



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 342**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07106444 .8**
96 Fecha de presentación : **08.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1821102**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Procedimiento para la discriminación entre metaplasias y lesiones neoplásicas o preneoplásicas.**

30 Prioridad: **09.04.2002 EP 02007954**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.06.2011

73 Titular/es: **MTM LABORATORIES AG.**
Im Neuenheimer Feld 583
69120 Heidelberg, DE

72 Inventor/es: **Martin, Peter;**
Von Knebel Doeberitz, Magnus y
Ridder, Ruediger

74 Agente: **Riera Blanco, Juan Carlos**

ES 2 360 342 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

Procedimiento para la discriminación entre metaplasias y lesiones neoplásicas o preneoplásicas.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para discriminar metaplasias que sobreexpresan p16^{INK4a} de lesiones neoplásicas o preneoplásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} mediante la determinación del nivel de moléculas de L1 de alto riesgo producto génico codificadas en el HPV en muestras biológicas durante el curso de procedimientos de pruebas citológicas. Por tanto, el procedimiento permite reducir los resultados falsos positivos en la detección de lesiones anogenitales basada en p16^{INK4a} en procedimientos de pruebas citológicas.

10 Se ha demostrado que la detección de sobreexpresión de p16^{INK4a} en muestras biológicas es un marcador útil en la detección de lesiones anogenitales tales como carcinoma del cuello uterino (véase el documento WO00/01845; Klaes y col.; Int. J. Cáncer: 92, 276-284 (2001)). El procedimiento basado en la tinción inmunohistoquímica específica de p16^{INK4a} permite una identificación sensible y específica de células displásicas en secciones de tejido y en muestras citológicas. 15 En los análisis inmunohistoquímicos de tejidos, las células neoplásicas se pueden teñir usando un procedimiento de tinción mediada por anticuerpos específicos de p16^{INK4a}. Por tanto, el diagnóstico histológico de las lesiones neoplásicas puede verse respaldado por una tinción basada en un marcador molecular característico de la transformación de las células en lesiones anogenitales. El diagnóstico, sean o no las células neoplásicas, en estos procedimientos no sólo se basa en la tinción específica de p16^{INK4a}, sino también en la información histológica.

20 Esto se debe al hecho de que en aproximadamente el 30% de las muestras, las células metaplásicas muestran alguna inmunorreactividad con los anticuerpos específicos de p16^{INK4a} y, por tanto, se tiñen en el curso de los procedimientos. No obstante, el patrón de tinción obtenido de estas células metaplásicas difiere del patrón que dan las lesiones neoplásicas. Las células metaplásicas dan lugar a un patrón de tinción parcheado o focal, mientras que las lesiones 25 neoplásicas dan lugar a un patrón de tinción difuso. Además, las intensidades de tinción de las células metaplásicas son, predominantemente, inferiores a las de las células neoplásicas.

Los procedimientos habituales usados en las pruebas de detección selectiva para la detección precoz de neoplasias no emplean pruebas basadas en histología, sino que dependen de los procedimientos de análisis citológicos. No obstante, específicamente en casos, cuando no se dispone de información histológica sobre la arquitectura de los tejidos, 30 como por ejemplo en exploraciones citológicas, la determinación de sobreexpresión de p16^{INK4a} sola puede dar lugar a resultados falsos positivos. Esto se debe al hecho de que las células metaplásicas que expresan p16^{INK4a} a niveles elevados detectables pueden no diferenciarse por medio de patrones de tinción histológica.

35 El porcentaje de células que muestran sobreexpresión de p16^{INK4a} aumenta durante la aparición de displasias. Por tanto, en estadios neoplásicos o preneoplásicos, cuando en las muestras sólo está presente una población restringida de células neoplásicas o preneoplásicas, la inmunorreactividad de p16^{INK4a} puede ser débil. Esta débil inmunorreactividad puede ser de aproximadamente el nivel producido por las células metaplásicas. En estadios posteriores de displasias, la inmunorreactividad global de p16^{INK4a} es más fuerte y, por tanto, las lesiones neoplásicas se pueden discernir con 40 facilidad de las metaplasias, incluso en un formato de pruebas citológicas. Esto podría conducir a casos en los que la presencia de células metaplásicas que expresan p16^{INK4a} podrían confundirse con la presencia de células neoplásicas y, por tanto, produce un resultado falso positivo.

Especialmente en las pruebas de detección selectiva, cuando es deseable la detección de estadios precoces de neoplasias, esta condición es bastante desagradable. Esto es especialmente cierto, ya que se ha demostrado que el diagnóstico basado en p16^{INK4a} es una herramienta valiosa en exploraciones histológicas y la aplicación en procedimientos de detección selectiva basados en pruebas citológicas podría reforzar estos procedimientos establecidos. 45

Para reducir los resultados falsos positivos en los formatos de pruebas citológicas y, de este modo, aumentar la fiabilidad del diagnóstico basado en p16^{INK4a} de lesiones anogenitales sería deseable un procedimiento para discriminar 50 las metaplasias de las lesiones neoplásicas y displásicas. El problema en la técnica atañe especialmente a los estadios precoces de las neoplasias, cuando el porcentaje de células que muestran sobreexpresión de p16^{INK4a} todavía está a niveles que podrían confundirse con niveles de células metaplásicas normales en proliferación que sobreexpresan p16^{INK4a}. Por tanto, medios útiles para resolver el presente problema tienen que implicar parámetros que caractericen 55 estadios precoces de neoplasias del tracto anogenital. Ninguna característica de las displasias y/o neoplasias que aparecen durante la progresión de la tumorigénesis de modo que se demuestra que son herramientas diagnósticas para displasias de alto grado, y que están limitadas a estadios precoces de la tumorigénesis es adecuada para el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

60 En las formas de realización reivindicadas de acuerdo con la presente invención se proporciona un procedimiento para la discriminación de metaplasias de lesiones neoplásicas y preneoplásicas.

Para respaldar la discriminación de metaplasias de lesiones neoplásicas en procedimientos de pruebas basados en la sobreexpresión de p16^{INK4a} sería deseable una molécula marcadora que se exprese en células y tejidos neoplásicos 65 y/o preneoplásicos y que no se exprese en células metaplásicas.

