la detección de pérdidas alélicas en el cromosoma 11q23.2 o para la detección de la expresión del ARNm de *TSLC1*. En otra realización, un equipo (“kit”) según la presente invención puede comprender anticuerpos y reactivos para la detección de la proteína *TSLC1* en raspados cervicales o muestras de tejidos.

40 Un equipo (“kit”) de piezas, según la presente invención, comprende medios para la detección de la metilación del promotor *TSLC1* o la expresión de *TSLC1*, tales como anticuerpos específicos de *TSLC1*, enzimas de restricción sensibles a la metilación, o sondas o cebadores capaces de hibridizarse con la secuencia de nucleótidos de la figura 1.

45 En otra realización alternativa de un equipo (“kit”) de la presente invención, los medios para la detección de la metilación del promotor *TSLC1* o la expresión de *TSLC1* pueden estar combinados con medios para la detección de la infección de HPV, preferiblemente para la detección de la infección de HPV de alto riesgo. Dichos medios pueden comprender cebadores o sondas específicas para HPV que son conocidas en el estado de la técnica.

La presente invención será ilustrada mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

5 Ejemplo 1a

Silenciamiento frecuente de TSLC1 en líneas celulares de carcinoma cervical

10 Los niveles de expresión de ARNm de *TSLC1* fueron medidos en 11 líneas celulares de carcinoma cervical mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real usando la tecnología Lightcycler (Roche). Comparado con células epiteliales primarias normales, el ARNm de *TSLC1* fue indetectable en 8 de las 11 líneas celulares y severamente reducido en otras 2 líneas, mostrando que regulación por disminución de *TSLC1* es aparente en el 91% (10/11) de las líneas celulares de carcinoma cervical analizadas.

15 Por otra parte, la expresión de *TSLC1* fue todavía abundante en células de HPV inmortalizadas. Estas células de HPV inmortalizadas no son aún tumorigénicas y habían mostrado previamente ser representativas de lesiones cervicales premalignas *in vivo*.

20 A continuación, fue llevado a cabo el análisis de los mecanismos subyacentes en la regulación por disminución de *TSLC1*. Además de los eventos genéticos, es decir, supresiones y mutaciones de inactivación, los eventos epigenéticos pueden resultar en el silenciamiento del gen, como ha sido descrito para los cánceres de pulmón (Kuramochi y otros, 2001).

25 Ejemplo 1b

Papel de la metilación en el silenciamiento de TSLC1 en células de cáncer cervical

30 Para evaluar si un evento de metilación fue esencial en el silenciamiento de *TSLC1* en células de cáncer cervical, las líneas celulares SiHa, HeLa y CaSki fueron tratadas con el inhibidor de la metilación 5-aza citadina. Los niveles de RNAm de *TSLC1* fueron comparados con los niveles de expresión en células epiteliales primarias, los que fueron fijados a 100%. Después de 5 a 7 días de incubación con 5-azacitadina, los niveles de expresión de *TSLC1* fueron sobrerregulados desde 0% a 26% en células SiHa, y desde 4% a 70% y desde 0% a 33% en células HeLa y CaSki, respectivamente. Estos datos indican que en todas estas tres líneas celulares la regulación por disminución de *TSLC1* resulta, al menos en parte, de un evento de metilación.

35 Después fue estudiada la metilación del promotor *TSLC1* mediante la secuenciación de bisulfito radioactivo. Se encontró que todos los sitios (6) CpG secuenciados fueron metilados en 9 de 11 líneas celulares de cáncer cervical. Con excepción de una línea celular, no se detectaron secuencias de tipo salvaje en estas líneas celulares, indicando que la metilación del promotor *TSLC1* fue clonal. En las restantes dos líneas celulares no estaban metilados ninguno de los sitios CpG. Con excepción de una línea celular, la metilación del promotor *TSLC1* fue correlacionada con una expresión de ARNm de *TSLC1* reducida o indetectable. Ninguna metilación del promotor *TSLC1* fue detectada en cuatro aislamientos de células epiteliales normales y en células no tumorigénicas de HPV inmortalizadas.

