

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **17/06/2009** (51) Int. Cl: **C12Q 1/68** (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **30/03/2007** (86) Número de solicitud PCT: **EP 05/10680**
(21) Número de solicitud: **2007003865** (87) Número de publicación PCT: **WO 2006/037611 (13/04/2006)**

(30) Prioridad(es): **01/10/2004 EP 04023490.8**

(71) Solicitante:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 07360 Distrito
Federal MX**

(72) Inventor(es):

**Francisco Javier Camacho Arroyo
Av. Instituto Politécnico Nacional, Número 2508,
Ofic. de la Subdirección de Asuntos Jurídicos, Edif.
Dirección-Administración, 3er. Piso Distrito Federal
07360 MX
Walter Stühmer
Luis A. Pardo
Mike Rothe
Esther Zwick-Wallasch**

(74) Representante:

**LUIS ANTONIO CARREÑO SÁNCHEZ.*
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Ofic. de la
Subdirección de Asuntos Jurídicos, Edif. Dirección-
Administración, 3º Piso Distrito Federal 07360 MX**

(54) Título: **MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE INFECCIONES VIRALES Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS O DE LA PREDISPOSICIÓN DE UN INDIVIDUO A DESÓRDENES PROLIFERATIVOS O HIPERPLASIA.**

(54) Title: **METHODS FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF VIRAL INFECTIONS, INFLAMMATORY DISEASES, A PREDISPOSITION FOR PROLIFERATIVE DISORDERS OR HYPERPLASIA BY ANALYSING EAG OR ERG EXPRESSION LEVELS.**

(57) Resumen

La presente invención provee un método para la identificación de la predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia y un método para el diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria, comprendiendo el paso de análisis del nivel de expresión de un gen para un canal de potasio eter à go-go (EAG) y10 un gen relacionado con el gen para el éter a go-go (ERG) o la actividad de un correspondiente producto de los genes en una muestra de tejido o células.

(57) Abstract

The present invention provides a method for the identification of the predisposition of a subject for a proliferative disorder or a hyperplasia and a method for the early diagnosis of a viral infection or an inflammatory disease, comprising the step of analyzing the level of expression of an ether Å go-go (EAG) potassium channel gene and/or an ether Å go-go related gene (ERG) or the activity of a corresponding gene product in a sample of tissue or cells.

MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE INFECCIONES VIRALES Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS O DE LA PREDISPOSICIÓN DE UN INDIVIDUO A DESÓRDENES PROLIFERATIVOS O HIPERPLASIA

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con un método para la identificación de la predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia y un método para el diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria, comprendiendo el paso de análisis del nivel de expresión de un gen para el canal de potasio éter à go-go (EAG) y/o un gen relacionado al gen para éter à go-go (ERG) o la actividad del correspondiente producto de los genes en una muestra de tejido o células.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Varios documentos son citados a través del texto de esta especificación. El contenido expuesto de cada uno de los documentos citados aquí (incluyendo cualquier especificación del fabricante, instrucciones, etc.) está incorporado con referencias.

Las infecciones virales, las enfermedades inflamatorias y las enfermedades proliferativas representan grupos mayores de las enfermedades comunes en la actualidad. Por lo menos algunas de las enfermedades mencionadas amenazan la vida, mientras que otras pueden ser de larga duración ó resultar en una reducción prolongada en la calidad de vida. Además, el tratamiento de las enfermedades mencionadas requiere una alta partida de los presupuestos de salud públicos y privados. Por tanto, el mejoramiento de estrategias para el tratamiento o, aun más deseable, la prevención de la manifestación de tales enfermedades es de gran importancia para la ciencia médica.

Tomando como base un progresivo entendimiento de la naturaleza heterogénea de muchas condiciones patológicas, un principal objetivo del desarrollo

médico/farmacéutico es el establecimiento de terapias individuales o dirigidas para el tratamiento de enfermedades, medicina personalizada. Tales terapias específicas incluyen por ejemplo anticuerpos terapéuticos, pequeñas moléculas inhibitoras, ácidos nucleicos de interferencia, una dieta individual y la administración de una individualmente seleccionada o dosificada composición farmacéutica.

Con el objetivo de una aproximación a una terapia dirigida para ejercer/promover el máximo beneficio clínico, es de particular ventaja identificar una persona en la necesidad de tal terapia lo más temprano posible. Lo mismo es cierto para el tratamiento de enfermedades por métodos convencionales. Por tanto, hay una necesidad de indicadores para una predisposición de un sujeto a una enfermedad y para el inicio de la enfermedad. Los candidatos para ser tales indicadores son los marcadores moleculares.

Los canales de potasio juegan un rol importante en varias funciones celulares tales como la excitabilidad, contracción, progresión del ciclo celular y metabolismo (1). En particular, algunos miembros de la familia de canales de potasio ether à go-go (EAG) son modulados a través del ciclo celular (2-8) y han sido sugeridos de participar en la tumorigénesis (9-17). Los canales EAG de rata expresados en oocitos de rana presentan una rectificación inducida por el factor promotor de la mitosis (2), y sus propiedades conductoras cambian durante el ciclo celular (3). El ácido retinóico regula a la baja la corriente que fluye por hEAG en células de neuroblastoma (4). hEAG se expresa transitoriamente antes de la fusión de mioblastos, evento relacionado con el ciclo celular (5, 6). La expresión de hEAG normalmente decrece durante la fase M y es modulada por elementos del citoesqueleto (7). Las subunidades de otros miembros de la familia de canales EAG, el gen relacionado con el éter à go-go humano (hERG), son diferencialmente expresados a través del ciclo celular (8).

Uno de los aspectos más intrigantes de los canales hEAG y hERG es su relación con la transformación celular. Células transfectadas con EAG son capaces de crecer en ausencia de suero, pierden la inhibición por contacto e inducen tumores agresivos

cuando son inyectadas en ratones inmuno-suprimidos (9). La expresión del mRNA de EAG en tejidos normales está principalmente restringida al cerebro. Es además expresado transitoriamente en músculo esquelético y ligeramente expresado en la placenta. Por otro lado, el mRNA de EAG es expresado en varias líneas celulares de cáncer incluyendo HeLa, MCF-7, SHSY-5Y e IGR1 provenientes de carcinoma de 5 cervix, tumor de mama, neuroblastoma y melanoma respectivamente (9,10). A pesar de la mayor expresión de EAG en el cerebro normal (9) corrientes endógenas mediadas por EAG solamente han sido reportadas en mioblastos (6) y en las líneas celulares tumorales SHSY-5Y (4), MCF-7 (11) e IGR1 (10). EAG es expresado en la 10 línea tumoral HeLa (9); sin embargo, ninguna corriente mediada por EAG han sido descritas en estas células.

La expresión de EAG y de la corrientes mediadas por EAG en células transformadas parece ser un evento importante para la proliferación celular, debido a que la inhibición 15 de la expresión de EAG con nucleótidos antisentido reduce la proliferación en algunas líneas de cáncer (9). De manera similar, se ha propuesto que la inhibición de la corriente mediada por EAG por imipramina tiene un efecto depresor de la proliferación de las células IGR1 (12). Además, células que expresan canales EAG no conductores no inducen a formación de tumores cuando son inyectadas en ratones inmuno- 20 suprimidos. El mRNA de EAG ha sido descrito no solo en líneas celulares tumorales si no además en varios tumores humanos incluyendo el de glándula mamaria, hígado, próstata, cérvico-uterino, ovario, endometrio, colon y tiróide; un porcentaje significativo de tumores epiteliales muestran una robusta expresión de EAG (13), mientras los canales hERG son expresados en varias líneas celulares de cáncer de diferente 25 histogénesis incluyendo células provenientes de leucemia (14-16) y con frecuencia en biopsias de cáncer endometrial (17).