La E2 del HPV se expresa especialmente en las lesiones de NIC de grado bajo y la expresión disminuye al crecer los grados de la NIC (Stevenson y col., J. Gen. Viral., 81, 1825-32 (2000)). En la mayoría de los carcinomas invasivos

no se puede detectar expresión de la proteína E2. Esto puede deberse al hecho de que partes del gen E2 se pierden durante la integración del ADN del HPV en el genoma del huésped. Por tanto, en infecciones por HPV persistentes con el ADN del HPV integrado no se puede detectar expresión de E2 o ésta es baja.

- 5 Debido a estos hechos, se ha probado que la proteína E2 es un marcador de estadios precoces de lesiones asociadas con infecciones por HPV de alto riesgo. En contraste con esto, p16^{INK4a} es un marcador que está sobreexpresado incluso en los estadios precoces de las lesiones anogenitales, cuyo nivel de expresión aumenta durante la progresión de lesiones displásicas. El hecho de que la E2 se exprese especialmente en los estadios precoces de las neoplasias la convierte en particularmente útil para los procedimientos de detección precoz. El alto nivel de expresión de la proteína E2 en los estadios precoces de la infección por HPV permite identificar las células infectadas antes de que haya un número abundante de copias del virus presente en las células analizadas.

- 15 Los productos génicos L1 y L2 también son útiles para el procedimiento de acuerdo con la presente divulgación debido a su alto nivel de expresión, principalmente en los estadios precoces de la infección viral antes de que se produzca la integración. La expresión de estos productos génicos también se reduce en la infección persistente por HPV.

- 20 Actualmente, los inventores han descubierto que las células que expresan productos génicos del HPV de alto riesgo, como la E2 del HPV, pueden servir para discriminar lesiones precoces neoplásicas o displásicas detectables por tinción inmunohistoquímica específica de p16^{INK4a} de metaplasias, que pueden también comprender células inmunorreactivas con p16^{INK4a}, durante los procedimientos de pruebas citológicas.

- 25 Las células que expresan otros productos génicos codificados en el HPV que son detectables a un nivel de expresión como ARNm o polipéptido en los estadios neoplásicos o estadios preneoplásicos también pueden servir para la discriminación de lesiones neoplásicas y/o preneoplásicas de metaplasias que sobreexpresan p16^{INK4a}. Ejemplos de dichos productos génicos codificados en el HPV incluyen las proteínas E6, E7, L1 o L2 de HPV o el ARNm.

- 30 La presente divulgación se refiere a un procedimiento para discriminar lesiones neoplásicas, preneoplásicas y/o displásicas de metaplasias que comprenden células que sobreexpresan p16^{INK4a} en muestras biológicas en un procedimiento de pruebas citológicas sobre la base de la detección de la presencia o ausencia de células que expresan productos génicos de HPV de alto riesgo en dichas muestras biológicas. Los productos génicos del HPV útiles para el procedimiento divulgado en la presente memoria son productos génicos que se expresan de forma abundante especialmente en estadios precoces de lesiones neoplásicas y preneoplásicas. En un ejemplo de la divulgación, la proteína E2 del HPV o su ARNm puede servir como marcador para discriminar metaplasias de lesiones neoplásicas o preneoplásicas precoces en las muestras. Además, también se ha demostrado que las proteínas E6, E7, L1 o L2 del HPV y/o sus ARNm son adecuados para realizar la discriminación de acuerdo con los procedimientos divulgados en la presente memoria.

- 40 La discriminación comprenderá una evaluación de si una muestra se ha de clasificar de un modo o de otro. En una forma de realización preferida de la invención, la discriminación atañe a la evaluación de un tejido o sus componentes como neoplásico o metaplásico. Por tanto, la discriminación como se usa en el presente documento es un juicio sobre las propiedades de crecimiento de las células en una muestra.

- 45 La discriminación de acuerdo con la presente invención se basa en la presencia o ausencia de células que expresan un producto génico del HPV de alto riesgo y en la presencia o ausencia de células que sobreexpresan p16^{INK4a} en dicha muestra. Las células que expresan los productos génicos del HPV de alto riesgo, tal como E2, no tienen que ser las mismas células que las que sobreexpresan p16^{INK4a}, aunque la expresión de ambas moléculas marcadoras se puede producir en las mismas células.

- 50 Por tanto, la presencia de células que expresan productos génicos E2 en una muestra simultáneamente con la presencia de células que sobreexpresan p16^{INK4a} (otras células o las mismas células que coexpresan ambos marcadores) sirve para discriminar lesiones neoplásicas o preneoplásicas de metaplasias.

- 55 Los productos génicos codificados en el HPV como se usan en el contexto de la presente invención serán cualquier ARNm transcrito a partir de un gen del genoma del HPV o cualquier polipéptido traducido a partir de tal ARNm. Los productos génicos del HPV adecuados para el procedimiento de acuerdo con la presente invención son productos génicos codificados por el gen L1.

- 60 En el presente documento, HPV significa papilomavirus humano. El HPV, como se usa en el presente documento, comprenderá cualquier subtipo de alto riesgo del HPV. En una forma de realización preferida de la presente invención, el subtipo de HPV es un subtipo de HPV asociado con cáncer, tal como, por ejemplo, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58. En una forma de realización especialmente preferida, los subtipos de HPV de alto riesgo son HPV 16, 18, 39 o HPV 45. La determinación del subtipo del HPV comprenderá cualquier procedimiento adecuado para la determinación del subtipo de HPV concreto presente en una muestra biológica.

- 65 El procedimiento para la detección del nivel de los productos génicos codificados en el HPV es cualquier procedimiento que sea adecuado para detectar cantidades muy pequeñas de moléculas biológicas específicas en muestras biológicas. La reacción de detección de acuerdo con la presente invención es una detección bien a nivel de los ácidos nucleicos o a nivel de los polipéptidos.