45 Ejemplo 1c

Papel de la supresión cromosomal en el silenciamiento de TSLC1

50 Para analizar si una supresión cromosomal atribuida al silenciamiento de *TSLC1* se realizó un análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) usando ocho marcadores polimórficos que flanquean al gen *TSLC1*. Se dispuso de ADN normal derivado tanto de linfoblastos como de fibroblastos de ocho líneas celulares de carcinoma cervical. En tres (38%) de estas líneas celulares fue aparente una pérdida alélica en 11q23.2. Estas tres líneas revelaron una hipermetilación del promotor *TSLC1* y ausencia de ARNm de *TSLC1* detectable, sugiriendo que la supresión alélica combinada con la hipermetilación del promotor provoca un silenciamiento completo del gen.

55 El análisis de las líneas celulares inmortalizadas de HPV mostró un LOH en 11q23.2 en todos los pares de inmortalización de una de las cuatro líneas celulares. Sin embargo, la expresión de *TSLC1* fue aún detectable en estos pares y no se encontró ninguna metilación del promotor, indicando que el alelo conservado era aún transcrito activamente. Ninguna pérdida alélica en 11q23 fue detectada en las otras tres líneas celulares.

60 En su conjunto, estos datos muestran que el silenciamiento de *TSLC1* en células de cáncer cervical puede resultar de 1) metilación del promotor de un alelo combinado con la supresión del otro alelo, como se encontró en 3 de 8 líneas celulares, 2) la metilación del promotor sin pérdida alélica, sugiriendo tanto que ambos alelos están hipermetilados o que uno esté mutado, como fue encontrado en dos líneas celulares, o 3) otros mecanismos aún desconocidos, como fue encontrado en dos líneas celulares.

65

Ejemplo 2

TSLC1 suprime el crecimiento independiente de anclaje in vitro y la tumorigenicidad en ratones desnudos

5 La transformación maligna *in vitro* de células epiteliales infectadas por hr-HPV se ha demostrado para proceder de la posterior adquisición de 1) un fenotipo inmortal y 2) un fenotipo de anclaje independiente, que puede ser medido mediante el crecimiento de las células en agarosa blanda.

10 Para analizar si el silenciamiento de *TSLC1* está funcionalmente relacionado con el desarrollo de cáncer cervical, la secuencia que codifica para *TSLC1* fue transfectada en la línea celular de cáncer cervical SiHa, en la que la expresión de *TSLC1* endógeno fue indetectable. La reexpresión de *TSLC1* en estas células SiHa negativas de ARNm de *TSLC1* resultó en un crecimiento altamente reducido en agarosa blanda, que es una medida del anclaje independiente, mientras que el crecimiento en una monocapa normal no fue afectado. Además, la reexpresión de *TSLC1* en células SiHa resultó en una supresión del crecimiento tumoral en ratones desnudos en dos de cuatro transfectantes SiHa/*TSLC1* y los tumores que aparecieron en los transfectantes SiHa/*TSLC1* crecieron más lentamente que los controles.

En conclusión, estos resultados muestran que *TSLC1* puede suprimir tanto el anclaje independiente como el crecimiento tumorigénico de células de cáncer cervical, sin afectar la inmortalidad y la proliferación.

20 Ejemplo 3

Silenciamiento de TSLC1 en muestras de tejido cervical

25 Para determinar en que estado durante la carcinogénesis cervical ocurre el silenciamiento de *TSLC1 in vivo*, fue analizado el estado de la metilación del promotor *TSLC1* en muestras de tejido cervical.

30 Ya que las muestras de tejido consisten en una mezcla de componentes estromales y células anormales, se determinó la sensibilidad del ensayo para detectar islas CpG metiladas sobre un fondo de ADN normal no metilado. Mediante el análisis de una serie de diluciones del ADN de SiHa (promotor *TSLC1* metilado) en ADN derivado de queratinocitos primarios (promotor *TSLC1* no metilado), se encontró que podría ser aún detectado con una alta confiabilidad un valor tan bajo como 5% de ADN metilado en un fondo de ADN no metilado, utilizando una secuenciación con bisulfito radioactivo e un dispositivo Genomyx.