En WO 99/54463 ha sido descrito que el análisis de la expresión y actividad de EAG puede ser usada para la detección de el inicio o progresión (estatus de la enfermedad) 30 del cáncer. Sin embargo, en este caso un paciente está ya afectado por el cáncer.

En vista de la alta relevancia de la enfermedad arriba descrita para la salud pública el problema técnico que abordó la presente invención fue el de proveer medios y métodos los cuales hagan posible una prevención o un alivio de las mencionadas enfermedades o detecten una predisposición a desarrollar una enfermedad. En el
5 último caso, ésta permitirá tomar acciones previas al inicio o manifestación de las enfermedades.

La solución al mencionado problema técnico se consigue proveyendo ejemplos caracterizados en las reivindicaciones.
10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Expresión de EAG en cérvix canceroso y normal

15 Se presenta un análisis de Southern blot de productos de RT-PCR de 475-pb de hEAG para RNAs obtenidos a partir de los cultivos primarios de biopsias de cáncer cervical (A, carriles 1-5), adenocarcinoma endocervical (A, carril 6), y cérvix control (A, carriles 7-12). Señales de hEAG fueron detectadas en cervices control (B) de pacientes cuyas
20 muestras fueron diagnosticadas con infección de virus de papiloma humano (carril 14), hiperplasia adenomatosa atípica del endometrio (carril 15) y cistadenoma seroso paratubárico sin células atípicas (carril 16); en 1 caso (carril 17) no fue posible establecer un diagnóstico detallado, por que el endometrio fue reportado como
25 histológicamente lisado. Células CHO transfectadas con hEAG fueron usadas como controles positivos (carriles 13 y 18). Hibridación con una sonda contra ciclofilina (Cyc) de los mismos RNAs son presentadas en la parte de abajo de cada gel.

Figura 2: Relaciones corriente-voltaje en células de cáncer cervical

30 Experimentos de patch clamp en la configuración de célula completa fueron realizados y un protocolo de rampa desde -80 a 120 mV fue aplicado a células aisladas obtenidas

de cultivos primarios de cáncer cervical. La corriente lineal de fuga fue sustraída una vez se extrapoló el ajuste lineal de la corriente medida entre -80 y -70 mV a el rango total. Cuatro diferentes curvas I-V fueron encontradas en diferentes células en cada cultivo. En algunas células, claras corrientes entrantes fueron seguidas por una corriente saliente (A); otras células presentaron muy pequeñas corrientes entrantes seguidas por una corriente saliente ligeramente inactivante (B); trazos con la presencia de unas pequeñas corrientes salientes inactivantes seguidas por una corriente no inactivante fueron también registradas (C); y finalmente, algunas células mostraron únicamente corrientes salientes no inactivantes (D) donde la actividad de EAG fue detectada. Eh -80 mV.

Figura 3: Activación dependiente de voltaje y magnesio de las corrientes salientes

15 A, corrientes no sustraídas (trazos izquierdos) promovidas a 60 mV precedidas por prepulsos negativos a diferentes voltajes indicado en el extracto amplificado (trazos derechos).

20 B, Corrientes salientes promovidas a 60 mV precedidas de prepulsos negativos a -140 o -60 mV en soluciones libres de magnesio (trazos izquierdos) o en soluciones conteniendo 10 mmol/L de magnesio.

25 C, activación dependiente de voltaje (tiempo en alcanzar el 80% de la amplitud máxima, promedio, n= 6 para cada condición; barras, D.E.) a diferentes concentraciones externas de magnesio. La activación es fuertemente dependiente del voltaje del prepulso y del magnesio extracelular como era esperado para los canales EAG.

Figura 4: muestra de hígado teñida para EAG1

30

(a) muestra una hepatitis de interfase con células inflamatorias y necrosis Piecemeal.

(b) una hepatitis nutritiva-tóxica con gotas de grasa

5 **Figura 5. Tinción de EAG en tejido pancreático**

Inmunohistoquímica demuestra inmunoreactividad para EAG1 en pancreatitis pero no en tejido conectivo (a). Además, la expresión de EAG1 fue encontrada en un metaplasia Mucinous (b).

10

Figura 6.

Ausencia de tinción para EAG1 (a) en ductos normales prostáticos mientras que en (b) una hiperplasia prostática benigna fue inmunoreactiva.

15

La invención es ahora descrita en referencia a los siguientes ejemplos los cuales son solamente ilustrativos y no para interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención.

20 **Figura 7.**

La figura muestra la inhibición de la proliferación de las células del carcinoma de cérvix por al anticuerpo anti-Eag1 ImAb3 conjugado con la inmunotoxina saporina.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee un método para la identificación de la predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia, comprendiendo el paso de análisis de el nivel de expresión de un gen para un canal de potasio eter à go-go (EAG)

30

y/o un gen relacionado con el gen para el éter à go-go (ERG) o la actividad de un correspondiente producto de los genes en una muestra de tejido o células donde:

- 5 (a) Una detección de la expresión o actividad en la muestra mencionada de tejido o células el cual o las cuales bajo condiciones fisiológicas no presentan una expresión o actividad de uno a más de los mencionados genes es un indicador de la predisposición ya mencionada; o
- 10 (b) Una detección de un incremento en el nivel de expresión o actividad en la muestra mencionada de tejido o células comparado contra el nivel basal característico para dichas muestras de tejido o células bajo condiciones fisiológicas de uno o más de los genes mencionados es un indicativo de dicha predisposición.

15 Además, la presente invención provee en una caracterización alternativa un método para el diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria, constando de un paso de análisis del nivel de expresión de un gen para el canal de potasio eter à go-go (EAG) y/o de un gen relacionado con gen para el eter à go-go (ERG) o la actividad del producto genético correspondiente en una muestra de tejido o células donde:

- 20 (a) Una detección de la expresión o actividad en la muestra de tejido mencionada o en las células el cual o las cuales bajo condiciones fisiológicas no presentan una expresión o actividad de uno o más de los genes mencionados es un indicador para el diagnóstico mencionado; o
- 25 (b) Una detección de un incremento en el nivel de expresión o actividad en una muestra de tejido mencionada o en las células comparado contra el nivel basal característico para dichas muestras de tejido o células bajo condiciones fisiológicas de uno o más genes es un indicador para el diagnóstico mencionado.

30 El término "predisposición a una enfermedad" se entiende para describir un estatus de un sujeto previo al inicio de una mencionada enfermedad. Así, la predisposición de un

sujeto para tal enfermedad es analizada previo a un inicio temprano de la enfermedad en sí.

5 El término " diagnóstico temprano de una enfermedad" se entiende en el contexto de la presente invención como aquello que permite un diagnóstico de la enfermedad previa al desarrollo de alteraciones morfológicas. Así, la enfermedad puede ser diagnosticada previo a una manifestación de la enfermedad en su inicio temprano.

