

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 796**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04754686 .6**
96 Fecha de presentación: **08.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1631686**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Detección de displasia de alto grado en células del cuello uterino**

30 Prioridad:
09.06.2003 US 457639
02.06.2004 US 857859

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.07.2012

73 Titular/es:
VYSIS, INC.
3100 WOODCREEK DRIVE
DOWNERS GROVE, ILLINOIS 60515, US

72 Inventor/es:
KING, Walter;
MORRISON, Larry E.;
SEELIG, Steven A.;
SOKOLOVA, Irina A. y
ALGECIRAS-SCHIMNICH, Alicia

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 384 796 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección de displasia de alto grado en células del cuello uterino

5 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de cuello uterino sigue siendo uno de los tipos de cáncer más comunes que afectan a mujeres en todo el mundo. La ruta biológica para el carcinoma de cuello uterino empieza con células intraepiteliales normales y se desarrolla mediante displasia de bajo y luego de alto grado antes de que se obtenga el tumor maligno. Los citólogos caracterizan el paso a tumor maligno como la progresión de células epiteliales normales a células escamosas atípicas de significancia indeterminada (ASCUS) a lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEB) y luego lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIEA) antes del carcinoma *in situ* y finalmente resultado de tumor maligno. Los histólogos caracterizan la progresión de células normales a diversos grados de neoplasia intraepitelial de cuello uterino (NICU I, II y III), luego a carcinoma *in situ* y finalmente tumor maligno. NICU I se considera displasia de bajo grado comparable a LIEB. NICU II y III se consideran displasia de alto grado comparables a LIEA.

El presente tratamiento de referencia incluye regular pruebas citológicas con un frotis de Papanicolaou (Pap) para identificar anomalías que indiquen displasia o carcinoma en células de la paciente. Si se detecta displasia de alto grado y se confirma por examen histológico, la zona de transformación del cuello uterino de la paciente se extirpa inmediatamente por escisión con asa o biopsia de cono. Se requieren procedimientos más radicales cuando se detecta el carcinoma. Al mismo tiempo, sin embargo, la progresión de tumor normal a maligno no es estricta y la presencia de displasia de bajo grado no indica necesariamente que la paciente progresará a displasia de alto grado o tumor maligno. Significativamente, el valor predictivo negativo de los procedimientos citológicos (por ejemplo, frotis de Pap) para detectar displasia de alto grado es escaso. Por tanto, la displasia de bajo grado puede diagnosticarse erróneamente como de alto grado, sometiendo así a la paciente a tratamiento injustificado y la displasia de alto grado puede diagnosticarse erróneamente como displasia de bajo grado, retrasando así el tratamiento apropiado. Por consiguiente, existe la necesidad de un procedimiento de diagnóstico que distinga con exactitud entre displasia de bajo y de alto grado.

Los especímenes de pacientes normalmente comprenden muchos miles de células para la evaluación. El diagnóstico basado en la evaluación de células individuales puede requerir mucho tiempo y ser tedioso para los técnicos que lo realizan debido al gran número de células que se requieren para la evaluación. Por tanto, existe la necesidad de un medio para simplificar un procedimiento de evaluación de células.

Otros han observado que las anomalías genéticas (por ejemplo, cambios en las regiones del cromosoma o cambios en niveles de ploidéz) acompañan la progresión de células normales a tumor maligno del cuello uterino. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.919.624 a Ried y col. Ried y col. observaron que las anomalías cromosómicas pueden usarse para clasificar la progresión de células del cuello uterino displásicas en estadios tardíos, por ejemplo, de carcinoma de cuello uterino no invasivo a invasivo. Todavía otros han demostrado que el cáncer de cuello uterino está asociado a infección por ciertos tipos de virus del papiloma humano (VPH), particularmente los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35 y 42. Véase, por ejemplo, Lazo, Brit. J. Cancer, (1999) 80(12), 2008-2018. Adicionalmente, muchas proteínas del ciclo celular tales como p16 y ciclina E y marcadores de proliferación celular tales como las proteínas Ki67 y PCNA también son conocidos por ser altamente activos en células neoplásicas. Por tanto, las células que contienen cantidades anormales de estos marcadores se han sugerido como buenos candidatos para células que pueden progresar a tumor maligno.

Zhang y col., Int. J. Cancer, 101, 427-433 (2002), desvelan que la frecuente amplificación de bajo nivel de los oncogenes PIK3CA, TERT, C-MYC, CCND1, ERBB2 y el locus 20q13.2 se detectó en cánceres de cuello uterino primarios asociados a VPH, y una combinación de estas alteraciones frecuentemente produjo tumores avanzados. Woenckhaus y col., J. Pathology, 198, 335-342 (2002), desvelan que la ganancia oncogénica de PIK3CA y el aumento de la expresión de la subunidad catalítica p110 α de fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) están asociados a progresión de displasia en carcinoma de células escamosas.

La solicitud PCT WO 0024760 describe procedimientos y reactivos para detectar ADN del VPH en frotis de Pap usando hibridación *in situ* y microscopia de campo brillante. La sonda consiste en sondas de ADN de longitud completa del VPH-16, -18, -31, -33, -35 y -51. La patente reivindica que esta mezcla de sondas detecta otros tipos de VPH de alto riesgo, pero no VPH de bajo riesgo. La capacidad de la mezcla de sondas para el VPH desvelada para prevenir la hibridación con tipos de VPH de bajo riesgo se logra por la modulación de las cantidades de cada ADN del VPH incluidas en la mezcla de sondas. Las sondas para el VPH desveladas son diferentes de las descritas en este documento. Además, los ensayos de la invención modulan la hibridación cruzada de sondas reduciendo la rigurosidad de las condiciones de hibridación a la vez que mantienen las concentraciones de sonda constantes para todos los tipos. La presente solicitud tampoco combina la sonda para el VPH con el uso de sondas cromosómicas para detectar anomalías de cromosomas en las células infectadas por el VPH.

Hopman y col. (J of Pathology 2004; 202:23-33) analizaron el estado del VPH y las aberraciones cromosómicas en secciones de biopsias del cuello uterino por FISH. Este trabajo sólo usó sondas para VPH-16 y VPH-18 y sondas

genómicas para el cromosoma 1 (1q12), 17 y X. A diferencia del ensayo inventivo que detecta simultáneamente VPH y ganancias cromosómicas en las mismas células, la detección de Hopman y col. de células positivas para el VPH y las aberraciones cromosómicas se realizaron en secciones de tejido paralelas.

- 5 Hasta la fecha, los solicitantes no conocen ninguna publicación que haya demostrado que cualquier anomalía cromosómica con o sin la presencia de otro marcador puede usarse para distinguir displasia de bajo grado de displasia de alto grado o haya combinado un procedimiento de diagnóstico tal con la asociación conocida del VPH y cáncer de cuello uterino.

10 Sumario de la invención

15 La invención se basa en el descubrimiento de que ciertas anomalías cromosómicas pueden usarse para detectar selectivamente neoplasia intraepitelial del cuello uterino de alto grado (NICU II y NICU III) y carcinoma maligno en especímenes de biopsia del cuello uterino y de frotis de Pap sin detectar neoplasia intraepitelial del cuello uterino de bajo grado. El procedimiento puede detectar neoplasia intraepitelial del cuello uterino de alto grado (NICU II y NICU III) y carcinoma maligno a altos niveles de sensibilidad y especificidad, es decir, aproximadamente el 95% de cada una. La invención se basa en el uso de tecnología de hibridación *in situ* en el que se permite que sondas de ácido nucleico marcadas se hibriden con muestras del cuello uterino. Preferentemente se usa hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y las sondas de ácido nucleico son sondas de ADN que están fluorescentemente marcadas. Entonces, los resultados de hibridación guardan relación con un diagnóstico clínico de neoplasia intraepitelial del cuello uterino de alto grado (NICU II y NICU III) y carcinoma maligno.

25 La invención proporciona primero un procedimiento para cribar displasia de alto grado en un sujeto que comprende (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas que comprende el grupo de sondas para los loci específicos 8q24, 3q26, Xp22 y CEP15 que puede detectar selectivamente displasia de alto grado en la muestra biológica en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas con cromosomas en la muestra, si los hay, y (b) detectar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas con la muestra biológica para determinar si el sujeto tiene displasia de alto grado. Algunas realizaciones de este procedimiento se definen en las reivindicaciones adjuntas 2-9. La presente invención también proporciona un procedimiento para cribar displasia de alto grado en un sujeto que comprende (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas que comprende el grupo de sondas para los loci específicos 3q26, 8q24 y el centrómero del cromosoma 8 y con una mezcla de sondas para el VPH en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas con cromosomas en la muestra, si los hay, y suficientes para permitir la detección de células infectadas por el VPH presentes en la muestra, si los hay, (b) detectar la presencia de células infectadas por el VPH en la muestra, y (c) determinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas en las células infectadas por el VPH en la muestra para determinar si el sujeto tiene displasia de alto grado. Algunas realizaciones de este procedimiento se definen en las reivindicaciones adjuntas 11-12.