35 Utilizando este método, ninguna de las 15 biopsias epiteliales cervicales normales reveló metilación del promotor *TSLC1*. Similarmente, la metilación del promotor *TSLC1* fue indetectable en todas las lesiones CIN de grado bajo (n=10). De 30 lesiones CIN de grado alto un 35% mostró metilación del promotor *TSLC1*. Además, fueron analizadas un total de 50 secciones de células escamosas de carcinoma cervical, de las que el 58% (29/50) mostró metilación del promotor *TSLC1*. Por lo tanto, la metilación del promotor *TSLC1* parece ser un evento bastante frecuente en células escamosas de carcinoma cervical y ocurre al final de la secuencia multietapa de la carcinogénesis. Ya que, además de la hipermetilación del promotor *TSLC1*, otras alteraciones, incluyendo la pérdida alélica en 11q23.2, pueden contribuir al silenciamiento de *TSLC1*, el porcentaje real de silenciamiento de *TSLC1* en carcinomas cervicales es probable que sea mayor de 58%.

Ejemplo 4

45 *Detección de la metilación del promotor TSLC1 en frotis cervicales*

50 En un pequeño estudio piloto se evaluó si la detección de alteraciones de *TSLC1* puede ser aplicada a frotis cervicales y si como tal puede ser usada como marcador en programas de cribaje de cáncer cervical.

55 Para ello, fue analizada la metilación del promotor *TSLC1* en frotis de archivo de mujeres que desarrollaron cáncer cervical. Estos raspados se derivaron de casos de control retrospectivos que fueron diseñados para determinar el valor de hr-HPV para indicar frotis cervicales falsos negativos en mujeres que desarrollaron cáncer cervical y evaluar si hr-HPV está presente en frotis normales antes del cáncer cervical (Zielinski y otros, 2001; Br J Cancer 85, 398-404). El análisis de 9 frotis indexados, es decir, frotis tomados al momento del diagnóstico de cáncer cervical y clasificados como Pap4 o Pap5 (es decir, sospechoso de carcinoma *in situ*/cáncer invasivo), también como en 9 biopsias asociadas a carcinoma cervical, mostró que la metilación del promotor *TSLC1* podría ser detectada en frotis de mujeres con una biopsia de cáncer positiva a la metilación del promotor *TSLC1*. No fue detectada ninguna metilación del promotor *TSLC1* en los controles de frotis (n=12).

60 Posteriormente se determinó si la detección de la metilación del promotor *TSLC1* no solamente proporciona un marcador para el diagnóstico para detectar el cáncer cervical sino que pudiera también proporcionar un marcador la evaluación del riesgo de lesiones cervicales premalignas. Para esto, el mismo grupo de pacientes fue estudiado, como se describió anteriormente y se analizaron los frotis cervicales de archivo, que fueron tomados entre 1 y 2 años antes del diagnóstico de cáncer cervical y fueron clasificados en Pap3a2/3b, es decir, discariosis moderada a severa, fueron analizados. En un paciente, la metilación del promotor *TSLC1* pudo ser detectada en un frotis anterior al cáncer que fue tomado 1 año antes del diagnóstico de cáncer cervical.

REIVINDICACIONES

5 1. Método para la detección de cáncer invasivo inducido por HPV o lesiones precursoras de los mismos asociadas al supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (TSLC1) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método la puesta en contacto ex vivo de un componente celular seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que codifica para el polipéptido TSLC1 y el polipéptido TSLC1 de una célula de prueba del sujeto con un reactivo que detecta el nivel de dicho componente en la célula de prueba y determinando una disminución en el nivel de expresión de dicho componente celular, comparado con una célula saludable comparable.

10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer invasivo inducido por HPV o la lesión precursora del mismo es un cáncer cervical invasivo o una lesión cervical premaligna con potencial invasivo.

15 3. Método, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho cáncer invasivo inducido por HPV es un cáncer invasivo inducido por HPV de alto riesgo.