10 El término "muestra" denota en el contexto de la presente invención una muestra corporal, tales como muestras de órganos, tejidos o células de un sujeto/paciente. Preferentemente el sujeto (paciente) de donde proviene la muestra es de origen humano.

15 Muestra de tejido explícitamente comprenden en el contexto de la presente invención muestras de tejido dérmico, tales como detritus epidérmico, barridos de la mucosa, tales como, pero no limitados a la mucosa oral, tonsilar, rectal, genital o nasal (por ejemplo raspados para papanicolaus) así como muestras obtenidas por técnicas quirúrgicas incluyendo técnicas mínimamente invasivas tales como biopsias así como técnicas más invasivas. La preparación de la muestra puede comprender un cultivo del
20 material obtenido (por ejemplo en cultivo de tejido) previo a la detección de la expresión de los mencionados genes o la actividad de los productos por ellos codificados.

25 El término "expresión" de un gen caracteriza el proceso de transcripción de un gen a mRNA en una célula o en las células de un tejido. Además, en consonancia con la presente invención , dicho término además refiere a la traducción de dicho mRNA y, así, la formación del producto codificado por el gen en dicha célula o células en un tejido.

30 Como se definió dentro de este texto el EAG así como el ERG son canales iónicos transmembranales. Por tanto, la actividad de los productos genéticos codificados por el

gen para EAG o el gen para ERG es la de permitir el flujo de iones a través de la membrana de una célula.

El término "condición fisiológica" se entiende en el contexto de la presente invención para definir un estado del cuerpo, un órgano, un tejido o una célula, en donde sus respectivas funciones son no patológicas, es decir, lo representativo a un individuo saludable normal de acuerdo a lo establecido por los lineamientos y la práctica médica. Así, dichos órganos, tejidos y células en este estado no son afectadas por cualquier cambio que resulte en el desarrollo de las arriba citadas enfermedades.

Se ha encontrado de manera sorprendente que la detección de una expresión del gen para EAG o del gen para ERG es un indicador de una predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia. Además, se observó que dicha expresión es a su vez un indicador útil en el diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria. Se ha encontrado que previo al inicio de la enfermedad correspondiente, la expresión de dichos genes es primariamente iniciada o significativamente desregulada comparada con el nivel de expresión basal fisiológico. Lo mismo es cierto para la actividad de los productos codificados por estos genes. La pregunta de si la predisposición es indicada por una iniciación primaria de la expresión del gen (expresión no deseada) o por un incremento de la expresión basal (sobre-expresión no deseada) es dependiente del tejido/célula y el gen el cual es/son analizados. Por ejemplo una amplia expresión basal de los genes ERG es observada en diferentes tejidos del cuerpo humano. En contraste, es conocido en el ámbito que el gen *Eag1* está solamente expresado, bajo condiciones fisiológicas, de manera basal por ejemplo en tejidos del cerebro, nervios y riñones, mientras no hay una significativa expresión basal del gen en tejidos del cérvix uterino, hígado, páncreas y próstata.

En el contexto de la presente invención un incremento en la expresión (sobre-expresión no deseada) se entiende una sobre-expresión de al menos 2 veces comparado con el nivel basal bajo condiciones fisiológicas, preferentemente 5 veces, 10 veces o 100 veces.

Como se ha señalado dentro de este texto, no hay una expresión significativa para los genes EAG, dígase Eag1, en tejidos particulares. La detección de la expresión de Eag1 en muestras de tales tejidos es un indicador para la predisposición de un sujeto del cual dichas muestras han sido tomadas.

Se prefiere para los métodos de la invención que:

- 10 (a) Los tejidos y células las cuales bajo condición fisiológica no presentan una expresión del gen EAG o la actividad del producto genético correspondiente sean seleccionadas de un grupo de muestras provenientes de cervix uterino, hígado, páncreas y próstata; y
- 15 (b) Los tejidos y células para los cuales bajo condiciones fisiológicas un nivel basal de expresión del gen para EAG o la actividad del producto genético correspondiente es característico sean seleccionados de un grupo comprendido por muestras provenientes de cerebro, nervios y riñones.

En una organización preferida de los métodos de la invención la secuencia de ácido nucleico del gen para EAG comprende

- 20 (a) Una molécula de ácido nucleico codificando el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: NO 2 o 4;
- (b) Una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de DNA de SEQ ID: NO 1 o 3;
- 25 (c) Una molécula de ácido nucleico que hibrida con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico de (a) o (b); o
- (d) Una molécula de ácido nucleico siendo degenerada a la secuencia de la molécula del ácido nucleico de (c).

30 Además, es preferido para los métodos de la invención que la secuencia de la molécula de ácido nucleico del gen para ERG comprenda

- (e) Una molécula de ácido nucleico codificando el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: NO 6,8 o 10;
- (f) Una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de DNA de SEQ ID: NO 5,7 o 9;
- (g) Una molécula de ácido nucleico que hibrida con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico de (a) o (b); o
- (h) Una molécula de ácido nucleico siendo degenerada a la secuencia de la molécula del ácido nucleico de (c).

10

El término "hibridación" como se usa en este texto se refiere a la secuencia de polinucleótidos/ácido nucleico el cual es capaz de hibridar a los polinucleótidos codificando las proteínas EAG o ERG como aquí se definen. Así, dichos polinucleótidos pueden ser útiles como sondas en análisis Northern o Southern blot para preparaciones de RNA o DNA respectivamente, o pueden ser usados como oligonucleótidos iniciadores en análisis de PCR dependientes de su respectivo tamaño. Preferiblemente, dichos polinucleótidos hibridantes comprenden como mínimo 10, más preferible un mínimo de 15 nucleótidos en longitud mientras un polinucleótido hibridante de la presente invención para ser usado como sonda de preferencia comprende un mínimo de 100, más preferente un mínimo de 200 o aun más preferente un mínimo de 500 nucleótidos en longitud.

15

20

25

30

Es bien conocido en el ámbito como realizar experimentos de hibridación con moléculas de ácido nucleico, es decir la persona hábil en la técnica sabe qué condiciones de hibridación tiene que usar en concordancia con la presente invención. Tales condiciones de hibridación son referidas en los textos tales como Molecular cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. De preferencia de acuerdo con la presente invención son polinucleótidos los cuales son capaces de hibridar a los polinucleótidos de la invención o partes de esto, bajo condiciones astringentes de hibridación.