40 La evaluación de la idoneidad de sondas se basa en demostrar un valor de vector para discriminar entre NICU I y NICU II de aproximadamente 60 o menos, en el que el valor de vector se calcula por $\text{Vector} = [(100 - \text{especificidad})^2 + (100 - \text{sensibilidad})^2]^{1/2}$. Sondas útiles en la invención pueden incorporarse en kits envasados, por ejemplo, con otros reactivos útiles en llevar a cabo los procedimientos de la invención.

45 Las sondas pueden seleccionarse usando las etapas de: (a) proporcionar una primera pluralidad de sondas cromosómicas (por pluralidad se indica una o más sondas); (b) determinar la capacidad de cada una de la primera pluralidad de sondas para distinguir displasia de alto grado (NICU II, NICU III y carcinoma) de displasia de bajo grado (NICU I) en un espécimen del cuello uterino; y (c) seleccionar la sonda o sondas dentro de la primera pluralidad de sondas que distinguen displasia de alto grado de displasia de bajo grado para dar una segunda pluralidad de sondas, en la que la segunda pluralidad de sondas identifica los especímenes de displasia de alto grado con respecto a especímenes de bajo grado a un valor de vector de menos de aproximadamente 60. Sondas preferidas pueden seleccionarse adicionalmente: (d) determinando la capacidad de una combinación de sondas seleccionadas de la segunda pluralidad de sondas para distinguir los especímenes de alto grado de los de bajo grado; y (e) seleccionando una combinación de sondas que identifica el espécimen de alto grado con respecto al espécimen de bajo grado con un valor de vector de menos de aproximadamente 40. Realizaciones más preferidas pueden seleccionarse basándose en valores de vector más bajos (por ejemplo, un valor de vector de menos de aproximadamente 30).

60 La muestra biológica usada con la invención puede contener un espécimen de biopsia del cuello uterino o un frotis del cuello uterino tal como un frotis de Pap o una muestra ThinPrep® preparada mediante el procedimiento de Cytoc Corp., Boxborough, MA. Las sondas usadas con la invención comprenden sondas basadas en ácidos nucleicos detectablemente marcadas tales como sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o sondas de ácido nucleico proteínico (PNA), que se diseñan/seleccionan para hibridarse con la diana cromosómica diseñada específica. Se prefieren marcas fluorescentes tal como se usan en hibridación *in situ* fluorescente, pero también pueden usarse otras marcas detectables comúnmente usadas en técnicas de hibridación, por ejemplo, marcas enzimáticas, cromogénicas e isotópicas.

En otro aspecto de la invención, la detección de las anomalías genéticas se facilita por la adopción de una técnica de cribado de células preliminar por la cual células del cuello uterino se criban primero para la presencia de un marcador asociado adecuado, por ejemplo, tal como la presencia de infección por el VPH, por ejemplo, VPH de alto riesgo, o cantidades anormales de proteínas del ciclo celular tales como p16 y ciclina E, o marcadores de proliferación celular tales como Ki67 y PCNA. Tal cribado puede usarse para identificar células más sospechosas para un examen más detallado y puede permitir que el tiempo requerido para la evaluación de especímenes se reduzca nada menos que 5 - 10 veces. Después de identificarse las células sospechosas, estas células sospechosas se examinan entonces para la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas identificadas por el uso de las sondas en células que también muestran marcadores de posible tumor maligno, tal como infección por el VPH, identifica NICU de mayor grado o tumor maligno. Tales técnicas de cribado son aceptadas para la automatización, permitiendo mayor simplicidad y velocidad en la evaluación de especímenes.

Un ensayo preferido comprende la detección simultánea de infección por el VPH y ganancias cromosómicas por hibridación *in situ* por fluorescencia en células individuales sobre especímenes citológicos del cuello uterino para identificar enfermedad de mayor grado. Este ensayo preferido comprende un procedimiento para cribar displasia de alto grado en un sujeto, procedimiento que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas que comprende el grupo de sondas para los loci específicos 3q26, 8q24 y el centrómero del cromosoma 8 y con una mezcla de sondas para el VPH en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas con cromosomas en la muestra, si los hay, y suficientes para permitir la detección de células infectadas por el VPH presentes en la muestra, si las hay; (b) detectar la presencia de células infectadas por el VPH en la muestra; y (c) determinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas en las células infectadas por el VPH en la muestra para determinar si el sujeto tiene displasia de alto grado. La detección del VPH se hace preferentemente con una mezcla de seis sondas genómicas de longitud completa del VPH (VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-45, VPH-51 y VPH-58) bajo condiciones de hibridación de baja rigurosidad. El uso de esta mezcla bajo condiciones de baja rigurosidad detectará los siguientes tipos de VPH: VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-26, VPH-53 y VPH-66. Preferentemente, las seis sondas para el VPH en la mezcla se marcan de manera que las sondas se detecten usando un sistema de amplificación de señales de tiramida marcada por fluorescencia. La detección de ganancias cromosómicas se hace preferentemente con tres sondas directamente marcadas, marcada cada una en un color fluorescente distinto de las otras y del color de detección de la mezcla del VPH: para el locus cromosómico 8q24 y 3q26 y para el centrómero del cromosoma 8. La determinación de un patrón de hibridación indicativo de la presencia de anomalías cromosómicas en células infectadas por el VPH de alto riesgo establece una correlación con displasia de alto grado.

Descripción detallada de la invención

La invención como se define anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas se refiere a procedimientos de uso de conjuntos de sondas para la detección de displasia de alto grado y carcinoma en células del cuello uterino. Los procedimientos y conjuntos de sondas permiten la detección precoz de displasia de alto grado en muestras biológicas, tales como biopsias y frotis del cuello uterino.

Sondas cromosómicas

Las sondas adecuadas para su uso en los procedimientos de hibridación *in situ* utilizados con la invención se clasifican en dos amplios grupos: sondas de enumeración de cromosomas, es decir, sondas que se hibridan con una región cromosómica, normalmente una región de secuencia de repetición, e indican la presencia o ausencia de un cromosoma entero, y sondas específicas para locus, es decir, sondas que se hibridan con un locus específico en un cromosoma y detectan la presencia o ausencia de un locus específico. También pueden ser útiles sondas para brazos del cromosoma, es decir, sondas que se hibridan con una región cromosómica e indican la presencia o ausencia de un brazo de un cromosoma específico. Las sondas cromosómicas y combinaciones de las mismas se eligen para sensibilidad y/o especificidad cuando se usan en procedimientos de la invención.

Como es muy conocido en la técnica, una sonda de enumeración de cromosomas puede hibridarse con una secuencia repetitiva localizada tanto cerca como eliminada de un centrómero, o puede hibridarse con una secuencia única localizada en cualquier posición en un cromosoma. Por ejemplo, una sonda de enumeración de cromosomas puede hibridarse con ADN repetitivo asociado al centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de cromosomas de primate contienen una compleja familia de repeticiones en tándem largas de ADN que comprenden una longitud de repetición de monómeros de aproximadamente 171 pares de bases, que se denominan en lo sucesivo ADN satélite alfa. Ejemplos no limitantes de sondas de enumeración de cromosomas incluyen sondas para los cromosomas 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 y X. Ejemplos de varias sondas de enumeración de cromosomas específicas se describen en el Ejemplo 1.

Una sonda específica para locus se hibrida con un locus no repetitivo específico en un cromosoma. Ejemplos no limitantes de sondas específicas para locus incluyen sondas para los siguiente loci: 3q26, 8q24, 20q13, Xp22 y 3p21. Algunos de estos loci comprenden genes, por ejemplo, oncogenes y genes supresores de tumores que están alterados en algunas formas de cáncer de cuello uterino. Por tanto, las sondas que eligen como diana estos genes,

tanto exones, intrones como secuencias cromosómicas reguladoras de los genes, pueden usarse en los procedimientos de detección descritos en este documento. Ejemplos de genes diana incluyen: TERC (3q26); MYC (8q24); STK6 (20q13.2-13.3) y MLH (3p21-p23). Ejemplos adicionales se identifican en el Ejemplo 1.