Los productos génicos del HPV pueden detectarse usando reactivos que reconocen de forma específica estas moléculas. La reacción de detección de los productos génicos del HPV puede comprender una o más reacciones con agentes de detección, bien reconociendo las moléculas marcadoras iniciales o bien reconociendo las moléculas anteriores usadas para reconocer otras moléculas.

La reacción de detección puede además comprender una reacción indicadora que indica la presencia o ausencia y/o el nivel de los productos génicos del HPV. La reacción indicadora puede ser, por ejemplo, una reacción que produzca un compuesto coloreado, una reacción de bioluminiscencia, una reacción de fluorescencia, generalmente una reacción que emite radiación etc.

Diferentes moléculas marcadoras pueden ser reconocidas por agentes que producen diferentes señales indicadoras de modo que se puedan distinguir las señales que hacen referencia a las moléculas marcadoras. En una forma de realización preferida de la invención, la detección de la expresión de L1 de HPV de alto riesgo se lleva a cabo de forma simultánea con la detección de la sobreexpresión de p16^{INK4a}. En este caso, la reacción indicadora puede emplear, por ejemplo, diferentes marcadores fluorescentes para las diferentes moléculas detectadas.

Los formatos aplicables para la reacción de detección pueden ser técnicas de transferencia, tales como transferencia de tipo Western, transferencia de tipo Southern, transferencia de tipo Northern. Las técnicas de transferencia son conocidas para los expertos en la técnica y pueden realizarse como, por ejemplo, electrotransferencias, transferencias semisecas, transferencias al vacío o transferencias de tipo puntual. La reacción de amplificación también puede ser aplicable para la detección de, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico.

En un ejemplo preferido, la detección del nivel de productos génicos del HPV se lleva a cabo mediante detección del correspondiente ARNm o fragmentos suyos presentes en la muestra. Los expertos en la técnica conocen los medios para la detección de moléculas de ácido nucleico. El procedimiento para la detección de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, una reacción de unión de la molécula que se va a detectar a sondas de ácido nucleico complementario, proteínas con especificidad de unión por los ácidos nucleicos o cualquier otra entidad que reconozca y se una específicamente a dichos ácidos nucleicos.

Este procedimiento se puede realizar tanto *in vitro* como directamente *in situ*, por ejemplo, durante el curso de una reacción de tinción de detección. Otro modo de detectar los ARNm del HPV en una muestra que se realiza en el procedimiento es una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que se puede llevar a cabo de un modo cuantitativo tal como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, RT-PCR, que se puede usar para cuantificar el nivel de ARNm del HPV en muestras de tumores.

En otro ejemplo, la detección del nivel de productos génicos del HPV se lleva a cabo mediante determinación del nivel de expresión de una proteína. La determinación del producto génico del HPV a nivel de proteína puede llevarse a cabo en, por ejemplo, una reacción que comprende un agente de unión específico para la detección del polipéptido del HPV concreto.

Los agentes de unión se pueden usar en muchas técnicas de detección diferentes, por ejemplo en transferencia de tipo Western, ELISA o inmunoprecipitación. En general, la detección basada en agentes de unión polipeptídicos se puede realizar tanto *in vitro* como directamente *in situ*, por ejemplo, durante el curso de una reacción de tinción de inmunohistoquímica. Cualquier otro procedimiento para determinar la cantidad de polipéptidos concretos en muestras biológicas se puede usar de acuerdo con la presente invención.

Agentes de unión tal como se usan para la detección del nivel de polipéptidos del HPV o de polipéptidos p16^{INK4a} pueden comprender anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos híbridos bifuncionales, peptidomiméticos que contienen epítomos de unión a antígeno mínimos etc.

Se dice que un anticuerpo o agente de unión a antígeno reacciona específicamente si reacciona a un nivel detectable con una proteína divulgada en el presente documento y no reacciona de forma significativa con otras proteínas. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Como se usa en el presente documento, con el término anticuerpo o anticuerpo monoclonal se pretende incluir moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos. Además, los anticuerpos incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados.

Los agentes de unión se pueden usar aislados o en combinación. Por medio de combinación es posible alcanzar un mayor grado de sensibilidad. El término anticuerpo se refiere, preferentemente, a anticuerpos que consisten en, esencialmente, anticuerpos monoclonales combinados con diferentes especificidades epitópicas, así como distintas preparaciones de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales se fabrican a partir fragmentos del polipéptido de la invención que contienen antígeno usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas para los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En una de estas técnicas, un inmunógeno que comprende el polipéptido antigénico o una parte sintética del mismo se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (p. ej., ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras).

En esta etapa, los polipéptidos de la presente invención pueden servir como inmunógeno sin modificar. Como alternativa, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, se puede provocar una respuesta inmunitaria superior si el polipéptido está unido a una proteína transportadora, tal como seroalbúmina bovina o hemocianina de lapa californiana. Los inmunógenos se inyectan dentro del huésped animal, preferiblemente de acuerdo con un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. A continuación, los anticuerpos policlonales específicos del polipéptido pueden purificarse a partir de dichos antisueros mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los procedimientos usados para la detección de la presencia o ausencia de sobreexpresión de p16^{INK4a} son los mismos procedimientos que se han mencionado anteriormente para la detección de productos génicos de HPV.

Los productos génicos de HPV pueden detectarse de forma simultánea con la presencia o ausencia de la sobreexpresión de p16^{INK4a}. En este contexto, de forma simultánea significará literalmente en el mismo instante o dentro del mismo procedimiento de prueba, a través del cual las etapas sencillas de detección son temporalmente consecutivas.

Una muestra puede comprender cualquier muestra que comprenda células de origen anogenital. Las muestras pueden comprender, por ejemplo, secreciones, frotis, fluidos corporales y muestras de células.

En una forma de realización de la presente invención, las muestras comprenden células del cuello uterino. En una forma de realización preferida de la presente invención, la muestra de células del cuello uterino se puede preparar de acuerdo con un frotis de Papanicolau clásico, la muestra se puede preparar como una monocapa o una preparación de capa fina de la muestra citológica.