“Condiciones astringentes de hibridación” se refiere a una incubación durante toda la noche a 42 °C en una solución compuesta por 50% formamida, 5X SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), 5x de solución de Denhardt, 10% de sulfato dextrán y 20 µg/ml de DNA de esperma de salmón cizallada y desnaturalizada, seguida por un lavado de los filtros en 0.1X SSC a 65°C. También contempladas son moléculas de ácidos nucleicos que hibridan a los polinucleótidos de la invención en condiciones de hibridación de baja astringencia. Cambios en la astringencia de la hibridación y la detección de la señal son principalmente efectuadas a través de la manipulación de la concentración de formamida (bajos porcentajes de formamida resultan en una baja astringencia); las condiciones de salinidad, o temperatura. Por ejemplo, bajas condiciones de astringencia incluyen una incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución compuesta de 6X SSPE (20X SSPE = 3M NaCl, 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4), SDS al 0.5%, formamida al 30% , 100µg/ml esperma de salmón bloqueadora de DNA, seguido esto por un lavado a 50 °C con 1X SSPE, SDS al 0.1%. Además, para lograr aun más baja astringencia, los lavados realizados siguiendo una hibridación astringente pueden ser hechos en más altas concentraciones de sales (por ejemplo 5X SSC). Es de resaltar que variaciones en las condiciones arriba mencionadas pueden ser realizadas por medio de la inclusión y/o sustitución de un alternado grupo de agentes bloqueadores usados para suprimir el fondo en experimentos de hibridación. Típicos agentes de bloqueo incluyen el agente Denhardt, BLOTTO, heparina, esperma de salmón desnaturalizado y formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de agentes bloqueadores específicos podría requerir modificaciones a las condiciones de hibridación descritas arriba, debido a los problemas con la compatibilidad.

Las mencionadas moléculas de ácido nucleico pueden ser, por ejemplo DNA, cDNA, RNA o sintéticamente producidos DNA o RNA o una molécula quimérica de ácido nucleico producida de forma recombinante comprendiendo cualquiera de estos polinucleótidos bien sea solos o en combinación.

En una organización más preferida de los métodos de la invención la expresión del gen para EAG y/o la expresión del gen para ERG en una muestra es determinada al nivel del mRNA o de la proteína y/o la actividad de dichos productos genéticos es determinada por medios electrofisiológicos.

5

Diferentes métodos para la determinación de la expresión de un gen a nivel del mRNA o de la proteína son conocidos en el ámbito y descritos en varios manuales de laboratorio; ver por ejemplo Mülhardt, C. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics; Spektrum Akademischer Verlag 2003; REM, H. Der Experimentator Spektrum Akademischer Verlag; 2002; Lottspeich, F. And Zorbas, H. Bioanalytik Spektrum Akademischer Verlag 1998.

10

Aun más, diferentes métodos para la determinación de la actividad de un producto genético por medios electrofisiológicos son conocidos en el ámbito; ver por ejemplo Hamill, O.P et al., Plügers Arch. 1981.

15

Se prefiere aun más que la expresión de un gen para EAG y/o la expresión del gen para ERG en una muestra al nivel del mRNA sea determinada por RT-PCR, arreglos de cDNA o Northern blot. En los ejemplos incluidos en el apéndice una posible aproximación por RT-PCR es descrita en mayor detalle.

20

De preferencia, para el análisis de la expresión de un gen para EAG por RT-PCR un par de iniciadores sentido y antisentido son usados seleccionados de los iniciadores sentido teniendo una secuencia de ácidos nucleicos como la presentada en SEQ ID NO: 11 o 13 y de los iniciadores antisentido teniendo una secuencia de ácidos nucleicos como la presentada en SEQ ID NO: 12 o 14.

25

Es preferido en el cuerpo de la invención que la detección de la proteína traducida de dicho gen para EAG y/o del gen para ERG sea efectuada por el análisis inmunoblotting/western blot, por análisis inmuohistoquímico, análisis ELISA, análisis de inmunofluorescencia, análisis FACS o análisis de arreglo de anticuerpos.

30

Los anticuerpos apropiados requeridos para tal análisis son conocidos en el ámbito y descritos por ejemplo en WO 99/54463 y en una reciente aplicación fechada en octubre 1 de 2004 por el presente aplicante. Los protocolos para dicho análisis son conocidos para la persona hábil en el técnica y representan técnicas estándares en laboratorios bioquímicos.

En una organización alternativamente preferida de los métodos de la invención, la actividad de un producto de un gen para EAG y/o un gen para ERG en una muestra en el plano electrofisiológico es determinada por el análisis de patch-clamp.

La técnica de análisis patch-clamp es conocida en el ámbito y descrita en Stühmer, W., 1992, *Methods in Enzymology* 207 y en los ejemplos incluidos en el apéndice.

Conforme a una organización preferida de los métodos de la invención la muestra la cual es analizada es un cultivo de tejido de una muestra de tejido proveniente de una biopsia de dicho sujeto. Una aproximación correspondiente es descrita en los ejemplos incluidos en el apéndice.

Es preferido por la presente invención que la mencionada infección viral, enfermedad inflamatoria, desorden proliferativo o hiperplasia sea una enfermedad ginecológica.

Es además preferido que el mencionado desorden proliferativo sea cáncer. De preferencia, que dicho cáncer sea cáncer cervical.

25

Además, es preferido que la mencionada hiperplasia sea una hiperplasia adenomatosa o hiperplasia de próstata.

Aun más, es preferido que la mencionada infección viral sea una infección con Virus del Papiloma Humano o Virus de la Hepatitis C (HCV).

30

Además, es preferido que la mencionada enfermedad inflamatoria sea una pancreatitis. De forma alternativa la mencionada enfermedad inflamatoria es una pancreatitis o hepatitis.

5 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1. RT-PCR cuantitativa.

10 RNA total fue extraído de cultivos primarios de células de cáncer cervical y directamente de tejido cervical normal con el agente Trizol (Invitrogen). Células de ovario de hamster Chino (CHO) transfectadas con hEAG1 fueron usadas como control positivo. El RNA fue sujeto a una reacción de retrotranscripción, y amplificaciones de PCR fueron realizadas con los siguientes iniciadores sentido y antisentido: 5-
15 GCTTTTGAGAACGTGGATGAG-3 (SEQ ID NO:11) y 5-
CGAAGATGGTGGCATAGAGAA-3 (SEQ ID NO:12). Estas amplificaciones produjeron un producto de 475-pb de producto de hEAG1. El gen constitutivo ciclofilina fue también amplificado como control, usando los siguientes iniciadores sentido y antisentido: 5-CCC CAC CGT GTT CTT CGACAT-3 y 5-AGG TCC TTA CCG TTC TGG
20 TCG-3, respectivamente, los cuales produjeron un producto de 453-pb. La identidad del producto de reverso transcripción (RT-PCR) fue determinada por secuenciación del nucleótido en un analizador genético capilar automático (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems). Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa, transferidos a membranas de nylon, e hibridados con sondas anidadas marcadas con [³²P]dCTP. Las sondas fueron obtenidas con los siguientes iniciadores superior e
25 inferior: para la sonda de 228-pb de hEAG1, 5-TGG TCC TGC TGG TGT GTG-3 (SEQ ID NO: 13) y 5-ACA ACG AGG AGA TGT AGA CA G-3 (SEQ ID NO: 14); y para la sonda de ciclofilina de 187-pb, 5-CAC ACG CCA TAA TGG CAC TGG TGG-3 y 5- AAA GAC CAC ATG CTT GCC ATC CAGC-3. En todos los casos, los filtros fueron lavados después de 18 horas de hibridación y expuestos a una película de rayos X. Las sondas
30 de Southern blot fueron además confirmadas mediante secuenciación.