20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente celular es un ácido nucleico que codifica para el polipéptido TSLC1 y regiones reguladoras y el reactivo fija como objetivo al ácido nucleico en la célula de prueba.

25 5. Método, según la reivindicación 4, en el que el ácido nucleico es ARN, preferiblemente ARNm.

6. Método, para la detección de cáncer invasivo inducido por HPV o lesión precursora del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en dicha detección un aumento de la metilación del promotor *TSLC1* en la célula de prueba y/o una pérdida alélica del locus *TSLC1* es determinada en comparación con una célula comparable normal.

7. Método, según la reivindicación 6, en el que el reactivo es una endonucleasa de restricción, preferiblemente una endonucleasa de restricción sensible a la metilación.

30 8. Método, según las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el reactivo es una sonda de ácido nucleico o cebador que se une al ácido nucleico.

9. Método, según la reivindicación 8, en el que dicha sonda de ácido nucleico o cebador tiene un marcador detectable.

35 10. Método, según las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la sonda de ácido nucleico tiene un secuencia nucleotídica seleccionada del grupo consistente en:

40 a) una secuencia polinucleotídica capaz de hibridarse bajo condiciones severas a la región reguladora 5' o a la región codificante de la secuencia de *TSLC1*, como se establece en la Figura 1;

b) un polinucleótido que sea al menos 70% idéntico que el polinucleótido de a);

45 c) un polinucleótido complementario al polinucleótido de a); y

d) un polinucleótido que comprenda al menos 15 bases consecutivas de un nucleótido de a) o b).

50 11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el componente celular es un polipéptido TSLC1.

12. Método, según la reivindicación 11, en el que el reactivo es un anticuerpo anti-TSLC1.

55 13. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el sujeto ha perdido heterocigosidad en el cromosoma 11q23.

60 14. Uso, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un reactivo que incrementa los niveles de TSLC1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cánceres invasivos inducidos por HPV y lesiones precursoras asociadas con la producción de TSLC1 en células en un sujeto que lo necesite, en el que dicho reactivo es seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido TSLC1, una secuencia nucleotídica que codifica para TSLC1 y reactivos supresores de la metilación, tal como 5-azacitadina.

15. Uso, según la reivindicación 14, en el que el reactivo es una secuencia polinucleotídica de TSLC1 en el mismo sentido.

65 16. Uso, según la reivindicación 15, en el que dicho polinucleótido es la secuencia de sentido nativa no metilada TSLC1.

17. Uso, según la reivindicación 16, en el que un análogo no metilable es sustituido por citidina en la secuencia en

ES 2 298 467 T3

el mismo sentido de *TSLC1*.

18. Uso, según la reivindicación 17, en el que dicho análogo no metilable preferiblemente es 5-azacitadina.

5 19. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha secuencia polinucleótida está contenida en un vector de expresión.

10 20. Uso, según la reivindicación 19, en el que dicho vector de expresión preferiblemente es un plásmido, una partícula viral o un fago.

21. Uso de un marcador molecular de diagnóstico para la detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*), en el que dicho marcador es la metilación del promotor *TSLC1* y/o la expresión de ARNm de *TSLC1* o la expresión del polipéptido *TSLC1*.

15 22. Equipo ("kit") de piezas para usar en un método de detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras asociadas con el supresor de tumor de cáncer de pulmón 1 (*TSLC1*) en células de prueba de un sujeto, comprendiendo dicho equipo ("kit")

20 - medios para la detección de la metilación del promotor *TSLC1* o la expresión de *TSLC1*, en los que dichos medios comprenden sondas, cebadores y/o anticuerpos específicos para *TSLC1* o específicos para una secuencia de nucleótidos que codifica para *TSLC1* o un promotor de *TSLC1*; y