La preparación de una muestra puede comprender, por ejemplo, obtener una muestra de un tejido, de un fluido corporal, de células de un paciente. La preparación de la muestra puede también comprender varias etapas de otras preparaciones de la muestra, tal como preparación de disecciones, extender o aplicar las células que se van a analizar sobre portaobjetos para microscopio, preparación de matrices tisulares, aislamiento de polipéptidos o ácidos nucleicos, preparación de péptidos o ácidos nucleicos fijados sobre una fase sólida o preparación de esferas, membranas o portaobjetos a los que las moléculas que se van a determinar se acoplan de forma covalente o no covalente.

Las lesiones neoplásicas a las que se puede aplicar el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprenden cualquier lesión anogenital, que se caracteriza por la sobreexpresión de p16^{INK4a}, que además muestra expresión de productos génicos del HPV. En una forma de realización preferida de la presente invención, la lesión anogenital es una lesión del cuello uterino.

La presente invención proporciona un procedimiento para la discriminación de lesiones anogenitales neoplásicas y preneoplásicas identificables mediante la evaluación de la sobreexpresión de p16^{INK4a} de células metaplásicas, que expresan de forma detectable p16^{INK4a} durante el curso de procedimientos de pruebas citológicas. El procedimiento se basa en la detección de productos génicos expresados de HPV de alto riesgo. Se descubrió que los productos génicos del HPV expresados a niveles elevados en los estadios precoces de las neoplasias y en pre-neoplasias son adecuados para esta discriminación. Esto se debe al hecho de que el porcentaje de células en una muestra biológica en estadios precoces de neoplasias que sobreexpresan p16^{INK4a} da un nivel de moléculas de p16^{INK4a}, de que sigue existiendo la posibilidad de que el nivel vuelva al nivel de células metaplásicas en lugar de neoplásicas. Por tanto, el problema que se tenía que resolver era proporcionar un procedimiento para discriminar entre células neoplásicas y metaplásicas, especialmente en estadios precoces de neoplasias, cuando los procedimientos diagnósticos citológicos basados en la sobreexpresión de p16^{INK4a} necesitan información adicional para la identificación de células metaplásicas.

Descripción breve de las figuras

Figura 1 *Células metaplásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de p16^{INK4a}*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra p16^{INK4a}.

Figura 2 *Células metaplásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de E2 de HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células no muestran inmunorreactividad con los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína E2 del HPV.

Figura 3 *Células metaplásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de L1 de HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células no muestran inmunorreactividad con los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína L1 del HPV.

Figura 4 *Células displásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de p16^{INK4a}*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra p16^{INK4a}.

Figura 5 *Células displásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de E2 de HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células muestran inmunorreactividad clara con los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína E2 del HPV.

Figura 6 *Células displásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de L1 de HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 1; las células muestran inmunorreactividad clara con los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína L1 del HPV.

Figura 7 *Células metaplásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de p16^{INK4a}*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 3; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra p16^{INK4a}.

Figura 8 *Células metaplásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de E7 de HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 3; las células no muestran inmunorreactividad con los anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína E7 del HPV.

Figura 9 *Células displásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de p16^{INK4a}*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 3; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra p16^{INK4a}.

Figura 10 *Células displásicas teñidas inmuoquímicamente con un anticuerpo específico de E7 del HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 3; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra E7 del HPV.

Figura 11 *Células displásicas sometidas a tinción inmuoquímica doble con anticuerpos específicos de E7 del HPV*; para conocer los detalles experimentales véase el ejemplo 3; las células reaccionan claramente con los anticuerpos contra E7 del HPV y contra p16^{INK4a}.

Los ejemplos siguientes se proporcionan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Detección inmuoquímica de la expresión de E2, L1 y p16^{INK4a} de HPV en muestras del cuello uterino

Frotis del cuello uterino se tiñeron inmunocitoquímicamente usando anticuerpos específicos para p16^{INK4a} y anticuerpos policlonales específicos de la proteína E2 del HPV.

Para rehidratar, los frotis fijados con aerosol se incuban en EtOH al 50% recién preparado en un dispositivo con agitación. La película de PEG producida por el procedimiento de fijación se elimina mediante aclarado abundante. Después, los frotis se lavan en agua bidestilada. La recuperación del antígeno se lleva a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0). Por tanto, los portaobjetos se calientan en un baño de agua durante 40 minutos a 95°C, se enfrían hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos, se transfieren a tampón de lavado (PBS/0,1% de Tween20) y, por último, se rodean con un lápiz graso.

Para la inactivación de la peroxidasa endógena, las muestras se incuban con H₂O₂ al 3% durante 20 minutos a temperatura ambiente y, después, se lavan con PBS/0,1% de Tween20 durante 5 minutos. El bloqueo de las proteínas se lleva a cabo con suero de caballo (Vectastain®-Kit) (Diluir a 1:50 con PBS/0,1% de Tween20). Los frotis se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente y después se lavan cuidadosamente. Después, el bloqueo de la unión inespecífica de avidina-reactivo se realiza del siguiente modo: Las muestras se incuban con solución de bloqueo con avidina (lista para usar/Vector) durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se lavan cuidadosamente con pipeta. Para el bloqueo de la unión inespecífica de biotina-reactivo, los frotis se incuban con solución de bloqueo con biotina (lista para usar/Vector) durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se lavan cuidadosamente.

Después se procede a la incubación con un anticuerpo primario específico de p16^{INK4a} o con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína E2 del HPV o anticuerpos policlonales producidos contra la proteína L1 de HPV de alto riesgo (HPV16); las muestras se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan en PBS/0,1% de Tween20 durante 5 minutos (dos veces) y después se incuban con anticuerpo secundario biotinilado (IgG de caballo anti-ratón) (Vectastain®-Kit/Diluir a 1:200 en PBS/0,1% de Tween20 + Suero de caballo) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavan en PBS/0,1% de Tween20 durante 5 minutos (dos veces). Después se realiza una incubación con complejo AB (Avidina-Biotina-HRP) (Vectastain®-Kit/Diluir a 1:50 en PBS/0,1% de Tween20) durante 30 min a temperatura ambiente, seguida por etapas de lavado en PBS/0,1% de Tween20 durante 5 minutos (dos veces).