La expresión de EAG fue estudiada por RT-PCR y análisis Southern blot en 5 cultivos primarios de biopsias de cáncer cervical, en 1 tejido canceroso cervical fresco y en 12 biopsias no cancerosas de cervix normales. La Fig. 1A muestra la expresión de EAG en 100% de los cultivos primarios de cáncer cervical (carriles 1-5). Vale la pena
5 mencionar que en una paciente que fue sometida a histerectomía sin ninguna evidencia previa de malignidad cervical (papanicolaou negativo), estudios patológicos post-quirúrgicos mostraron un inesperado adenocarcinoma endocervical expresando EAG. Por tanto, debido a que esta expresión de EAG fue encontrada en tejido canceroso, esta fue agrupada junto con las muestras de cultivos primarios de células
10 de cáncer (Fig. 1A, carril 6). Estudios de la expresión de EAG en biopsias cervicales control presentaron muestras negativas o positivas para EAG, a pesar de que todas ellas provenían de pacientes con papanicolaous negativos. Experimentos de Southern blot de tejidos cervicales control negativos para EAG son también presentados en la Fig 1A (carriles 7-12); 8 de 12 muestras fueron negativas para EAG (solamente 6 son
15 mostradas).

La expresión de EAG fue observada en 4 biopsias control de tejidos cervicales normales. De manera interesante, 1 de estas muestras control positivas para EAG (Fig. 1B, carril 14) proviene de un paciente con infección de virus de papiloma humano, el
20 factor etiológico más importante asociado con cáncer cervical. Otras dos pacientes a quienes les fue encontrada la expresión de EAG en cervix normal presentaron hiperplasia atípica adenomatosa del endometrio en 1 caso y cistadenoma seroso paratubárico sin células atípicas en el otro (Fig. 1B, carriles 15 y 16, respectivamente). En 1 paciente de las muestras control positivas para EAG (Fig. 1B, carril 17) el
25 endometrio fue reportado como histológicamente lisado, por tanto un diagnóstico no pudo ser determinado. Células CHO transfectadas con hEAG fueron usadas como control positivo (Fig. 1, carriles 13 y 18).

La identidad de los productos de RT-PCR fue determinada por secuenciación de los
30 nucleótidos (datos no mostrados). Los productos amplificados fueron idénticos a la secuencia reportada para hEAG1. Nosotros determinamos que las células de las

biopsias de cáncer estudiadas aquí expresan las dos diferentes variantes de splicing que han sido reportadas para el gen hEAG1.

Ejemplo 2. Electrofisiología.

5

Registros en la configuración de célula completa fueron adquiridos de células aisladas con la técnica de patch clamp usando un amplificador EPC-9 (HEKA Electronics, Germany) y analizados con el Igor Pro (Wavemetrics). Pipetas de dos a tres M Ω fueron obtenidas por doble estiramiento de capilares Kimax. La solución interna se compuso de (mmol/L) 140 KCl, 10 EGTA y 10 HEPES/KOH (pH 7.2). La solución externa se compuso de (mmol/L) 115 NaCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂ y 10 HEPES/NaOH (pH 7.2); en algunos experimentos usamos soluciones libres de magnesio o soluciones conteniendo 2.5 o 10 (mmol/L) de MgCl₂. No se compensó la capacitancia. El potencial de mantenimiento fue de -80mV, a menos que fuera indicado. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20°C a 22°C).

15

Experimentos en la configuración de célula completa fueron realizados en 5 cultivos primarios de células de cáncer cervical. Antes de explorar la actividad de EAG, aplicamos un protocolo de rampa de voltaje (desde -80 mV hasta 120 mV) para estudiar la relación corriente voltaje. Cuatro diferentes formas de curvas I-V en cada cultivo fueron encontradas (Fig. 2). Algunas células (Fig. 2A) presentaron claras corrientes entrantes desde -30 mV a 10 mV, probablemente mediadas por canales de sodio o calcio, seguidas por una corriente saliente no inactivante. Otras células mostraron una pequeña corriente saliente en potenciales muy negativos (Fig 2B) seguida por una pequeña corriente entrante cerca de los -25 mV seguida por una corriente inactivante o rectificadora saliente. La Fig. 4C muestra una curva I-V con una muy pequeña corriente entrante en -50 mV seguida por una corriente saliente y finalmente la Fig. 2D presenta exclusivamente una corriente saliente no inactivante. Células mostrando tal curva I-V tenían las más altas densidades de corriente y fueron las únicas células donde se detectó actividad de EAG.

20

25

30

Buscamos la actividad de EAG en células tumorales estudiando su activación dependiente del voltaje y del magnesio. Prepulsos muy negativos tienen un efecto especialmente fuerte sobre la activación de EAG; mientras más negativo es el potencial del prepulso, más lenta es la activación de EAG (desplazamiento Cole-Moore, ref 20);

5 de manera similar, mientras más alta es la concentración extracelular de magnesio, más lenta es la activación de EAG. La Fig 3A muestra la dependencia al potencial de la activación de las corrientes salientes registradas en células de cáncer cervical. Trazos no restados de las corrientes promovidas a 60 mV precedidas por pulsos a diferentes potenciales son mostradas a la izquierda. Los valores de los prepulsos son

10 indicados para cada pulso en los trazos ampliados a la derecha; mientras más negativo el prepulso, más lenta la activación del canal. La activación dependiente de magnesio es mostrada en la Fig. 3B. Una corriente saliente promovida a 60 mV y precedida por un prepulso a -140 o -60 mV fueron obtenidas en soluciones externas libres de magnesio (trazos izquierdos) o en soluciones conteniendo 10 mmol/L de magnesio

15 (trazos derechos). Como es esperado para EAG, la activación es claramente retrasada en la presencia de magnesio, siendo el efecto más pronunciado al aplicar un prepulso muy negativo. La Fig 3C muestra el tiempo requerido para alcanzar el 80% de la amplitud máxima de la corriente saliente a diferentes potenciales del prepulso y a diferentes concentraciones extracelulares de magnesio. El tiempo de los valores al

20 80% son más grandes a medida que las concentraciones de magnesio son más altas y los potenciales del prepulso son más negativos como se ha descrito para los canales EAG.

Ejemplo 3. Identificación de HPV16.

25

Virus del Papiloma Humano 16. Se estudió la expresión del gen para la proteína E7 del virus del papiloma humano. DNA genómico fue obtenido mediante la técnica de fenol-cloroformo. Las amplificaciones de PCR se efectuaron con los siguientes iniciadores sentido y antisentido: 5-GACAGCTCAGAGGAGGAGGATG-3 y 5-

30 GACTCTACGCTTCGGTTGTGC-3. El producto fue separado en geles de agarosa.

Células CaSki (American Type Culture Collection, Manassas, VA) fueron usadas como controles positivos para E7.

Ejemplo 4. Inmunohistoquímica.

5

Tejidos del registro de tejidos de la Clínica de Kassel fueron analizados por inmunohistoquímica con el objetivo de elucidar el rol de EAG1 en desordenes no malignos como por ejemplo enfermedades inflamatorias o hiperproliferativas así como en tejidos afectados por infecciones virales. El uso de tejidos fijados fue aprobado por el comité revisor de la Clínica de Kassel. Los tejidos fueron fijados por 16 a 20 horas en 4% de formalina amortiguada neutralmente y entonces embebidos en parafina. Con un micrótopo bloques del tejido seleccionado fueron cortados teniendo éstos un espesor de 2-4 μm . Se montaron en portaobjetos de vidrio silanizados (Sigma) y secados a 60°C por 30 minutos y secado a 38°C durante toda la noche.