25 - medios para la detección de la infección por HPV, en los que dichos medios comprenden sondas y cebadores específicos para HPV.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 467 T3

```

-894  ccgctcttca cctgaagcct tgactaattt tttccgttgt tgtgtaatct
-844  taaatatcta atattacaaa tatttcacac atatattcaa cacacaccta
-794  tatattaata ccagggagga gaccctcgac aagcggagga gcctgagcat
-744  accctcctcg atctaccttt cccgagattc tgccgcaaaa agaccgactg
-694  gaaaatctca gaaccgact  ctacggetgc cttctccaac tatccccgag
-644  tctaccgcta ggctgttgag cgggetctcc cgctccgccc gacgtgcaaa
-594  gcacgcatgc acttctccca gattgttttg tcaatccggg gacctgcctt
-544  cttactctcc actcccgcac agcccccggt cccaaagatc tttcctctcg
-494  gtgcaagggt agtgacggaa atttgcaacg tctggttcgc taggccagat
-444  gcaactcggg tgccgggacag aggacctctt taagggagat tctccagtcg
-394  tcggntgat  acagcgattg ctataacatt ccttaataaa ggtgtacaag
-344  aagctagacc cgccccctgg agcccgagtc cttgcacgcc aggcgcccgg
-294  gagaacattt ttcttctgat cggggaaagc aaaaccgaa ttttaacata
-244  aacatatttg catacgccct tccccttggc cccgccctta ggtggcggcg
-194  gcgcgcccgc gaacgccagc gccagggggc ggggtggggg agggagcgag
-144  gccctccgag agccgggttg ggctcgcggc gctgtgattg gtctgcccg
- 94  actccgctc  cagcgcatgt cattagcatc tcattagctg tccgctcggg
- 44  ctccggaggc agccaacgcc gccagtctga ggcaggtgcc cgacatggcg
+ 7  agtgtagtgc tgccgagcgg atcccagtgt gcggcggcag cggcggcggc
+ 57  ggcgcctccc gggctccggc tccgcttct  gctgttctc  ttctccgccc
+107  eggcaactgat ccccacaggt gatgggcaga atctgtttac gaaagacgtg
+157  acagtgatcg agggagaggt  tgcgaccatc agttgccaa  tcaataagag
+207  tgacgactct gtgattcagc  tactgaatcc caacaggcag accatttatt
+257  tcagggactt caggcctttg aaggacagca ggtttcagtt gctgaatttt
+307  tctagcagtg aactcaaagt  atcattgaca aacgtctcaa tttctgatga
+357  aggaagatac ttttgccagc  tctataccga tccccacag  gaaagtatac
+407  ccaccatcac agtcttggtc  ccaccacgta atctgatgat cgatatccag
+457  agagacactg cgggtggaagg  tgaggagatt gaagtcaact gcactgctat
+507  ggccagcaag ccagccacga  ctatcaggtg gttcaaaggg aacacagagc
+557  taaaaggcaa atcggagggtg  gaagagtggg cagacatgta cactgtgacc
+607  agtcagctga tgetgaaggt  gcacaaggag gacgatgggg tcccagtgat
+657  ctgccagggt gagcaccctg  cggtcactgg aaacctgcag acccagcggg
+707  atctagaagt acagtataag  ccacaagtgc acattcagat gacttatcct
+757  ctacaaggct taaccggga  aggggacgcg cttgagttaa catgtgaagc
+807  catcgggaag ccccagcctg  tgatggtaac ttgggtgaga gtcgatgatg
+857  aatgcctca  acacgccgta ctgtctgggc ccaacctgtt calcaataac
+907  ctaaacaaaa cagataatgg  tacataccgc tgtgaagctt caaacatagt
+957  ggggaaagct cactcggatt  afatgetgta tgtatacgat cccccacaa
+1007 ctatccctcc tcccacaaca  accaccacca ccaccaccac caccaccacc
+1057 accatcctta ccatcatcac  agattcccga gcaggtgaag aaggctcgat
+1107 cagggcagtg gatcatgccg  tgatcgggtg cgtcgtggcg gtggtggtgt
+1157 tcgccatgct gtgcttctc  atcattctgg ggcctattt  tgccagacat
+1207 aaaggtacat acttcaactca  tgaagccaaa ggagccgatg acgcagcaga
+1257 cgcagacaca gctataatca  atgcagaagg aggacagaac aactccgaag
+1307 aaaagaaaga gtacttcac  tagatcagcc ttttgtttc  aatgaggtgt
+1357 ccaactggcc ctatttagat  gataaagaga cagtgatatt ggaacttgcg
+1407 agaaattcgt gtgttttttt  atgaatgggt ggaaaggtgt gagactggga
+1457 a