La detección de la señal se lleva a cabo con complejo-sustrato-cromógeno (H₂O₂/AEC) del siguiente modo: En primer lugar, las muestras se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con el complejo sustrato-cromógeno, después se detiene la reacción en agua destilada. Por último se realiza una contratinción con Mayers Hematoxilina y los portaobjetos se montan con Glicerina-gelatina.

El análisis microscópico de los portaobjetos revela que células inmunorreactivas con p16^{INK4a} junto con células inmunorreactivas con proteína E2 de HPV sólo se pueden encontrar en muestras que se puedan identificar microscópicamente como muestras de lesiones neoplásicas. Las células que se tiñen mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originan en metaplasias, no se tiñen mediante la reacción específica de la proteína E2 de HPV. La inspección microscópica de los portaobjetos teñidos con L1 HPV muestra que las células metaplásicas no son inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra la proteína L1 de HPV. En contraste con esto, las muestras que contienen

ES 2 360 342 T3

células displásicas comprenden células que son inmunorreactivas con la proteína L1 de HPV y las inmunorreactivas con p16^{INK4a}. Por tanto, en contraste con las displasias, en las metaplasias no se pueden teñir las células usando el anticuerpo específico de L1 de HPV.

- 5 Los resultados muestran que la tinción con reactivos específicos de L1 o E2 de HPV permite discriminar metaplasias que sobreexpresan p16^{INK4a} de displasias.

Ejemplo 2

- 10 *Detección de células que expresan E2 de HPV, L1 de HPV o p16^{INK4a} en muestras del cuello uterino mediante hibridación *in situ**

- 15 Los frotis del cuello uterino se pueden analizar semicuantitativamente para determinar el nivel de ARNm de p16^{INK4a} y E2 y L1 de HPV en una reacción de tinción *in situ*. La reacción de tinción se realiza del siguiente modo:

- 20 Para rehidratar, los frotis fijados con aerosol se incuban en EtOH al 50% recién preparado en un dispositivo con agitación. La película de PEG producida por el procedimiento de fijación se elimina mediante aclarado abundante. Después, los frotis se lavan en agua bidestilada. Los frotis se incuban con proteinasa K (10 µg/ml en PBS) durante 10 minutos a 37°C. Después, los portaobjetos se transfieren a tampón de lavado (PBS/0,1% de Tween20) y, por último, se rodean con un lápiz graso.

- 25 La mezcla de hibridación se prepara mezclando 50 µl de tampón de hibridación listo para usar (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) con aproximadamente 5-10 pmol de las sondas. Las sondas son oligonucleótidos marcados con fluoresceína de secuencias complementarias de los ARNm correspondientes. La mezcla de hibridación se calienta a 95°C y, después, se equilibra a 37°C. Después del procedimiento de ebullición, los frotis se incuban con 50 µl de la mezcla de hibridación durante 4 horas a 42°C. Las muestras se lavan con volúmenes en exceso de los tampones de lavado dos veces en 2 x SSC a 37°C durante 15 minutos y una vez en 1 x SSC a 37°C durante 15 minutos.
30 Después, los frotis se lavan dos veces a temperatura ambiente en 2 x SSC. Después de este procedimiento de lavado, las disecciones se incuban durante 30 minutos con tampón de bloqueo (NEN, Blockingpuffer) a temperatura ambiente. A continuación, 1 hora de incubación con una fosfatasa alcalina anti-fluoresceína (DAKO A/S) a una dilución de 1:100 (en tampón de bloqueo, véase anteriormente). Después, los frotis se lavan 2 veces en 1 x PBS/0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido por una etapa de lavado con 1 x PBS, MgCl₂ 50 mM (pH 9,2)
35 durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realiza la reacción de tinción con NBT/BCIP (Sigma) durante de 30 minutos a 2 horas a temperatura ambiente. La reacción de tinción se detiene mediante una circulación corta con EDTA 1mM en PBS. Por último, los frotis se sumergen en H₂O_{dest.} y se incluyen en AquaTex (Merck). Después, las disecciones teñidas se pueden analizar microscópicamente.

- 40 El análisis microscópico revela que las metaplasias comprenden células que expresan p16^{INK4a} pero no contienen células que expresan ARNm de E2 o L1 de HPV. En las lesiones displásicas del cuello uterino se pueden encontrar células que expresan p16^{INK4a} y también células que expresan ARNm de L1 de HPV y de E2 de HPV.

- 45 Este resultado indica que el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede usar para la discriminación de metaplasias y lesiones neoplásicas.

Ejemplo 3

- 50 *Detección inmunocitoquímica de la expresión de E7 de HPV y p16^{INK4a} en muestras del cuello uterino*

Capas finas ThinPrep® de frotis del cuello uterino se tiñen mediante inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos de p16^{INK4a} y anticuerpos monoclonales específicos de la proteína E7 de HPV.

- 55 Para rehidratar, los frotis fijados con aerosol se incuban en EtOH al 50% recién preparado en un dispositivo con agitación. La película de PEG producida por el procedimiento de fijación se elimina mediante aclarado abundante. Después, los frotis se lavan en agua bidestilada. La recuperación del antígeno se lleva a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0).

- 60 Por tanto, los portaobjetos se calientan en un baño de agua durante 40 minutos a 95-98°C se enfrían hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos, se transfieren a tampón de lavado (Dakocytomation, S3006) y, por último, se rodean con un lápiz graso.

- 65 Para la inactivación de la peroxidasa endógena, las muestras se incuban con H₂O₂ al 3% (Dakocytomation; S2023) durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se lavan en tampón de lavado (Dakocytomation, S3006) durante 5 minutos. Después se procede a la incubación con un anticuerpo primario específico de p16^{INK4a} o anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína E7 de alto riesgo (HPV16); las muestras se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavan en tampón de lavado durante 5 minutos y después se incuban con el sistema EnVision

ES 2 360 342 T3

(Dakocytomation, K4001), que consiste en anticuerpos de cabra anti-ratón conjugados con un polímero de dextrano y enzimas peroxidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavan en tampón de lavado durante 5 minutos (tres veces).