10

15 La parafina fue retirada de los cortes bañándolos en xileno por 5 minutos por dos ocasiones, en acetona por 5 minutos dos veces y finalmente en agua destilada por 5 minutos. El pretratamiento con calor de los cortes fue hecho en 10 mM de buffer citrato, pH 6.0 en un horno de microondas por 30 minutos a 250W, seguido por un lavado en agua destilada. La peroxidasa endógena fue bloqueada mediante la incubación en una solución recientemente preparada de 0.3% de H_2O_2 en metanol por 20 minutos a temperatura ambiente seguido por un lavado en agua destilada por 5 minutos. Excepto para la contratinción con hematoxilina y el montaje, los siguientes pasos fueron realizados durante toda la noche usando el Tecan-inmuostainer Genesis RSP 200 (Software: Gemini 3.40), para lo cual se procedió de acuerdo a las consideraciones del fabricante EnVision+-staining (DAKO Cytomation, ChemMate rabbit/mouse): Los cortes fueron lavados dos veces en PBS /0.05% TWEEN pH 7.4 por 7 minutos e incubados con el anticuerpo eag-1 (suplicado por U3) por 4 horas (dilución 1:200 en el diluyente para el anticuerpo (DAKO)). La reacción fue detenida con 100 μl de PBS/0.05% TWEEN pH 7.4 por laminilla. Después del lavado en 1400 μl PBS/0.05% TWEEN pH 7.4 por 7 minutos , los portaobjetos fueron incubados con el conjugado anticuerpo secundario/peroxidasa (30 minutos, 150 μl /laminilla, DAKO HRP/rabbit-mouse

20

25

30

ChemMate). Inmediatamente después del lavado la reacción de tinción fue realizada con 120 μ l/laminilla de solución DAB (DAKO; dilución 1:50 en buffer de sustrato) por 10 minutos. La reacción fue detenida con 100 μ l PBS/0.05% TWEEN pH 7.4 por 20 minutos, seguida por un lavado con 1400 μ l PBS/0.05% TWEEN pH 7.4 por 7 minutos y entonces las laminillas fueron lavadas cada dos horas con PBS/0.05% TWEEN pH 7.4, totalmente tres veces.

Finalmente, las laminillas fueron lavadas en agua, contrateñidas con hematoxilina de Harris y cubiertas con otra lamnilla. Para excluir una unión inespecífica de la molécula IgG2b, cortes control fueron incubados con un control negativo IgG2b (DAKO) en lugar del anticuerpo eag-1.

Como se demuestra en las ilustraciones de la invención fuimos capaces de mostrar, de manera sorprendente, que EAG1 estaba expresado en hiperplasia de próstata (fig 1), en pancreatitis (fig 2) y hepatitis (fig 3). Estos datos enfatizan un rol funcional para EAG en el curso de desordenes no malignos.

Ejemplo 5. Inhibición de la proliferación celular en carcinoma de cérvix por el anticuerpo humano anti-EAG1 ImAb3 de la invención conjugado a la inmunotoxina saporina.

Se puso a prueba el efecto del anticuerpo conjugado con saporina anti-EAG1, ImAb3-SAP, sobre la proliferación de células de carcinoma de cérvix. Conjugación del anticuerpo anti-EAG1 ImAb3 a saporina (ImAb3-SAP) vía una unión disulfuro y la purificación del anticuerpo conjugado ImAb3-SAP fue realizada por Advanced Targeting System (San Diego, CA, USA).

1000 células cancerosas/pozo fueron sembradas en 100 μ l de medio de cultivo conteniendo FSC al 10% en 96 pozos durante toda la noche. Después de 24 horas las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 24 horas en 60 μ l/pozo de medio conteniendo FSC al 10%. Las células fueron tratadas por cuadruplicados con 1 μ g/ml

de anticuerpo monoclonal anti-EAG1 conjugado con saporina ImAb3-SAP o control IgG-SAP diluido en 40 μ l/pozo. Las células fueron entonces incubadas a 37°C en 5% de CO₂ por 3 días. Para verificar la proliferación y la viabilidad celular 20 μ l/pozo el reactivo CellTiter 96[®] Aqueous One Solution (Promega) conteniendo la sal de tetrazolium MTS y el agente acoplador de electrón metosulfato de fenazina (PMS) fue
5 adicionado a cada pozo e incubado a 37°C durante varios periodos dentro de un rango de 10 minutos a 3 horas. La cantidad del producto formazan fue medida por la absorbancia a 590nm usando un lector de placas de ELISA. Los resultados mostrados en la fig. 1 demuestran que ImAb3-SAP inhibe la proliferación de células HeLa, una
10 línea celular derivada de cáncer de cérvix conocida como positiva para HVP-18. Además, se muestra que ImAb3-SAP significativamente interfiere con la proliferación celular de otras tres líneas más de carcinoma cervical CERV-215, CERV-196 y CERV-186 (CLS) reportadas positivas a HPV-16.

15 REFERENCIAS

1. Hille B. Ion channels of excitable membranes. 3rd. ed. Massachusetts: Sinauer Associated Inc; 2001.
2. Brüggemann A. et al.; Proc. Natl Acad Sci USA 1997;94:537-42.
3. Pardo LA. et al.; J Cell Biol 1998;143:767-75.
4. Meyer R. and Heinemann SH.; J Physiol 1998;508:49-56.
5. Occhiodoro T. et al.; FEBS Lett 1998;434:177-82.
6. Bijlenga P. et al.; J Physiol 1998;512:317-23.
7. Camacho J. et al.; Pflugers Arch 2000;441:167-74.
8. Crociani O. et al.; J Biol Chem 2003;278:2947-55.
9. Pardo LA. et al.; EMBO J 1999;18:5540-7.
10. Meyer R. et al.; J Membr Biol 1999;171:107-15.
11. Ouadid-Ahidouch H. et al.; Receptors Channels 2001;7:345-56.
12. Gavrilu-Ruch O. et al.; J Membr. Biol 2002;188:137-49.
13. Pardo L. et al.; Eur J Cancer 2002;38 Suppl 7:104.
14. Bianchi L. et al.; Cancer Res 1998;58:815-22.
15. Smith GAM. et al.; J Biol Chem 2002;277:18528-34.
16. Pillozzi S. et al.; Leukemia 2002;16:1791-8.
17. Cherubini A. et al.; Br J Cancer 2000;83:1722-9.
18. Stühmer, W., 1992, Methods in Enzymology 207
19. Hamill OP, et al., Pflugers Arch. 1981; 391: 85-100.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de la predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia, que consta del análisis del nivel de expresión de un gen para el canal de potasio éter à go-go (EAG) y/o un gen relacionado con el gen para el éter à go-go (ERG) o la actividad del correspondiente producto genético en una muestra de tejido o células donde:
 - (a) Una detección de la expresión o actividad en la muestra mencionada de tejido o células el cual o las cuales bajo condiciones fisiológicas no presentan una expresión o actividad de uno o más de los mencionados genes es un indicador de la predisposición ya mencionada; o
 - (b) Una detección de un incremento en el nivel de expresión o actividad en la muestra mencionada de tejido o células comparado con el nivel basal característico para dichas muestras de tejido o células bajo condiciones fisiológicas de uno o más de los genes mencionados es un indicativo de la predisposición ya mencionada.