```

Figura 1

ES 2 298 467 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Stichting Researchfonds Pathologie
5 <120> Detección de cánceres invasivos inducidos por HPV y sus lesiones precursoras con potencial invasivo
<130> P63729EP00
<140> 03075928.6
<141> 2003-03-31
10 <160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 2351
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Descripción de la molécula combinada ADN/ARN: TSLC1
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: TSLC1
<220>
25 <221> CDS
<222> (895)..(2223)

<400> 1

30
ccgctcttca cctgaagcct tgactaatTT tttccgTTgt tgtgtaatct taaatatcta 60
atattacaaa tatttcacac atatattcaa cacacaccta tatattaaaa ccagggagga 120
35 gaccctcgac aagcggagga gcctgagcat accctcctcg atctaccttt cccgagattc 180
tgccgcaaaa agaccgactg gaaaatctca gaaccgact ctacggctgc cttctccaac 240
40 tatccccgag tctaccgcta ggctgttgag cgggctctcc cgctccgccc gacgtgcaaa 300
gcacgcatgc acttctccca gattgttttg tcaatccggg gacctgcctt cttactctcc 360
actccccgac agccccggtt cccaaagatc tattecttcg gtgcaagggtg agtgacggaa 420
45 atttgcaacg tctggttcgc taggccagat gactcgggtg tgcgggacag aggacctctt 480
taagggagat tctccagtcg tcggtntgat acagcgattg ctataacatt cettaataaa 540
gggtgtacaag aagctagacc cccccctgg agcccgagtc cttgcacgcc aggcgccccg 600
50 gagaacattt ttccttgatc cggggaaagc aaaaccgaa ttttaacata aacatattttg 660
catacgcctt tccccctggc cccgccctta ggtggcgcgg gcgcgcgcc gaacgccagc 720
gccagggggc ggggtggggg agggagcgag gccctccgag agccgggttg ggctcgccgc 780
55 gctgtgattg gtctgccccg actccgcctc cagegcatgt cattagcatc tcattagctg 840
tccgctcggg ctccggaggc agccaacgcc gccagtctga ggcaggtgcc cgac atg 897
Met
1
60 gcg agt gta gtg ctg ccg agc gga tcc cag tgt gcg gcg gca gcg gcg 945
Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys Ala Ala Ala Ala Ala
5 10 15