5 La detección de la señal se lleva a cabo con complejo-sustrato-cromógeno (DAB+, Dakocytomation, K3468) mediante incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene en agua destilada. Por último se realiza una contratinción con Mayers Hematoxilina y los portaobjetos se montan con Faramount (DakoCytomation, S3025).

10 El análisis microscópico de los portaobjetos revela que células inmunorreactivas con p16^{INK4a} junto con células inmunorreactivas con proteína E7 de HPV sólo se pueden encontrar en muestras que se puedan identificar microscópicamente como muestras de lesiones neoplásicas. Las células que se tiñen mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originan en metaplasias, no se tiñen mediante la reacción específica de la proteína E7 de HPV.

15 Para validar los resultados que se proporcionan en el presente documento se realizó una tinción doble de las muestras citológicas usando un anticuerpo frente a E7 de HPV marcado con FITC (el anticuerpo como se ha proporcionado anteriormente) en combinación con el anticuerpo de p16^{INK4a} como se ha usado anteriormente. La tinción se realizó como se ha indicado anteriormente adaptado a un procedimiento de tinción doble. Los expertos en la técnica conocen las variaciones necesarias.

20 En las muestras sometidas a tinción doble no se encuentran células metaplásicas teñidas con tinción doble; por el contrario, las células displásicas muestran tinción doble para p16^{INK4a} y para la proteína E7 del HPV.

25 Los resultados muestran que la tinción con reactivos específicos de E7 de HPV permite discriminar metaplasias que sobreexpresan p16^{INK4a} de displasias.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para discriminar metaplasias que sobreexpresan p16^{INK4a} lesiones neoplásicas o preneoplásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} en muestras biológicas durante el curso de procedimientos de pruebas citológicas, que comprende
- determinar la presencia o ausencia de células que sobreexpresan p16^{INK4a} en dichas muestras biológicas;
 - determinar la presencia o ausencia de células que expresan un producto génico de L1 de HPV de alto riesgo en dichas muestras biológicas;
 - evaluar la presencia simultánea de células que expresan productos génicos de L1 de HPV de alto riesgo con células que sobreexpresan p16^{INK4a}, o la presencia de células que sobreexpresan p16^{INK4a} solo;
 - en el que la presencia simultánea de células que expresan productos génicos L1 de HPV de alto riesgo con células que sobreexpresan p16^{INK4a} es indicativa de lesiones neoplásicas o preneoplásicas.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el producto génico L1 de HPV es un polipéptido o una molécula de ARN.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las lesiones neoplásicas o preneoplásicas son lesiones del tracto anogenital.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que las lesiones del tracto anogenital son lesiones del cuello uterino.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las muestras biológicas son muestras que contienen células de origen anogenital.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células son células que se originan a partir del cuello uterino.
7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la muestra biológica es un frotis de Papanicolau o una preparación citológica del cuello uterino.
8. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la detección de los productos génicos de L1 de HPV y de las moléculas de p16^{INK4a} se realiza usando al menos una sonda específica para las moléculas que se van a detectar.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la sonda está marcada de forma que se puede detectar.
10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el marcador se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico o una enzima.
11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la sonda es una proteína y/o un ácido nucleico.
12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que al menos una sonda es un anticuerpo dirigido contra un producto génico codificado de L1 de HPV de alto riesgo o p16^{INK4a}.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende un procedimiento de tinción inmunocitoquímica.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que al menos una sonda es un ácido nucleico que hibrida específicamente con un producto génico de L1 de HPV de alto riesgo.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende una reacción de hibridación *in situ*.
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende una reacción de amplificación del ácido nucleico.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la reacción de amplificación del ácido nucleico es PCR o LCR.

ES 2 360 342 T3

18. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las reacciones de detección que usan ácidos nucleicos como sondas o polipéptidos como sondas se llevan a cabo simultáneamente.

5 19. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los productos génicos de HPV de alto riesgo son productos génicos de los subtipos de HPV asociados con cáncer, HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 y 58.

10 20. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se determina la sobreexpresión de p16^{INK4a} simultánea a la expresión de al menos un producto génico de L1 de HPV de alto riesgo en al menos una única célula.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1