2. Un método para la identificación del diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria, que consta del análisis del nivel de expresión de un gen para el canal de potasio éter à go-go (EAG) y/o un gen relacionado con el gen para el éter à go-go (ERG) o la actividad del correspondiente producto genético en una muestra de tejido o células donde:
 - (a) Una detección de la expresión o actividad en la muestra de tejido mencionada o en las células el cual o las cuales bajo condiciones fisiológicas no presenta una expresión o actividad de uno o más de los genes mencionados es un indicador para dicho diagnóstico; o
 - (b) Una detección de un incremento en el nivel de expresión o actividad en una muestra de tejido mencionada o en células comparado con el nivel basal

característico para dichas muestras de tejido o células bajo condiciones fisiológicas de uno o más genes es un indicador para el mencionado diagnóstico.

3. El método conforme a las reivindicaciones 1 o 2, donde:

5

(a) Los tejidos y células las cuales bajo condición fisiológica no presentan una expresión del gen para EAG o la actividad correspondiente a su producto genético sean seleccionadas de un grupo de muestras provenientes de cervix uterino, hígado, páncreas y próstata; y

10

(b) Los tejidos y células para los cuales bajo condiciones fisiológicas un nivel basal de expresión del gen para EAG o la actividad correspondiente a su producto genético es característico sean seleccionados de un grupo comprendido por muestras provenientes de cerebro, nervios y riñones.

15

4. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de ácido nucleico del gen para EAG comprende

20

(a) Una molécula de ácido nucleico codificando el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: NO 2 o 4;

(b) Una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de DNA de SEQ ID: NO 1 o 3;

(c) Una molécula de ácido nucleico que híbrida con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico de (a) o (b); o

25

(d) Una molécula de ácido nucleico siendo degenerada a la secuencia de la molécula del ácido nucleico de (c).

5. El método conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia de ácido nucleico del gen para ERG comprende

30

- (a) Una molécula de ácido nucleico codificando el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: NO 6,8 o 10;
 - (b) Una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de DNA de SEQ ID: NO 5,7 o 9;
 - 5 (c) Una molécula de ácido nucleico que híbrida con la hebra complementaria de una molécula de ácido nucleico de (a) o (b); o
 - (d) Una molécula de ácido nucleico siendo degenerada a la secuencia de la molécula del ácido nucleico de (c).
- 10 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la expresión de un gen para EAG y/o la expresión de un gen para ERG en una muestra es determinada a nivel de mRNA o de la proteína y/o la actividad de los productos de los mencionados genes sea determinada por medios de electrofisiología.
- 15 7. El método conforme a la demanda 6, donde la expresión de un gen para EAG y/o la expresión de un gen para ERG en una muestra de mRNA sea determinada por RT-PCR, arreglos de cDNA o análisis Northern blot.
- 20 8. El método conforme a la demanda 7, donde para el análisis de la expresión de un gen para EAG por RT-PCR un par de iniciadores sentido y antisentido sean usados seleccionados de los iniciadores sentido teniendo una secuencia como la mostrada en SEQ ID NO: 11 o 13 y de la secuencia de iniciadores antisentido teniendo una secuencia de nucleótidos como la mostrada en SEQ ID NO: 12 o 14.
- 25 9. El método conforme la demanda 6, donde la detección de la proteína traducida de dicho gen para EAG y/o gen para ERG es efectuada por el análisis immunoblotting/western blot, análisis inmunohistoquímico, análisis ELISA, análisis de inmunofluorescencia, análisis FACS o análisis de arreglo de anticuerpo.

10. El método conforme a la demanda 6, donde la actividad de un producto del gen para EAG y/o del gen para ERG en una muestra por medios electrofisiológicos sea determinada mediante el análisis de patch clamp.
- 5 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde dicha muestra es un tejido en cultivo de una muestra de tejido obtenida de una biopsia de dicho sujeto.
- 10 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha infección viral, enfermedad inflamatoria, desorden proliferativo o hiperplasia es una enfermedad ginecológica.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 , donde dicho desorden proliferativo es cáncer.
- 15 14. El método conforme a la demanda 13, donde dicho cáncer es cáncer cervical.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicha hiperplasia es hiperplasia adenomatosa o hiperplasia de próstata.
- 20 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 , donde dicha infección viral es una infección con Virus de Papiloma Humano o Virus de la Hepatitis C (HCV).
- 25 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha enfermedad inflamatoria es una pancreatitis o una hepatitis.
- 30

RESUMEN

La presente invención provee un método para la identificación de la predisposición de un sujeto a un desorden proliferativo o una hiperplasia y un método para el diagnóstico temprano de una infección viral o una enfermedad inflamatoria, comprendiendo el paso de análisis del nivel de expresión de un gen para un canal de potasio eter à go-go (EAG) y/o un gen relacionado con el gen para el éter à go-go (ERG) o la actividad de un correspondiente producto de los genes en una muestra de tejido o células.

Fig. 1

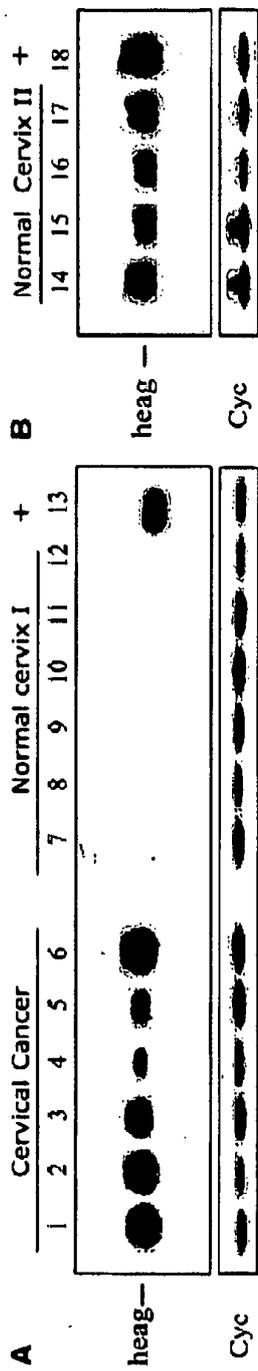
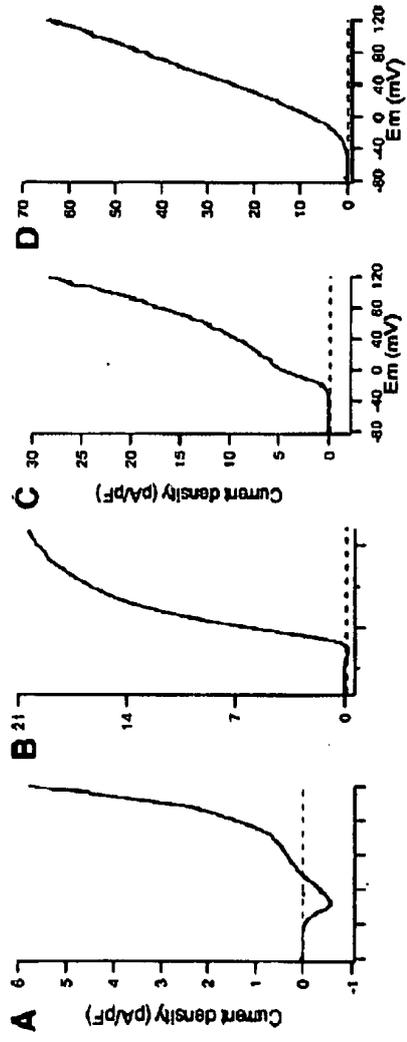