5 Sondas que se hibridan con ADN centromérico y loci cromosómicos específicos están comercialmente disponibles de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL) y Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Alternativamente, las sondas pueden prepararse no comercialmente usando técnicas muy conocidas. Fuentes de ADN para su uso en la construcción de sondas de ADN incluyen ADN genómico, secuencias de ADN clonadas tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), híbridos de células somáticas que contienen una o una parte de un cromosoma humano junto con el complemento del cromosoma normal del huésped, y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdissección. La región de interés puede aislarse por clonación o por amplificación específica de sitio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véanse, por ejemplo, Nath y col., *Biotechnic Histochem*, 1998, 73 (1): 6-22; Wheelless y col., *Citometry*, 1994, 17:319-327; y la patente de EE.UU. nº 5.491.224. También pueden usarse ADN oligomérico sintetizado o sondas de PNA.

15 El tamaño de la región cromosómica detectada por las sondas usado en la invención puede variar, por ejemplo, de la secuencia de la sonda de 171 pares de bases de satélite alfa observada anteriormente a un segmento mayor de 150.000 bases. Para las sondas específicas para locus, que están directamente marcadas, se prefiere usar sondas de al menos 100.000 bases de complejidad, y usar ácido nucleico de bloqueo sin marcar, como se ha desvelado en el documento U.S. 5.756.696 para evitar la unión no específica de la sonda. También es posible usar ácido nucleico oligomérico sintetizado sin marcar o ácido nucleico proteínico como ácido nucleico de bloqueo. Para elegir como diana un locus de gen particular se prefiere que las sondas abarquen todo el locus codificante genómico entero del gen.

25 Las sondas cromosómicas pueden contener cualquier resto de detección que facilite la detección de la sonda cuando se hibrida con un cromosoma. Restos de detección eficaces incluyen tanto marcas directas como indirectas como se describe más adelante.

30 Las sondas cromosómicas pueden marcarse directamente con una marca detectable. Ejemplos de marcas detectables incluyen fluoróforos, es decir, moléculas orgánicas que fluorescen después de absorber luz, e isótopos radiactivos, por ejemplo, ^{32}P y ^3H . Los fluoróforos pueden marcarse directamente tras la unión covalente a un nucleótido incorporando el nucleótido marcado en la sonda con técnicas convencionales tales como traducción in mella, cebado al azar y marcado por PCR. Alternativamente, los nucleótidos de desoxicitidina dentro de la sonda pueden transaminarse con un ligador. El fluoróforo puede entonces unirse covalentemente con los nucleótidos de desoxicitidina transaminados. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.491.224 a Bittner y col.

35 Técnicas de marcado de sondas útiles se describen en *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, Y.-S. Fan, Ed., Chap. 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets", L. Morrison y col., pág. 21-40, Humana Press, © 2002 (citada en lo sucesivo como "Morrison 2002").

40 Ejemplos de fluoróforos que pueden usarse en los procedimientos descritos en este documento son: ácido 7-amino-4-metilcoumarin-3-acético (AMCA), Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y 6)-carboxi-X-rodamina, lissamina rodamina B, 5-(y 6)-carboxifluoresceína; 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC); ácido 7-dietilaminocoumarin-3-carboxílico, 5-(y 6)-isotiocianato de tetrametilrodamina; 5-(y 6)-carboxitetrametilrodamina; 45 ácido 7-hidroxi-coumarin-3-carboxílico; ácido 6-[fluorescein-5-(y 6)-carboxamido]hexanoico; ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico); 5-isotiocianato de eosina; 5-isotiocianato de eritrosina; 5-(y 6)-carboxirodanina 6G; y acetilazida Cascade™ blue (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

50 Si se usan múltiples sondas pueden elegirse fluoróforos de diferentes colores de forma que cada sonda cromosómica en el conjunto pueda visualizarse distintamente. Preferentemente, el panel de sondas usado en la invención comprenderá cuatro sondas separadas, marcada cada una con un fluoróforo separado. Se prefiere el uso de cuatro sondas debió a que los solicitantes creen que esto proporciona el mejor equilibrio entre la sensibilidad clínica (la sensibilidad puede aumentar con sondas añadidas) y la obtención de imágenes/complejidad de detección (la complejidad puede aumentar con sondas añadidas). También está dentro del alcance de la invención usar múltiples paneles secuencialmente en la misma muestra: en esta realización, después de hibridarse el primer panel, los resultados se obtienen como imágenes digitalmente, la muestra se destiñe y luego se hibrida con un segundo panel.

60 Las sondas pueden visualizarse con un microscopio de fluorescencia y un filtro apropiado para cada fluoróforo, o usando conjuntos de filtro paso banda dual o triple para observar múltiples fluoróforos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.776.688 a Bittner y col.

65 Puede usarse cualquier procedimiento de obtención de imágenes microscópico adecuado para visualizar las zonas hibridadas que incluyen sistemas de obtención de imágenes digitales automatizados tales como aquellos disponibles de MetaSystems o Applied Imaging. Alternativamente, pueden usarse técnicas tales como citometría de flujo para examinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas.

Las sondas también pueden marcarse indirectamente, por ejemplo, con biotina o digoxigenina por medios muy conocidos en la técnica. Sin embargo, se requieren moléculas de detección secundarias o posterior procesamiento para visualizar las sondas marcadas. Por ejemplo, una sonda marcada con biotina puede detectarse por avidina conjugada con un marcador detectable, por ejemplo, un fluoróforo. Adicionalmente, la avidina puede conjugarse con un marcador enzimático tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Tales marcadores enzimáticos pueden detectarse en reacciones colorimétricas convencionales usando un sustrato para la enzima. Los sustratos para fosfatasa alcalina incluyen fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y nitroblue tetrazolio. El daminobenzoato puede usarse como sustrato para peroxidasa de rábano picante. La detección de fluorescencia de una biotina hibridada u otra sonda marcada indirecta puede lograrse usando el sistema de amplificación de tiramida comercialmente disponible.

La detección del VPH puede hacerse usando una o más sondas que comprenden la secuencia genómica entera de un tipo de VPH o una secuencia genómica parcial, tal como una mezcla de sondas genómicas completas para tipos de VPH 16 y 18. La mezcla de sondas para el VPH usada debería ser suficiente para identificar la presencia de los principales tipos de riesgo alto que incluyen VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-26, VPH-53 y VPH-66. Una mezcla preferida comprende seis sondas genómicas del VPH de longitud completa (VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-45, VPH-51 y VPH-58) que se usa bajo condiciones de hibridación de baja rigurosidad. Estas seis sondas se seleccionaron basándose en análisis de homología de secuencias con otros tipos de alto riesgo del VPH. Basándose en homología de secuencias y en la suposición de que los tipos de VPH con 50% o mayor homología con estos seis tipos de VPH mostrarán hibridación cruzada, el uso de esta mezcla preferida bajo condiciones de baja rigurosidad detectará los siguientes tipos de VPH: VPH-16, VPH-18, VPH-31, VPH-33, VPH-35, VPH-39, VPH-45, VPH-51, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-26, VPH-53 y VPH-66. En esta mezcla preferida, las concentraciones de cada una de las seis sondas para el VPH se mantienen a cantidades aproximadamente iguales, que son preferentemente inferiores a un 5 por ciento de diferencia en las cantidades de sonda individual en peso. Preferentemente, las seis sondas para el VPH en la mezcla se marcan de manera que las sondas se detecten usando un sistema de amplificación de señales de tiramida marcada por fluorescencia.

Las sondas y conjuntos de sondas útiles con los procedimientos de la invención pueden envasarse con otros reactivos en kits que van a usarse en llevar a cabo los procedimientos de la invención.

Un kit preferido comprende cuatro sondas: (i) una mezcla marcada con biotina de seis sondas para el VPH (para los tipos de VPH 16, 18, 30, 45, 51 y 58); (ii) una sonda cromosómica para el locus del gen TERC en 3q26; (iii) una sonda cromosómica para el locus del gen c-myc en 8q24; y (iv) sonda cromosómica para el centrómero del cromosoma 8.

Determinación de la presencia de displasia de alto grado

Preselección de células

Pueden evaluarse preliminarmente muestras de células mediante una variedad de procedimientos y usando una variedad de criterios. Las sondas y procedimientos descritos en este documento no se limitan al uso con una metodología de cribado particular. Un ejemplo es el "procedimiento de barrido" en el que el observador barre de cientos a miles de células para anomalías citológicas, por ejemplo, como se visualiza con un filtro DAPI. El número de células evaluado dependerá de la celularidad del espécimen, que varía de paciente a paciente. Las anomalías citológicas comúnmente, pero no invariablemente asociadas a células displásicas y neoplásicas, incluyen alargamiento nuclear, irregularidad nuclear y tinción anormal con DAPI (frecuentemente moteada y de color más claro). En la etapa de barrido, el observador se basa preferentemente en la evaluación de las células para anomalías cromosómicas (como se demuestra por FISH) para aquellas células que también presentan anomalías citológicas. Además, puede evaluarse una proporción de las células que no tienen anomalías citológicas obvias, ya que las anomalías cromosómicas también se producen en ausencia de anomalías citológicas. Este procedimiento de cribado se describe en más detalle en la patente de EE.UU. nº 6.174.681 a Halling y col.