Figura 2

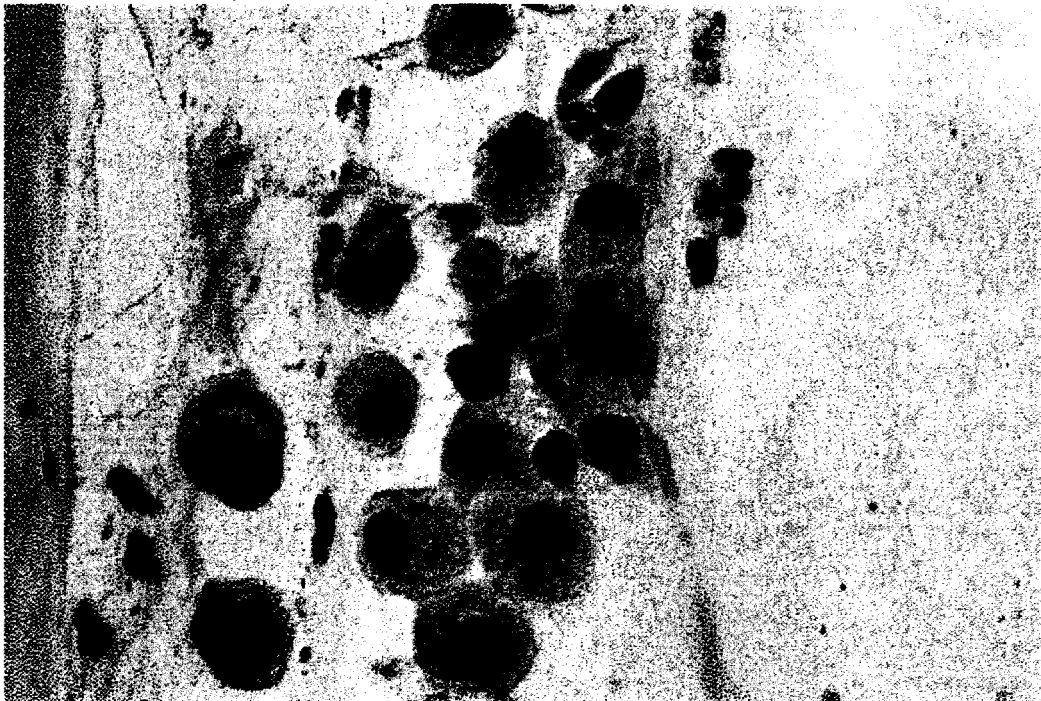


Figura 3

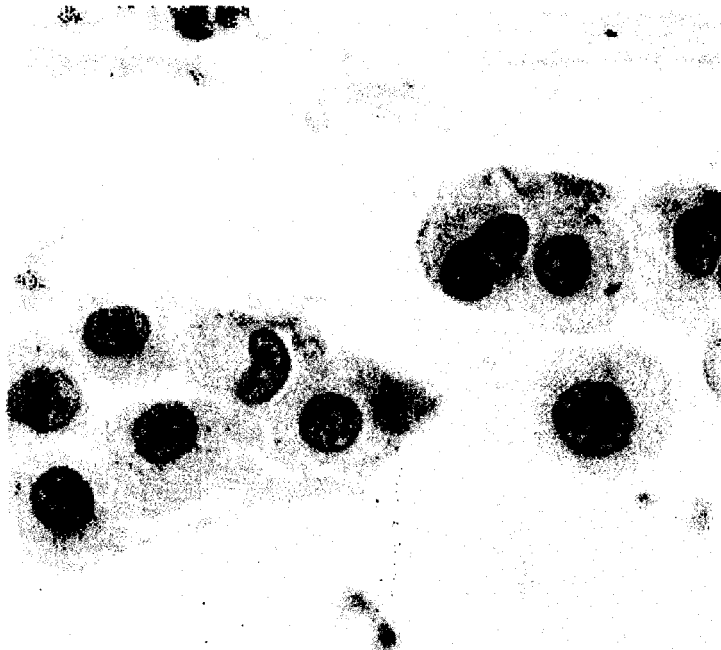


Figura 4

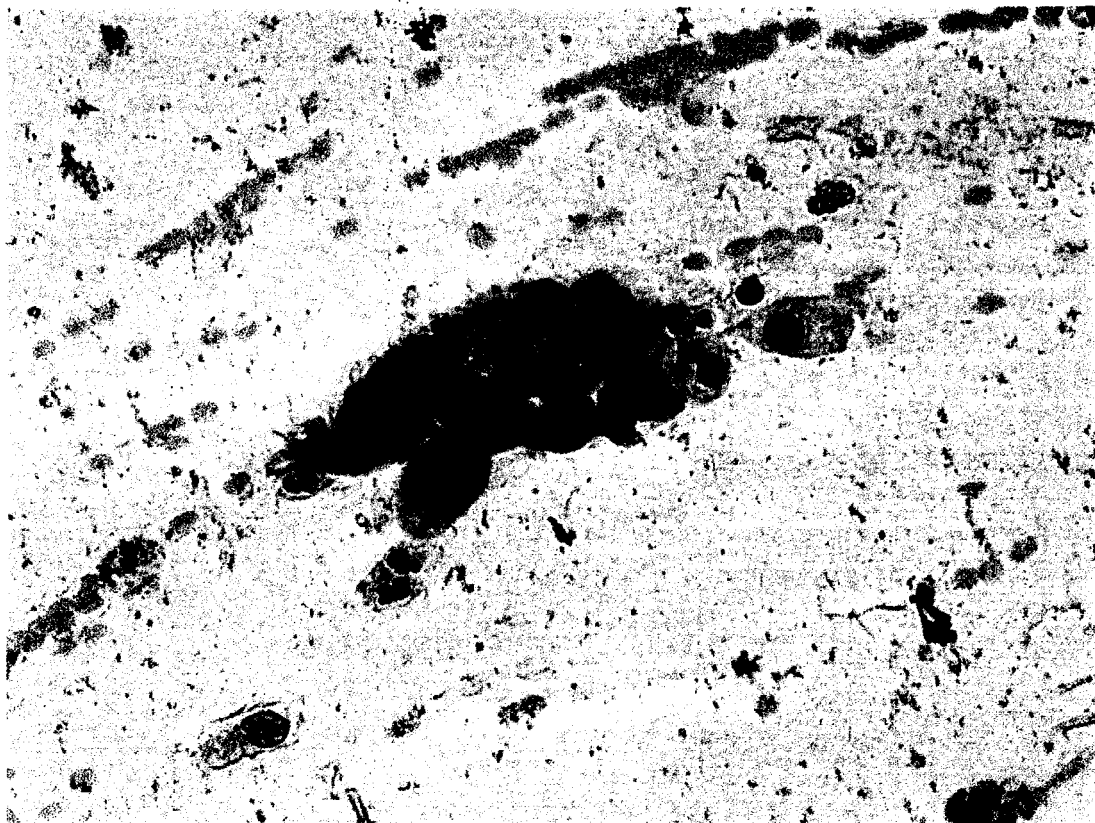


Figura 5

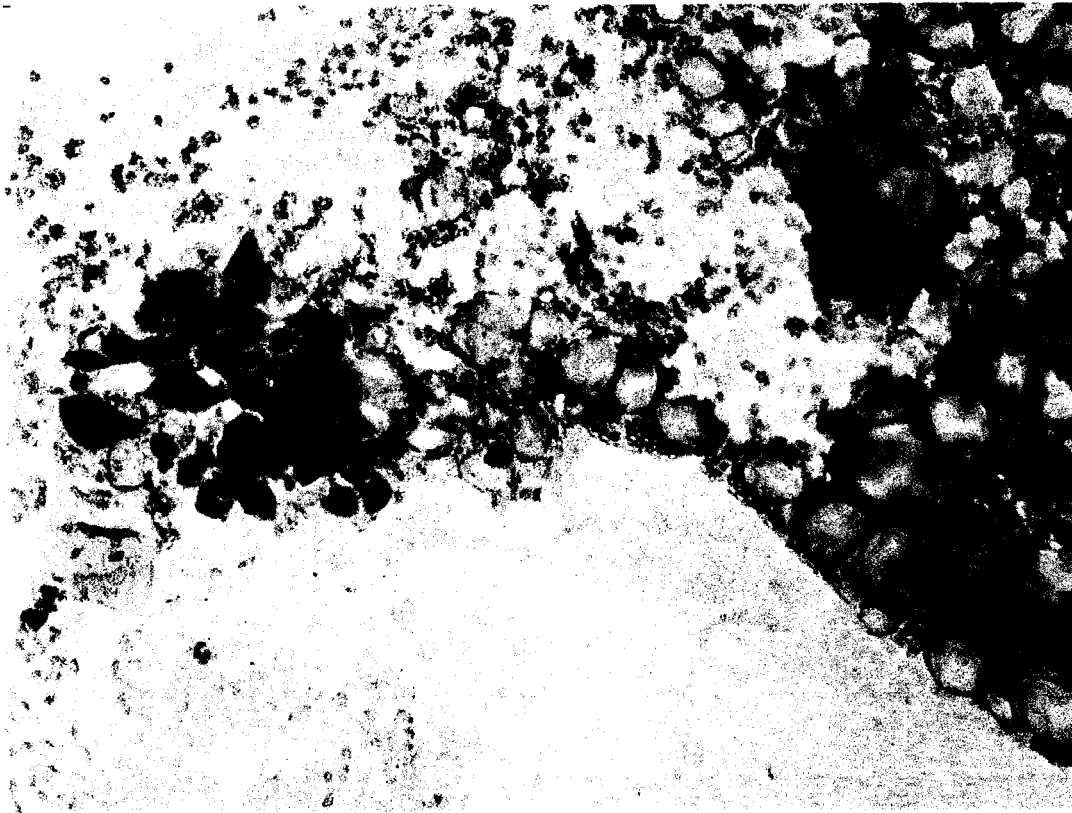