Fig. 2



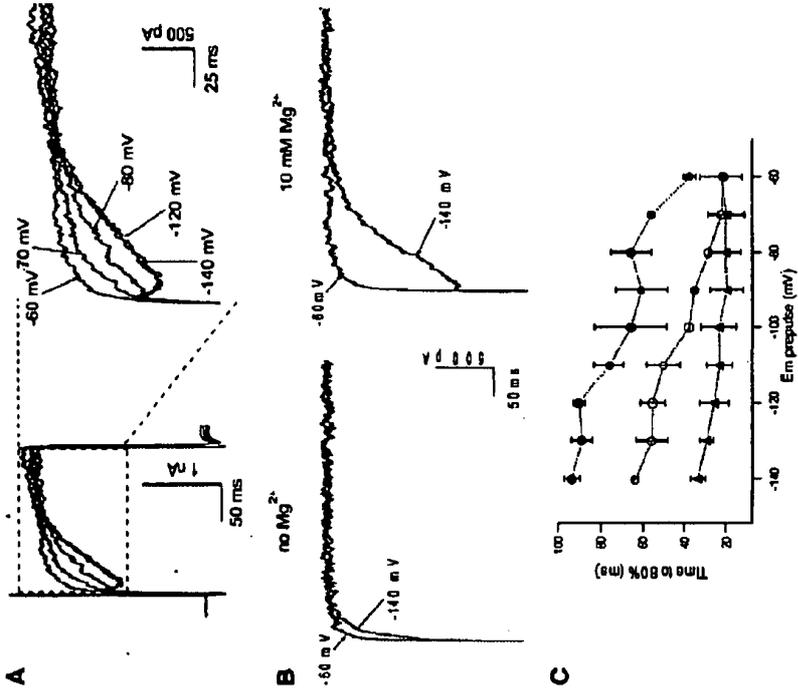


Fig. 3

Fig. 4

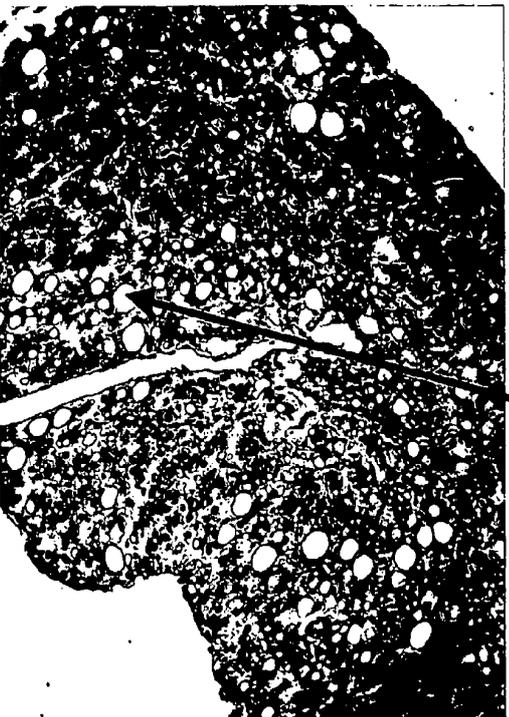
A Interface hepatitis



Inflammatory cells

Piecemeal necrosis

B Nutritive-toxic hepatitis

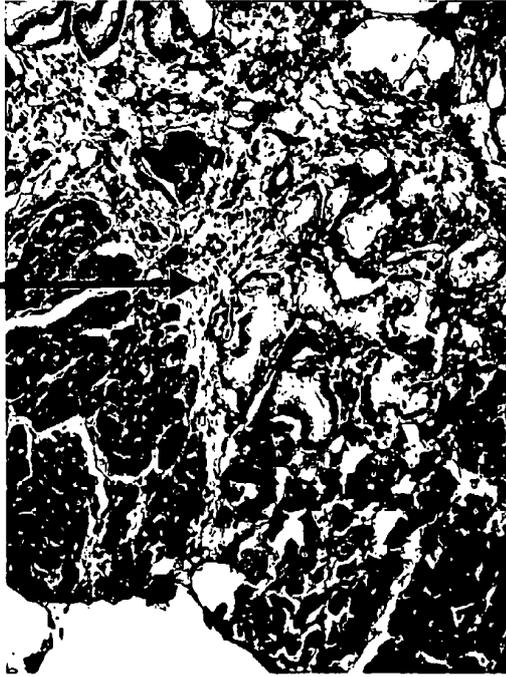


Fat droplets

Fig. 5

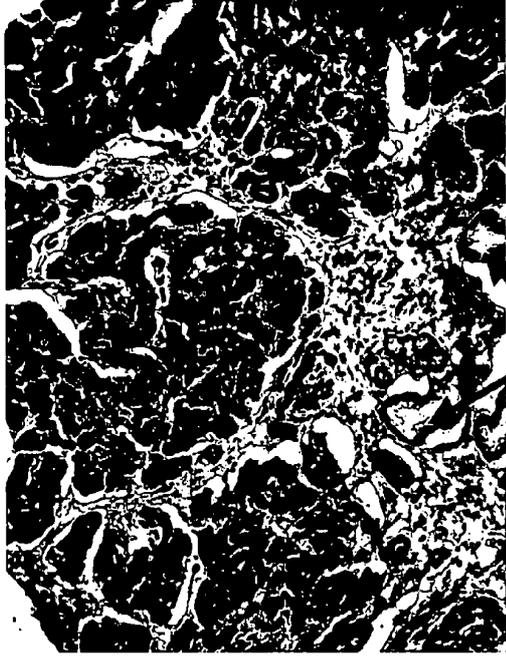
Connective Tissue

A



Pancreatitis

B



Mucinous metaplasia - PanIN1

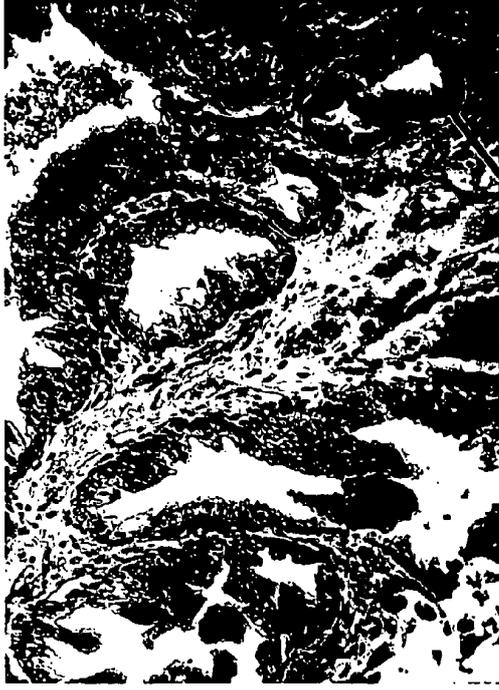
Fig. 6

A



Normal prostatic ducts

B



Benign prostatic hyperplasia

Fig. 7