Más preferentemente, el observador puede barrer las células para un marcador asociado a cáncer. Por ejemplo, las células pueden barrerse para la presencia de un marcador asociado tal como la presencia de VPH o VPH de alto riesgo (por ejemplo, uno o más de los tipos del VPH 16, 18, 31, 33, 35 ó 45). Adicionalmente, es probable que células con cantidades anormales de proteínas del ciclo celular p16 y ciclina E o marcadores de proliferación Ki67 y PCNA sean sospechosas y buenos candidatos para un examen más detallado. Las células pueden barrerse para la presencia de estos marcadores usando procedimientos muy conocidos. El barrido de células es generalmente aceptado para la automatización. El barrido automatizado permite el aumento de la eficiencia permitiendo que se realicen ensayos más rápidamente y eliminando gran parte del tedio presente en el barrido manual.

Preparación de muestras

La presencia o ausencia de displasia de alto grado y carcinoma puede determinarse identificando aberración cromosómica en las células. Esto puede llevarse a cabo por hibridación *in situ*. En general, la hibridación *in situ*

incluye las etapas de fijar una muestra biológica, hibridar una sonda cromosómica con ADN diana contenido dentro de la muestra fijada, lavar para eliminar la sonda no específicamente unida y detectar la sonda hibridada. La hibridación *in situ* también puede llevarse a cabo con las células del espécimen en suspensión líquida, seguido de detección por citometría de flujo.

5 Las células anormales se caracterizan por números anormales de cromosomas dentro de las células y/o alteraciones estructurales dentro de los cromosomas de las células. Las alteraciones estructurales pueden incluir ganancias o pérdidas (por ejemplo, pérdida hemigigótica u homocigótica) de una región cromosómica específica, tal como un locus o región centromérica como se indica en el Ejemplo 1. Por consiguiente, pueden desarrollarse indicadores de prueba. Por ejemplo, una célula que tiene una o más ganancias cromosómicas, es decir, tres o más copias de cualquier cromosoma dado, puede considerarse positiva por prueba en los procedimientos descritos en este documento. Las células que presentan monosomía o nulisomía también pueden considerarse positivas por prueba en ciertas circunstancias.

15 Una muestra biológica es una muestra que contiene células o material celular, por ejemplo, células o material derivado del cuello uterino del útero. Ejemplos de especímenes del cuello uterino incluyen biopsias, frotis, legrados del cuello uterino y similares. Normalmente, las células se recogen de una muestra biológica y se preparan usando técnicas muy conocidas en la técnica. Están disponibles numerosos procedimientos para la recogida de células del cuello uterino para evaluación. Por ejemplo, las células del cuello ectouterino y cuello endouterino/zona de transformación se recogen usando dispositivos muy conocidos tales como cepillos (o "escobas") endocervicales o espátulas de madera y plástico. Los frotis convencionales se hacen extendiendo uniformemente células y delgadamente sobre un portaobjetos de vidrio. Entonces, el portaobjetos se fija rápidamente por inmersión en 95% de etanol o pulverizando con un fijador comercial según instrucciones del fabricante.

25 Para el procedimiento de recogida ThinPrep® (Cytoc Corp., Boxborough, MA), las células se transfieren del cuello uterino al fijador PreservCyt®. Esto permite que las células se preserven hasta que estén listas para el posterior procesamiento. Entonces, las células se dispersan suavemente, se aleatorizan y se recogen sobre un filtro de membrana TransCyt® extrayendo la muestra a través del filtro con un vacío hasta que un número óptimo de células se deposita en el filtro. Las células pueden procesarse adicionalmente, si se desea. En otro procedimiento, las células recogidas en PreservCyt® u otra disolución de fijador pueden lavarse adicionalmente por centrifugación, eliminación del sobrenadante y resuspensión en disolución de Carnoys (3:1 de metanol:ácido acético), repitiendo (por ejemplo, tres veces) según se desee. Entonces, las células se transfieren a un portaobjetos de vidrio añadiendo gota a gota una pequeña alícuota de suspensión de células directamente sobre el portaobjetos. Los portaobjetos se secan normalmente durante la noche.

35 Detección de anomalías cromosómicas

La ganancia o pérdida de cromosomas o regiones cromosómicas dentro de una célula se evalúa examinando el patrón de hibridación de la sonda cromosómica o conjunto de sondas cromosómicas (por ejemplo, el número de señales para cada sonda) en la célula y registrando el número de señales. Las muestras de prueba pueden comprender cualquier número de células que sea suficiente para un diagnóstico clínico, y normalmente contienen al menos aproximadamente 100 células. En un ensayo típico, el patrón de hibridación se evalúa en aproximadamente 25-5.000 células. Las muestras de prueba se consideran normalmente "positivas por prueba" cuando se encuentra que contienen una pluralidad de anomalías cromosómicas, por ejemplo, las células presentan ganancias o pérdidas de uno o más cromosomas, loci o brazos cromosómicos como se describe en este documento. Los criterios para "positivas por prueba" pueden incluir positivas por prueba con una, dos, tres, cuatro o más sondas. Positivo por prueba con una sonda es un criterio de prueba típico; positivo por prueba con dos sondas es más preferido, y con cuatro en el más preferido. Además, si se usan múltiples sondas, los positivos por prueba pueden incluir la detección de patrones de hibridación anormales con un subconjunto de sondas, por ejemplo, una combinación de ganancias o pérdidas de un subconjunto de las sondas, por ejemplo, dos o tres sondas de un conjunto completo de cuatro sondas. Los patrones de hibridación pueden evaluarse en secuencia para subconjuntos de sondas. Por ejemplo, el patrón de un subconjunto inicial de sondas (por ejemplo, sondas para los loci 3q26 y 8q24) puede evaluarse y, si se indica un resultado positivo del subconjunto de sondas, la prueba puede considerarse en general positiva. Sin embargo, si el resultado inicial no es positivo, el patrón para un subconjunto adicional de sondas (por ejemplo, sondas para el locus Xp22 y cromosoma 15) puede evaluarse para completar la prueba. Si el resultado combinado para todas las sondas indica un resultado de prueba positivo, la prueba puede considerarse en general positiva.

El número de células identificadas con anomalías cromosómicas y usadas para clasificar una muestra particular como positiva variará en general con el número de células en la muestra. Tan sólo una célula puede ser suficiente para clasificar una muestra como positiva. Se prefiere identificar al menos 30 células como positivas, más preferido para identificar al menos 10 células, y lo más preferido para identificar al menos 5 células como positivas. El número de células usadas para una clasificación positiva también se conoce como el valor de corte, que se trata adicionalmente más adelante.

65

Cribado y monitorización de pacientes para displasia de alto grado y carcinoma de cuello uterino

Los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para cribar mujeres para displasia de alto grado como un predecesor a carcinoma de cuello uterino. Por ejemplo, mujeres en riesgo de cáncer de cuello uterino, por ejemplo, mujeres con frotis de PAP anormal, mujeres que están infectadas por un VPH, por ejemplo, VPH de alto riesgo, o mujeres que muestran cantidades anormales de proteínas del ciclo celular tales como p16 y ciclina E, o proteínas de proliferación celular tales como Ki67 y PCNA, pueden cribarse regularmente con el objetivo de la detección precoz de la progresión a displasia de alto grado. Por ejemplo, pueden usarse sondas y procedimientos generales para detectar infección por el VPH en una muestra tales como, por ejemplo, una sonda para el VPH genómica completa. También pueden desarrollarse sondas específicas para tipo para detectar la infección por tipos de VPH específicos tales como uno o más de los tipos del VPH de alto riesgo VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 58. Alternativamente, se conocen anticuerpos y pueden adaptarse para detectar la presencia de proteínas específicas tales como las proteínas p16 y Ki67 en una muestra. En esta realización, la muestra se ensaya primero con la sonda para el VPH o la sonda del anticuerpo para identificar células particulares. Entonces, las células marcadas se evalúan para el estado cromosómico usando un panel de sondas de la invención. La etapa de VPH o anticuerpo puede realizarse simultáneamente o secuencialmente con el panel de sondas cromosómicas.