Figura 6

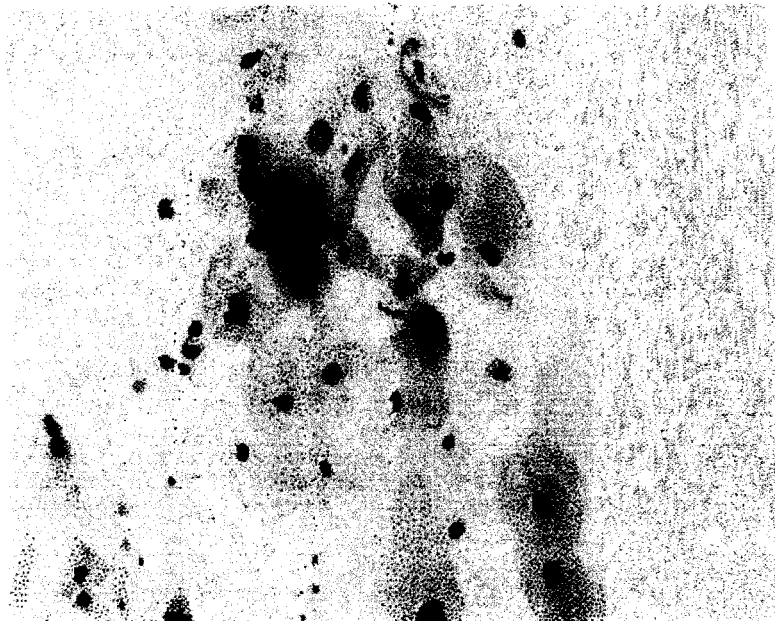


Figura 7



Figura 8

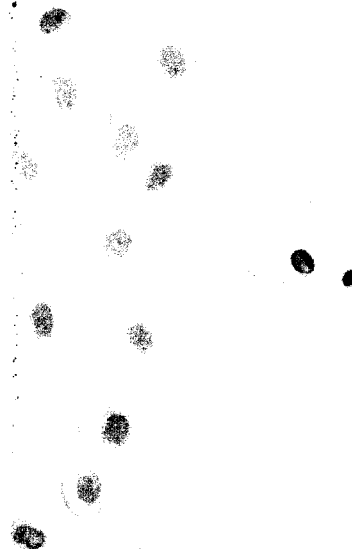


Figura 9



Figura 10

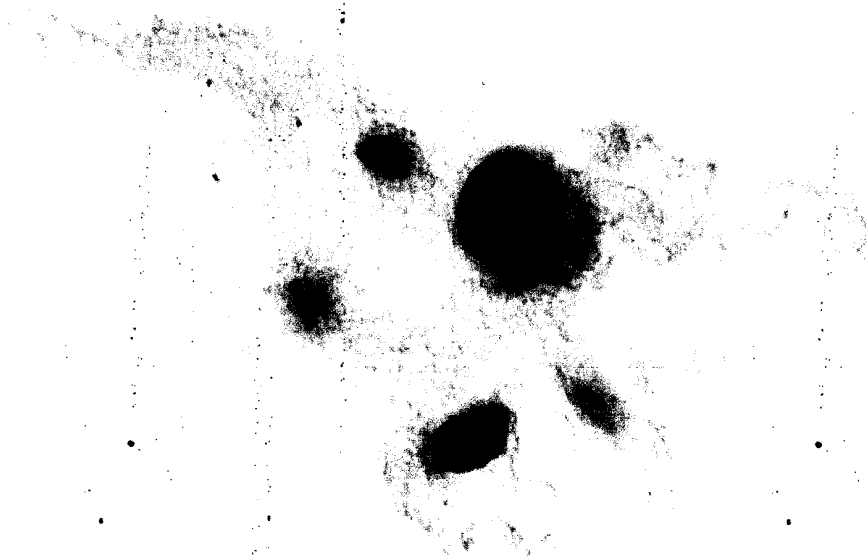


Figura 11