65

ES 2 298 467 T3

	gcg	gcg	gcg	cct	ccc	ggg	ctc	cgg	ctc	cgg	ctt	ctg	ctg	ttg	ctc	ttc	993
	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	
			20					25					30				
5	tcc	gcc	gcg	gca	ctg	atc	ccc	aca	ggt	gat	ggg	cag	aat	ctg	ttt	acg	1041
	Ser	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Pro	Thr	Gly	Asp	Gly	Gln	Asn	Leu	Phe	Thr	
		35					40				45						
10	aaa	gac	gtg	aca	gtg	atc	gag	gga	gag	ggt	gcg	acc	atc	agt	tgc	caa	1089
	Lys	Asp	Val	Thr	Val	Ile	Glu	Gly	Glu	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Gln	
	50				55					60					65		
15	gtc	aat	aag	agt	gac	gac	tct	gtg	att	cag	cta	ctg	aat	ccc	aac	agg	1137
	Val	Asn	Lys	Ser	Asp	Asp	Ser	Val	Ile	Gln	Leu	Leu	Asn	Pro	Asn	Arg	
				70						75					80		
20	cag	acc	att	tat	ttc	agg	gac	ttc	agg	cct	ttg	aag	gac	agc	agg	ttt	1185
	Gln	Thr	Ile	Tyr	Phe	Arg	Asp	Phe	Arg	Pro	Leu	Lys	Asp	Ser	Arg	Phe	
			85					90						95			
25	cag	ttg	ctg	aat	ttt	tct	agc	agt	gaa	ctc	aaa	gta	tca	ttg	aca	aac	1233
	Gln	Leu	Leu	Asn	Phe	Ser	Ser	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Asn	
		100					105					110					
30	gtc	tca	att	tct	gat	gaa	gga	aga	tac	ttt	tgc	cag	ctc	tat	acc	gat	1281
	Val	Ser	Ile	Ser	Asp	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Cys	Gln	Leu	Tyr	Thr	Asp	
		115				120					125						
35	ccc	cca	cag	gaa	agt	tac	acc	acc	atc	aca	gtc	ctg	gtc	cca	cca	cgt	1329
	Pro	Pro	Gln	Glu	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro	Arg	
	130				135					140						145	
40	aat	ctg	atg	atc	gat	atc	cag	aga	gac	act	gcg	gtg	gaa	ggt	gag	gag	1377
	Asn	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Gln	Arg	Asp	Thr	Ala	Val	Glu	Gly	Glu	Glu	
				150						155					160		
45	att	gaa	gtc	aac	tgc	act	gct	atg	gcc	agc	aag	cca	gcc	acg	act	atc	1425
	Ile	Glu	Val	Asn	Cys	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr	Ile	
				165					170					175			
50	agg	tgg	ttc	aaa	ggg	aac	aca	gag	cta	aaa	ggc	aaa	tcg	gag	gtg	gaa	1473
	Arg	Trp	Phe	Lys	Gly	Asn	Thr	Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	
			180					185					190				
55	gag	tgg	tca	gac	atg	tac	act	gtg	acc	agt	cag	ctg	atg	ctg	aag	gtg	1521
	Glu	Trp	Ser	Asp	Met	Tyr	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Leu	Met	Leu	Lys	Val	
		195				200					205						
60	cac	aag	gag	gac	gat	ggg	gtc	cca	gtg	atc	tgc	cag	gtg	gag	cac	cct	1569
	His	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Val	Pro	Val	Ile	Cys	Gln	Val	Glu	His	Pro	
	210				215					220						225	
65	gcg	gtc	act	gga	aac	ctg	cag	acc	cag	cgg	tat	cta	gaa	gta	cag	tat	1617
	Ala	Val	Thr	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Gln	Arg	Tyr	Leu	Glu	Val	Gln	Tyr	
				230						235					240		
70	aag	cca	caa	gtg	cac	att	cag	atg	act	tat	cct	cta	caa	ggc	tta	acc	1665
	Lys	Pro	Gln	Val	His	Ile	Gln	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Gln	Gly	Leu	Thr	
				245					250					255			
75	cgg	gaa	ggg	gac	gcg	ctt	gag	tta	aca	tgt	gaa	gcc	atc	ggg	aag	ccc	1713
	Arg	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Ile	Gly	Lys	Pro	
			260					265					270				
80	cag	cct	gtg	atg	gta	act	tgg	gtg	aga	gtc	gat	gat	gaa	atg	cct	caa	1761
	Gln	Pro	Val	Met	Val	Thr	Trp	Val	Arg	Val	Asp	Asp	Glu	Met	Pro	Gln	
		275					280					285					