La prueba de cribado puede incorporarse en el cuidado rutinario de las mujeres, por ejemplo, como un complemento a la evaluación de frotis de Pap rutinario. Los procedimientos descritos aquí también pueden usarse para ajustar estrategias de tratamiento para mujeres. Como una prueba más fidedigna que las pruebas convencionales, por ejemplo, pruebas de Pap, las pacientes pueden dirigirse más fiablemente al remedio invasivo (extirpación de la zona de transformación del cuello uterino de la paciente) según sea necesario. Las pacientes que dan negativo para displasia de alto grado por la metodología de prueba pueden ahorrarse este procedimiento invasivo más fidedignamente.

Procedimientos de selección de sondas

La selección de sondas individuales y conjuntos de sondas para su uso con la invención puede realizarse usando los principios descritos en los ejemplos. Cada sonda seleccionada para un conjunto de sondas debería tener la capacidad por sí misma de discriminar entre células displásicas de alto y bajo grado. Se prefieren sondas con alta capacidad de discriminación. El análisis de discriminación descrito en este documento comprende calcular la sensibilidad y especificidad de cada sonda individualmente para identificar displasia de alto y de bajo grado. Se emplean diversos valores de corte de porcentajes de células para dianas ganadas y perdidas. La métrica primaria para sensibilidad y especificidad combinadas será una cantidad llamada 'vector', que se define como la magnitud del vector dibujada entre los puntos sobre una representación de sensibilidad frente a especificidad que representa la sensibilidad y especificidad ideal (sensibilidad = especificidad = 100) y medida de la sonda particular o conjunto de sondas, como se mide en una cohorte de muestras anormales y normales. Como se describe en el Ejemplo 2, el valor del vector oscila de 0 para el caso ideal a 141,4 para el peor caso. Los análisis estadísticos también pueden usarse para comparar medias y desviaciones estándares entre células displásicas de alto y bajo grado como se describe en el documento US 2003087248.

Para conjuntos de múltiples sondas, cada sonda debería seleccionarse para complementar las otras sondas en el conjunto. Es decir, cada sonda debería identificar marcadores de displasia de alto grado adicionales que la(s) otras(s) sonda(s) fracasa(n) en identificar. Un procedimiento para identificar el mejor conjunto complementario de sondas es tomar la sonda con el menor valor de vector, eliminar el grupo de especímenes de tumor que identificó del conjunto completo de especímenes de tumor y luego determinar la sonda con el menor valor de vector en los especímenes de tumor restantes. Este procedimiento puede continuar según sea necesario para obtener un conjunto completo de sondas. El enfoque aquí descrito de generación de todas las posibles combinaciones de sonda y cálculo de la sensibilidad y especificidad de cada una predice el rendimiento de todos los conjuntos de sondas posibles y permite la selección del conjunto de sondas mínimo con las mayores características de rendimiento. Por tanto, se obtiene una variedad de combinaciones con características de rendimiento similarmente altas. Considerando los posibles errores debido al número finito de especímenes probados, varias de las combinaciones de sonda de alta clasificación pueden compararse basándose en otras características prácticas tales como relevancia al pronóstico de enfermedad o dificultad en la preparación de la sonda.

Sin embargo, independientemente de la capacidad medida para complementar otras sondas, cada sonda debe identificar preferentemente un porcentaje estadísticamente diferente de células positivas por prueba entre los conjuntos de especímenes adyacentes de alto y bajo grado. Si no se cumple esta condición, entonces podría seleccionarse erróneamente una sonda basándose en la complementación aparente. Además, los datos de combinaciones de menos sondas son más fidedignos que los datos de combinaciones de más sondas, por ejemplo, los datos de combinaciones de dos sondas son más fidedignos que los datos de combinaciones de tres sondas. Esto resulta de la capacidad reducida para hacer correlaciones entre mayores números de sondas con el número finito de especímenes probados.

También debe considerarse la dependencia de la sonda y el rendimiento de la combinación de sondas en función del valor de corte. "Valor de corte" puede referirse al número o porcentaje de células en una población que debe

tener ganancias o pérdidas para la muestra que va a considerarse positiva. Por tanto, una muestra puede considerarse positiva o negativa dependiendo de si el número (o porcentaje) de células en el espécimen está por encima del valor de corte o es igual a o inferior al valor de corte, respectivamente. En general, la especificidad y sensibilidad combinada de sondas es mejor a valores de corte bajos. Sin embargo, si las células displásicas de alto grado están distribuidas dentro de una matriz que contiene muchas células normales y de bajo grado tales como de un frotis del cuello uterino, las sondas que rinden mejor a altos cortes son las que más probablemente van a detectarse. Esto es debido a que el buen rendimiento a altos cortes indica una mayor prevalencia de células que contienen la anomalía. Ejemplos de valores de corte que pueden usarse en las determinaciones incluyen aproximadamente 5, 25, 50, 100 y 250 células o 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50% y 60% de células en la población de muestra. En el ensayo preferido que combina la identificación de células infectadas por el VPH y la determinación de anomalías cromosómicas presentes en las células infectadas por el VPH se prefiere un valor de corte de tres (3) células positivas.

La medición de la ganancia de un cromosoma diana o región de cromosoma se prefiere con respecto a la medición de una pérdida de cromosoma diana o región de cromosoma, debido a que el solapamiento de dianas o la escasa/fracasada hibridación con algunas células puede sugerir falsamente la pérdida. Las sondas específicas para locus o para brazos cromosómicos diseñadas para detectar deleciones también son generalmente más pequeñas que las sondas específicas para locus o para brazos cromosómicos diseñadas para detectar ganancias ya que las sondas de deleción no deben extenderse más allá de la región mínimamente delecionada. Si demasiada de la "sonda de deleción" se extiende más allá de la secuencia delecionada, en el ensayo puede producirse suficiente señal que se cuenta falsamente. Como las "sondas de deleción" mantienen normalmente pequeñas sus señales, no son tan intensas como las señales para dianas normalmente ganadas. Esto hace a su vez que sea más probable que las señales reales de dianas se monitoricen para que la deleción pueda contarse mal. Asimismo, sondas de secuencias repetitivas, como algunas sondas de enumeración de cromosomas usadas aquí, son preferibles para sondas de un único locus debido a que normalmente proporcionan señales más brillantes y se hibridan más rápido que las sondas específicas para locus. Por otra parte, las sondas de secuencias repetitivas son más sensibles a polimorfismos que las sondas específicas para locus.

Una sonda o combinación de sondas usada con la presente invención proporciona preferentemente una mejora con respecto a procedimientos convencionales tales como citología. Sondas o combinaciones de sondas útiles de la invención identifican al menos aproximadamente el 70% y preferentemente por encima de aproximadamente el 85% de las muestras con displasia de alto grado y carcinoma (sensibilidad). Similarmente, sondas o combinaciones de sondas útiles identifican como negativas por prueba al menos aproximadamente el 80% y preferentemente por encima de aproximadamente el 95% de muestras negativas (especificidad).

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

1. Selección de sondas iniciales. Para la evaluación se seleccionaron treinta y cinco regiones cromosómicas, identificadas en la Tabla 1 a continuación, conocidas por mostrar algún nivel de amplificación o deleción en cáncer de cuello uterino o displasia. Los colores en la Tabla 1 se refieren a la marca fluorescente usada para cada una de estas sondas.

Tabla1. Sondas y localizaciones diana de genes para la selección de sondas.

Conjunto	Gold	Red	Green	Aqua	Orange
1			1q41 TGFb2	CEP 15 Sat. III	1p31 D1S500
2	2q33-q34 HER-4	2q24 TBR1	2p24* MYCN	CEP 6 Sat. alfa	
3	3p14 FHIT	3p21-p23 MLH	3q26 TERC	CEP 7 Sat. alfa	
4	4p15.3 DDX15		4p16.3* Wolf-Hirsch	CEP 12 Sat. alfa	
5	5p13 DAB2		5p15.2 D5S2064	CEP X Sat. alfa	
6			6q16.3-q21 D6S268	CEP 16 Sat. II	6p21.2 PIM1

Conjunto	Gold	Red	Green	Aqua	Orange
11	11q13* CCND1	11p15.5 HRAS	11q23* MLL	CEP 10 Sat. alfa	
CEP	CEP 11 Sat. alfa	CEP 8 Sat. alfa	CEP 1 Sat. II/III	CEP 17. Sat. alfa	
X			Xq12* Receptor de andrógenos	CEP 18 Sat. alfa	Xp22.3* STS
Conjunto mixto	8q24* MYC	20q13,2- q13.3 STK6	7p12* EGFR	CEP 9 Sat. alfa	

5 Se detectaron trece de estas regiones usando sondas de enumeración de cromosomas (sondas CEP[®] en la Tabla 1)) que eligen como diana secuencias centroméricas repetitivas. Doce de las sondas CEP[®] usadas están comercialmente disponibles de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL). Las otras veintidós regiones se detectaron con sondas específicas para locus que eligen como diana secuencias únicas dentro de regiones cromosómicas amplificadas o delecionadas.

10 Siete de estas sondas específicas para locus usadas están comercialmente disponibles, marcadas con la marca Spectrum Orange[™], de Vysis, Inc. (marcada con un asterisco en la Tabla 1.) Se usó la sonda STS comercial. Para las otras seis sondas se usó el mismo material de ADN de partida que se usa para preparar las sondas comercialmente disponibles. En lugar de la marca Spectrum Orange, el ADN de partida se transaminó y luego se marcó químicamente usando 5-(y 6)-carboxirodamina 6G, éster de succinimidilo (Molecular Probes) para las sondas c-myc y CCND1, y éster de succinimidilo de fluorescina para las otras cuatro. El procedimiento de transaminación y marcado usado se describe en Bittner y col., documento US 5.491.224.

15 La sonda CEP 11 marcada en oro se produjo usando el material de ADN de partida de la sonda CEP 11 comercialmente disponible de Vysis, Inc., y usando el mismo procedimiento que para la sonda c-myc.

20 Las 14 sondas restantes se produjeron a partir de clones de BAC de la fuente que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Detalles experimentales de sondas.

Localización de la sonda	Nombre de la sonda	Identificación del clon de BAC	Tamaño del inserto humano	Fuente de la sonda
2q33-q34	HER-4	RP11 384-K20	156 kb	Research Genetics
3p14	FHIT	CTB-1-012	138 kb	Genome Systems
4p15.3	DDX15	RP11 192p23	171 kb	Research Genetics
2q24	TBR1	RP11 334e15	184 kb	Research Genetics
3p21-p23	MLH1	RP11 491d6	102 kb	Research Genetics
11p15,5	HRAS	GS1 137c7	138 kb	Genome Systems
20q13.2-q13.3	STK6	GS1 32i19	145 kb	Genome Systems
1q41	TGFB2	RP11 224o19	177 kb	Research Genetics
1p31	D1S500	RP11574n2	164 kb	Research Genetics
6p21,2	PIM1	RP3 355m6	134 kb	Research Genetics
5p13	DAB2	CTD-2006d4	127 kb	Research Genetics
3q26	TERC: Clon 300H Clon 300I Clon 300K Clon 300L	4 clones: RP11 3k16 RP11 362k14 RP11 641d5 RP11 816j6	490 kb de tamaño total del cóntigo constituido por cuatro clones individuales 200 kb 125 kb 128 kb 48 kb	Todos los clones de Research Genetics

Localización de la sonda	Nombre de la sonda	Identificación del clon de BAC	Tamaño del inserto humano	Fuente de la sonda
6q16.3-q21	D6S268	RP1-67a8	155 kb	Research Genetics
11q23	MLL	415024	120 kb	Genome Systems
5p.15.2	D5S2064	RP1-144E22	125,5 kb	Research Genetics

5 Las sondas HER-4, FHIT, DDX15 y DAB2 también se produjeron usando el mismo procedimiento que la sonda para c-myc. Las restantes sondas de una única secuencia se produjeron todas usando el procedimiento de traducción en muesca descrito en Morrison 2002, Id. en pág. 27-30, y los nucleótidos marcados Spectrum Orange dUTP, Spectrum Red dUTP o Spectrum Green dUTP (todos de Vysis, Inc.).

10 Entonces, las sondas marcadas se separaron en conjuntos de tres o cuatro sondas cada uno para la evaluación como se indica en la Tabla 1. Los conjuntos de sondas estuvieron constituidos por las sondas individuales, ADN de COT1 (Invitrogen), ADN placentario humano (Signa) y tampón de hibridación LSI/WCP (Vysis, Inc.). 10 µl de cada uno de los conjuntos de sondas se hibridaron con diez muestras cada una de muestras de biopsia de cuello uterino. Los conjuntos de sondas contuvieron cada uno normalmente aproximadamente 0,5 µg de ADN de COT1 y 2 µg de ADN placentario humano. Las mezclas de hibridación de conjuntos de sondas también contuvieron 50 nanogramos de ADN placentario humano marcado con Spectrum Aqua para proporcionar una tinción de referencia de los núcleos en la muestra, como se describe en la patente de EE.UU. 5.789.161, Morrison y col.

15 Se obtuvieron muestras de NICU I, NICU II-III y carcinoma escamoso del cuello uterino invasivo (CA) de la Red cooperativa de tejidos humanos (CHTN) soportada por el Instituto nacional del cáncer. Las muestras se prepararon para hibridación y se hibridaron con los conjuntos de sondas del siguiente modo. Secciones de tejido incorporadas en parafina se colocaron en disolución de xileno durante 5 min. Este procedimiento se repitió 3 veces. Entonces, los portaobjetos se lavaron en etanol del 100% dos veces durante 1 min cada lavado. Entonces, los portaobjetos se pusieron en remojo durante 15 min en 45%/0,3% de disolución de peróxido, se aclararon en agua y se incubaron durante 10 min en disolución de pretratamiento. Después del aclarado, los portaobjetos se incubaron con una proteinasa, por ejemplo, proteinasa K o pepsina, durante 5-30 min para digerir las proteínas en exceso y hacer el ADN más accesible. Entonces, los portaobjetos se deshidrataron en series de etanol, se secaron al aire y se hibridaron con sondas de ADN normalmente durante la noche a 37°C. Después de la hibridación, las sondas no específicas se lavaron en disoluciones de lavado de post-hibridación tales como, por ejemplo, lavar durante 2 minutos a 73 ± 1°C 2 x SSC/0,3% de NP40. Entonces, los portaobjetos se lavaron en una segunda disolución de lavado tal como 2 x SSC/0,1% de NP40. Entonces se aplicó una tinción de ADN DAPI a los portaobjetos para facilitar la evaluación de muestras.

20 El procedimiento permitió que todas las sondas se hibridaran con las muestras. La mayoría de las sondas mostraron buena intensidad de señales con respecto a la referencia. Las capas epiteliales de las muestras de biopsia se evaluaron bajo un microscopio de fluorescencia para identificar cualquier célula que mostrara amplificación (superior a dos señales) o delección (inferior a dos señales) de la diana de ADN. Las ganancias se registraron para cada muestra que mostró amplificación en cinco o más células para una sonda particular; las pérdidas se registraron para cada muestra que mostró una delección en cinco o más células. Las muestras que muestran ni ganancias ni pérdidas se consideraron disómicas.

25 La sensibilidad, es decir, el porcentaje de muestras que muestran la condición probada, de cada sonda para NICU I, NICU II-III y carcinoma invasivo se determinó para ganancias, pérdidas y disomías. Se encontró que las pérdidas se producían muy poco frecuentemente en muestras de NICU II-III y entonces no fueron generalmente útiles como marcadores para NICU II-III y carcinoma invasivo. Las sondas se evaluaron adicionalmente para su capacidad para mostrar frecuencia máxima de ganancias para NICU II-III y frecuencia mínima de ganancias para NICU I. Los resultados se presentan en la Tabla 3. Las sondas para las dianas 8q24, 20q13, 3p21, 3q26, 1p31, Xp22 y CEP 15 se consideraron las más informativas y se seleccionaron para la evaluación adicional. La sonda 3p14 mostró pérdida significativa en NICU II-III y muestras de carcinoma invasivo. La relación de la ganancia relativa de 3q26 con respecto a 3p14 también se evaluó como una medida de la ganancia relativa del brazo q del cromosoma 3 a su brazo p.

Tabla 3. Sensibilidad de sondas para detectar ganancias, pérdidas y disomías en especímenes de cuello uterino.