ES 2 298 467 T3

```

cac gcc gta ctg tct ggg ccc aac ctg ttc atc aat aac cta aac aaa 1809
His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn Lys
290 295 300 305

5 aca gat aat ggt aca tac cgc tgt gaa gct tca aac ata gtg ggg aaa 1857
Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser Asn Ile Val Gly Lys
310 315 320

10 gct cac tcg gat tat atg ctg tat gta tac gat ccc ccc aca act atc 1905
Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Pro Pro Thr Thr Ile
325 330 335

15 cct cct ccc aca aca acc acc acc acc acc acc acc acc acc acc 1953
Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
340 345 350

20 atc ctt acc atc atc aca gat tcc cga gca ggt gaa gaa ggc tcg atc 2001
Ile Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Ser Ile
355 360 365

agg gca gtg gat cat gcc gtg atc ggt ggc gtc gtg gcg gtg gtg gtg 2049
Arg Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Val Val
370 375 380 385

25 ttc gcc atg ctg tgc ttg ctc atc att ctg ggg cgc tat ttt gcc aga 2097
Phe Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe Ala Arg
390 395 400

30 cat aaa ggt aca tac ttc act cat gaa gcc aaa gga gcc gat gac gca 2145
His Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys Gly Ala Asp Asp Ala
405 410 415

gca gac gca gac aca gct ata atc aat gca gaa gga gga cag aac aac 2193
Ala Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Asn Asn
420 425 430

35 tcc gaa gaa aag aaa gag tac ttc atc tag atcagccttt ttgtttcaat 2243
Ser Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
435 440

gagggtgtcca actggcccta ttttagatgat aaagagacag tgatattgga acttgcgaga 2303
aattcgtgtg ttttttatg aatgggtgga aagggtgtgag actgggaa 2351

40 <210> 2
    <211> 442
    <212> PRT
45 <213> Secuencia artificial
    <223> Descripción de la secuencia artificial: TSLC1

    <400> 2

50 Met Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys Ala Ala Ala Ala
    1 5 10 15
    Ala Ala Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu
    20 25 30
55 Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly Gln Asn Leu Phe
    35 40 45
    Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala Thr Ile Ser Cys
    50 55 60
    Gln Val Asn Lys Ser Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn
    65 70 75 80
60 Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu Lys Asp Ser Arg
    85 90 95
    Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys Val Ser Leu Thr
    100 105 110
    Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys Gln Leu Tyr Thr
    115 120 125

```

ES 2 298 467 T3

	Asp	Pro	Pro	Gln	Glu	Ser	Tyr	Thr	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Val	Pro	Pro
		130					135					140				
	Arg	Asn	Leu	Met	Ile	Asp	Ile	Gln	Arg	Asp	Thr	Ala	Val	Glu	Gly	Glu
5	145					150					155				160	
	Glu	Ile	Glu	Val	Asn	Cys	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	Lys	Pro	Ala	Thr	Thr
					165					170					175	
	Ile	Arg	Trp	Phe	Lys	Gly	Asn	Thr	Glu	Leu	Lys	Gly	Lys	Ser	Glu	Val
				180					185					190		
	Glu	Glu	Trp	Ser	Asp	Met	Tyr	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Leu	Met	Leu	Lys
			195						200				205			
10	Val	His	Lys	Glu	Asp	Asp	Gly	Val	Pro	Val	Ile	Cys	Gln	Val	Glu	His
		210					215					220				
	Pro	Ala	Val	Thr	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Gln	Arg	Tyr	Leu	Glu	Val	Gln
		225				230					235					240
	Tyr	Lys	Pro	Gln	Val	His	Ile	Gln	Met	Thr	Tyr	Pro	Leu	Gln	Gly	Leu
					245					250					255	
15	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Ile	Gly	Lys
				260					265					270		
	Pro	Gln	Pro	Val	Met	Val	Thr	Trp	Val	Arg	Val	Asp	Asp	Glu	Met	Pro
			275					280					285			
	Gln	His	Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Pro	Asn	Leu	Phe	Ile	Asn	Asn	Leu	Asn
		290					295					300				
20	Lys	Thr	Asp	Asn	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Glu	Ala	Ser	Asn	Ile	Val	Gly
					310						315					320
	Lys	Ala	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Leu	Tyr	Val	Tyr	Asp	Pro	Pro	Thr	Thr
					325					330					335	
	Ile	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
				340					345					350		
25	Thr	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Asp	Ser	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu	Gly	Ser
			355					360					365			
	Ile	Arg	Ala	Val	Asp	His	Ala	Val	Ile	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Val	Val
		370					375					380				
	Val	Phe	Ala	Met	Leu	Cys	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ala
					390						395					400
30	Arg	His	Lys	Gly	Thr	Tyr	Phe	Thr	His	Glu	Ala	Lys	Gly	Ala	Asp	Asp
					405					410					415	
	Ala	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Ala	Ile	Ile	Asn	Ala	Glu	Gly	Gly	Gln	Asn
				420					425					430		
	Asn	Ser	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Tyr	Phe	Ile						
			435					440								