Sonda	Ganancia			Pérdida			Disomía		
	NICU I	NICU II-III	CA	NICU I	NICU II-III	CA	NICU I	NICU II-III	CA
8q24	0	80	100	0	0	0	100	20	0
Xp22	0	70	75	19	0	5	81	30	20
CEP 15	0	70	90	0	0	0	100	30	10
20q13	10	80	90	0	0	0	90	20	10
1p31	10	70	80	0	0	0	90	30	20
3p21	13	85	55	6	0	18	81	15	27
CEP 10	15	70	100	10	0	0	75	30	0
3q26	25	80	100	5	0	0	70	20	0
5p13	30	80	100	5	0	0	65	20	0
CEP 8	30	78	100	5	0	0	65	22	0
5p15	40	80	100	5	0	0	55	20	0
CEP X	50	75	100	5	0	0	45	25	0
2p24	20	67	90	0	0	0	80	33	10
Xq12	14	60	95	14	0	5	74	40	0
CEP 7	25	60	90	5	0	10	70	40	0
CEP18	12	60	90	0	0	0	88	40	10
CEP 16	20	60	100	0	0	0	80	40	0
7p12	10	60	90	0	0	10	90	40	0
3p14	10	60	9	10	20	82	80	20	9
1q41	10	60	90	0	0	10	90	40	0
11q13	25	60	85	0	0	0	75	40	15
CEP 12	10	55	100	5	0	0	85	45	0
CEP 6	10	50	100	10	0	0	80	50	0
4p16	30	50	80	0	0	0	70	50	20
4p15	20	50	70	0	0	0	80	50	30
2q33	12	50	50	12	12	15	76	38	35
11p15	15	50	90	0	0	0	85	50	10
CEP 11	20	45	100	5	0	0	75	55	0
CEP 9	0	44	100	5	0	0	95	56	0
CEP 17	10	40	100	5	0	0	85	60	0
6q16-21	10	40	73	0	10	0	90	50	27
CEP 1	13	33	100	6	0	0	81	57	0
2q23	20	30	80	0	10	0	80	60	20
11q23	45	30	80	0	0	0	55	70	20
6p21	0	10	77	5	10	0	95	80	23

2. Análisis discriminante de datos de hibridación *in situ* y selección de conjuntos de sondas. Muestras de biopsia incorporadas en parafina adicionales clasificadas como normales (WNL), NICU I, NICU II, NICU III y carcinoma de células escamosas (CA) se obtuvieron del Centro médico de la Universidad de Texas Southwestern, Dallas, TX (Dr. Raheela Ashfaq). Las muestras se prepararon y se hibridaron con dos conjuntos de sondas (CEP 15, 8q24, Xp22 y 20q13; y CEP 3, 3q26, 3q14 y 3p21) como antes. Seis de las sondas usadas - 8q24, Xp22, CEP 15, 20q13, 3p21 y 3q26 - se tomaron de las zonas preferidas identificadas en el Ejemplo 1. Otras dos - CEP 3 y 3p14 - se compararon con sondas para 3p21 y 3q26 para evaluar mejor la relación del cromosoma 3 en la progresión a

5
10

cáncer de cuello uterino.

5 La capacidad de las sondas individuales y ciertas combinaciones de sondas para discriminar entre displasia de alto y de bajo grado en células del cuello uterino se evaluó determinando el número de especímenes correctamente identificados por cada sonda o conjunto de sondas. Se usó un número de corte de cinco células con ganancias o pérdidas para evaluar las muestras. Una muestra se llamó positiva o negativa para displasia de alto grado o carcinoma dependiendo de si el número de células en la muestra estaba por encima del valor de corte o era igual a o inferior al valor de corte, respectivamente. Entonces se usaron las precisiones de identificar muestras positivas (sensibilidad) y muestras negativas (especificidad) para seleccionar las mejores sondas y combinaciones de sondas.

10 La Tabla 3a enumera la especificidad y sensibilidad de ganancia y pérdida para ciertas dianas de sondas.

Tabla 3a. Mediciones de sensibilidad y especificidad con respecto a grados de muestra.

Sonda	Especificidad WNL	Especificidad NICU I	Especificidad WNL+ NICU I	Sensibilidad NICU II	Sensibilidad NICU III	Sensibilidad CA	Sensibilidad NICU II+ NICU III+ CA
CEP15	100,00	89,47	94,74	48,15	60,00	57,89	55,35
8q24	95,24	73,68	84,46	96,30	95,00	100,00	97,10
Xp22	100,00	89,47	94,74	59,26	70,00	94,74	74,67
20q13	100,00	78,95	89,48	66,67	70,00	100	78,89
CEP3	100,00	84,21	92,11	55,56	70,00	68,42	64,66
3q26	100,00	73,68	86,84	77,78	90,00	100,00	89,26
3p14	100,00	78,95	89,47	33,33	60,00	15,79	36,37
3p21	100,00	84,21	92,11	37,04	65,00	21,05	41,03
Ganancia 3q26 y pérdida 3p14	100,00	100,00	100,00	7,41	15,00	78,95	33,79
Relación 3q26/CEP3>1	100,00	89,47	94,74	29,63	70,00	84,21	61,28
Relación 3q26/3p14>1	95,24	84,21	89,73	66,67	80,00	94,74	80,47
Pérdida: 3p14<1	95,24	100	97,62	29,63	15,00	89,47	44,70

15 La capacidad para discriminar entre tipos celulares depende de la especificidad y sensibilidad global. La buena discriminación requiere buena especificidad y sensibilidad. La Tabla 3b presenta resultados para una medida combinada de especificidad y sensibilidad designada "vector". El vector se calcula como

$$\text{Vector} = [(100-\text{especificidad})^2 + (100-\text{sensibilidad})^2]^{1/2}$$

20 La especificidad y sensibilidad se definen como porcentajes y oscilan del 100% (perfecta) al 0% para no especificidad (o sensibilidad) en absoluto. Por tanto, los valores de vector oscilan de 0 para especificidad perfecta y sensibilidad a 141 para especificidad y sensibilidad cero.

25 La Tabla 3b está clasificada por valor de vector creciente para cada categoría de muestra. Las sondas individuales que muestran una alta capacidad para discriminar (valor de vector bajo) incluyen 3q26, 8q24 y CEP 3. Otras sondas que muestran una capacidad útil para discriminar displasia de alto grado y carcinoma de displasia de bajo grado son 20q13, Xp22, CEP 15 y 3p21. Los vectores determinados para relaciones de sonda tales como 3q26/CEP (que se determina que es >1) y 3q26/3p14 (que se determina que es >1) también pueden ser útiles. Otros procedimientos para evaluar y seleccionar sondas usando técnicas analíticas de discriminación y combinatorias se describen en el

documento de EE.UU. n° de serie 10/081.393 por Morrison y col. presentado el 20 de febrero de 2002, que se incorpora en este documento por referencia.

Tabla 3b. Valor de vector para grados de muestras.

Sonda/vector	NICU I frente a NICU II	WNL + NICU I frente a NICU II	(WNL + NICU I) frente a (NICU II + NICU III)
3q26	27,00	17,75	13,50
8q24	28,07	16,76	16,87
CEP3	35,55	33,82	25,69
20q13	41,11	36,34	33,49
Xp22	43,73	42,66	35,88
CEP 15	51,22	50,31	46,76
3p21	54,59	53,63	39,59
Relación 3q26/CEP 3>1	54,59	53,63	31,36
Relación 3q26/3p14>1	54,59	53,63	31,36
3p14	62,53	60,64	47,47
Ganancia 3q26 y pérdida 3p14	93,30	93,30	88,30
Pérdida:3p14<1	93,30	93,30	88,30

5 Basándose en los resultados del análisis de discriminación y la complementariedad de sondas como se ha descrito anteriormente, sondas preferidas para su uso en distinguir displasia de alto grado de displasia de bajo grado en muestras de cuello uterino incluyen sondas para los loci 3q26 y 8q24 y CEP 3. Los conjuntos de sondas que comprenden las sondas 3q26 y 8q24; 3q26, 8q24, Xp22, y CEP 15; 8q24, 20q13, Xp22 y CEP 15; y 3p21, 3p14, 3q26 y CEP 3 son particularmente preferidos.

10 **3. VPH combinado y ensayo de ganancia cromosómica.** Se desarrolló y se probó un ensayo de hibridación *in situ* por fluorescencia para detectar la presencia de infección por el VPH y ganancias cromosómicas en la(s) misma(s) célula(s).

15 Plásmidos del VPH y composición de sondas

20 Se usaron plásmidos que contenían la secuencia codificante completa de VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-45, VPH-51 y VPH-58 para generar sondas de ADN marcadas con biotina por traducción in mella usando un protocolo de convención. Los plásmidos del VPH se obtuvieron de las siguientes fuentes: VPH-16 y VPH-18 se compraron de la Colección americana de cultivos tipo (ATTC), VPH-30 y VPH-45 se obtuvieron de Dr. Ethel-Michele de Villiers (DKFZ, Alemania), y los plásmidos de VPH-51 y VPH-58 se obtuvieron de Klara Abravaya (Abbott Laboratories). Las fuentes originales para los plásmidos de VPH-51 y VPH-58 son Dr. Saul Silverstein (Universidad de Columbia) y Dr. Toshihiko Matsukura (Japón), respectivamente.

25 Estas seis sondas para el VPH se combinaron con sondas específicas para locus 8q24 (c-myc) y 3q26 (TERC) y la sonda centromérica CEP-8. Las sondas específicas para locus 8q24 y 3q26 usadas fueron aquellas descritas anteriormente en el Ejemplo 1, excepto que la sonda para 8q24 se marcó en Spectrum Red y la sonda para 3q26 se marcó en Spectrum Yellow usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

30 La composición de la mezcla de sondas es: 1X tampón LSI, 2X SSC, 7,5 µg/ml de Spectrum Red c-myc (8q24), 10,0 µg/ml de Spectrum Yellow TERC (3q26), 2,5 µg/ml de Spectrum Aqua CEP-8, 2,5 µg/ml de cada uno de VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-45, VPH-51 y VPH-58 marcados con biotina, 200 µg/ml de ADN placentario humano y 100 µg/ml de ADN de Cot-1.

35 Preparación de muestras y protocolo de ensayo

40 Especímenes del cuello uterino residuales preservados en Thin-Prep se obtuvieron de Mayo Clinic. Los portaobjetos de Thin-Prep de los especímenes del cuello uterino preservados se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante (Cytec). Las muestras se prepararon para hibridación del siguiente modo. Portaobjetos Thin-Prep se pusieron en remojo en 2 x SSC a 73°C durante 2 minutos, seguido de incubación en pepsina (0,5 mg/ml en HCl 10 mM) a 37°C durante 10 minutos. Entonces, los portaobjetos se lavaron en 1X PBS a temperatura ambiente durante 5

minutos, se fijaron en 1% de NBF (NBF - formalina neutra tamponada) a temperatura ambiente durante cinco minutos y se aclararon en 1X PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después del aclarado, los portaobjetos se deshidrataron en series de etanol, se secaron al aire y se hibridaron con el VPH combinado y la mezcla de sondas cromosómicas durante la noche a 37°C. Después de la hibridación, las sondas en exceso se lavaron en lavado de post-hibridación que consiste en 2x SSC/0,3% de NP-40 durante 2 minutos a 48°C y luego 2x SSC/0,1% de NP-40 durante 1 minuto a temperatura ambiente.

La detección de las sondas para el VPH marcadas con biotina se realizó usando el kit de amplificación de señales de tiramida Alexa Fluor™ 488 (Molecular Probes) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, la actividad de peroxidasa endógena se bloqueó por incubación en 3% de H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente y los portaobjetos se lavaron en 1X PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces, los portaobjetos se incubaron con 1% de reactivo de bloqueo en PBS a 37°C durante 25 minutos, seguido de estreptavidina-HRP a 37°C durante 25 minutos. Después de lavar los portaobjetos 3 veces en 1X PBS, el complejo de sonda para VPH marcada con biotina / estreptavidina-HRP se visualizó por incubación con tiramida marcada con Alexa Fluor 488 durante 10' a temperatura ambiente. Entonces, los portaobjetos se lavaron en 1X PBS, se aplicó la contratinción nuclear DAPI y los portaobjetos se cubrieron con el cubreobjetos.

Los portaobjetos hibridados se analizan bajo un microscopio de fluorescencia. La sonda para el VPH se visualiza usando el filtro verde y la tinción podría aparecer como una tinción difusa por todo el núcleo de la célula, tinción punteada o tinción mixta (punteada y difusa). La sonda para Spectrum Yellow 3q26 se detecta usando un filtro de oro, Spectrum Red 8q24 se detecta usando un filtro rojo y Spectrum Aqua CEP8 se detecta usando un filtro aguamarina. Todos los filtros están comercialmente disponibles de Vysis, Inc., Downers Grove, IL.

Resultados de ensayos de ganancias cromosómicas de VPH

Especímenes del cuello uterino residuales preservados en Thin-Prep se obtuvieron de Mayo Clinic. Se analizaron cincuenta y siete especímenes diagnosticados con citología de LIEB o LIEA. Después de la hibridación y el lavado como se ha descrito anteriormente, los portaobjetos se evaluaron usando microscopía de fluorescencia para la presencia de VPH y ganancias cromosómicas. Los resultados guardaron relación con la histología disponible y el seguimiento clínico. El análisis de portaobjetos se realizó del siguiente modo: (1) El área superficial completa del portaobjetos se analizó usando un aumento de 40x para identificar células positivas para VPH, (2) para cada célula positiva se registraron el patrón de VPH (difuso, punteado o mixto) y los recuentos cromosómicos para cada sonda, (3) además, las ganancias cromosómicas se analizaron independientemente del estado de VPH de la célula. Se registraron las células con 3 o más señales para la sonda MYC o TERC. Los resultados se exponen en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Características de los grupos citológicos de especímenes

CARACTERÍSTICA MEDIDA	GRUPO DE LIEB	GRUPO DE LIEA
Número de muestras por grupo	30	27
Número de muestras positivas para VPH	19/30=63 %	22/27=82 %
Número de muestras con biopsia concurrente n=23	11/30=36%	12/27=44%
Número de muestras con biopsia de NICU 2+ concurrente n=10	1	9
Número de muestras con biopsia de NICU 1 concurrente n=11	8	3
Número de muestras con biopsia negativa/benigna concurrente n=2	2	0

Tabla 5. Análisis de datos para grupos de NICU 2+ y NICU 1

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DEL CUELLO UTERINO USANDO DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES		
Criterios para la positividad de la prueba	SENSIBILIDAD (especímenes de NICU 2+ n=10)	ESPECIFICIDAD (especímenes de NICU 1 n=11)
PRUEBA DE FISH - 30 células anormales	5/10=50%	8/11=73%
PRUEBA DE FISH - 20 células anormales	7/10=70%	5/11=45%
PRUEBA DE VPH - 30 células pos	9/10=90%	10/11=91%
PRUEBA DE VPH - 20 células pos	10/10=100%	8/11=73%

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA DEL CUELLO UTERINO USANDO DIFERENTES MARCADORES MOLECULARES		
Criterios para la positividad de la prueba	SENSIBILIDAD (especímenes de NICU 2+ n=10)	ESPECIFICIDAD (especímenes de NICU 1 n=11)
PRUEBA DE SOLAPAMIENTO DE VPH/FISH - 3 células VPH+/FISH+	9/10=90%	8/11=73%
PRUEBA DE SOLAPAMIENTO DE VPH/FISH - 1 célula VPH+/FISH+	9/10=90%	5/11=45%

Como se muestra en la Tabla 5, el ensayo de anomalías cromosómicas del VPH combinado pudo identificar displasia de alto grado a alta sensibilidad del 90% usando un valor de corte de tres células positivas, a la vez que retenía especificidad aceptable.

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribar displasia de alto grado en un sujeto, procedimiento que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas que comprende el grupo de sondas para los loci específicos 8q24, 3q26, Xp22 y CEP15 que puede detectar selectivamente displasia de alto grado en la muestra biológica en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas con cromosomas en la muestra, si los hay; y
- 10 (b) detectar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas con la muestra biológica para determinar si el sujeto tiene displasia de alto grado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica comprende una muestra de biopsia del cuello uterino, frotis del cuello uterino o legrado del cuello uterino.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las sondas cromosómicas están fluorescentemente marcadas.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que células de la muestra biológica se criban previamente para un marcador asociado a riesgo para cáncer.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células de la muestra biológica se criban previamente para infección por el VPH.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la muestra se criba para infección por uno o más de los tipos del VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 58.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células de la muestra biológica se criban previamente para la presencia de una proteína del ciclo celular o un marcador de proliferación celular.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la proteína del ciclo celular es p16 o ciclina E.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el marcador de proliferación celular es la proteína Ki67 o la proteína PCNA.
- 35 10. Un procedimiento para cribar displasia de alto grado en un sujeto, procedimiento que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con un conjunto de sondas cromosómicas que comprende el grupo de sondas para los loci específicos 3q26, 8q24 y el centrómero del cromosoma 8 y con una mezcla de sondas para el VPH en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas con cromosomas en la muestra, si los hay, y suficientes para permitir la detección de células infectadas por el VPH presentes en la muestra, si las hay;
- 40 (b) detectar la presencia de células infectadas por el VPH en la muestra; y
- (c) determinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas en las células infectadas por el VPH en la muestra para determinar si el sujeto tiene displasia de alto grado.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la mezcla de sondas para el VPH comprende sondas sustancialmente complementarias a la secuencia codificante completa para cada uno de VPH-16, VPH-18, VPH-30, VPH-45, VPH-51 y VPH-58.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que las condiciones de hibridación son suficientes para detectar la presencia de cualquiera de VPH-31, VPH-33; VPH-35, VPH-39, VPH-52, VPH-56, VPH-58, VPH-59, VPH-26, VPH-53 y VPH-66.