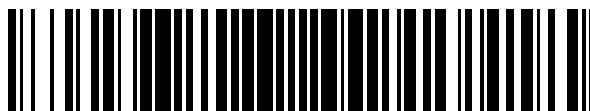


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 893**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03809343 .1**
96 Fecha de presentación: **21.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1556701**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Método para el diagnóstico mejorado de las displasias**

30 Prioridad:
28.10.2002 EP 02024030
07.03.2003 EP 03100584

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
ROCHE MTM LABORATORIES AG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 583
69120 Heidelberg , DE

72 Inventor/es:
RIDDER, RUEDIGER;
REICHERT, ANJA;
TRUNK-GEHMACHER, MARCUS y
BATRLA, RICHARD

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

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).

ES 2 391 893 T3

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico mejorado de las displasias

5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico mejorado de las displasias que se basa en la detección simultánea de los productos del gen *INK4a* y en por lo menos un marcador de la proliferación celular. Particularmente, la presente invención proporciona un método para discriminar las células displásicas que sobreexpresan productos del gen *INK4a* de las células que sobreexpresan productos del gen *INK4a* pero que no son displásicas, mediante la detección de un marcador adecuado para la caracterización de las propiedades de proliferación de la célula respectiva. La caracterización de las propiedades de proliferación puede comprender la detección de un marcador o conjunto de marcadores característico de la proliferación celular activa, y/o un marcador o conjunto de marcadores característico de la proliferación celular retardada o detenida. De esta manera, el método presentado en la presente memoria permite un diagnóstico específico de las displasias en los especímenes histológicos y citológicos.

15 La detección de la sobreexpresión de p16^{INK4a} en las muestras biológicas ha demostrado ser un marcador útil en la detección de las lesiones anogenitales, tales como el carcinoma del cérvix uterino (ver la patente WO n° 00/01845; Klaes *et al.*, Int. J. Cancer 92:276-2784, 2001). El método basado en la tinción inmunquímica específica de p16^{INK4a} permite una identificación sensible y específica de las células displásicas en secciones de tejidos y en muestras citológicas.

25 En los exámenes inmunohistoquímicos de los tejidos displásicos, las células neoplásicas pueden teñirse utilizando un procedimiento de tinción mediado por un anticuerpo específico de p16^{INK4a}. De esta manera, puede corroborarse el diagnóstico histológico de las lesiones neoplásicas con un procedimiento de tinción basado en un marcador molecular característico de la transformación de las células en las lesiones anogenitales. El diagnóstico en estos procedimientos, sean o no neoplásicas las células, se basa en la tinción específica de p16^{INK4a}, aunque también se basa en información histológica.

30 Lo anterior se debe al hecho de que en aproximadamente 20% a 30% de las muestras, las células metaplásicas muestran cierta inmunorreactividad con los anticuerpos específicos de p16^{INK4a} y de esta manera resultan teñidas durante el curso de los procedimientos. Sin embargo, el patrón de tinción proporcionado por dichas células metaplásicas difiere del patrón ofrecido por las lesiones neoplásicas. Las células metaplásicas dan lugar un patrón de tinción irregular o focalizado, mientras que las lesiones neoplásicas dan lugar a un patrón de tinción difusa. Además, las intensidades de la tinción de las células metaplásicas son mayoritariamente inferiores a las de las células neoplásicas.

40 Los métodos habituales utilizados en los ensayos de cribado para la detección precoz de las displasias y/o neoplasias no utilizan ensayos basados en la histología sino que más bien se basan en procedimientos de ensayo citológico. Sin embargo, especialmente en los casos en los que no se dispone de información histológica sobre la arquitectura de los tejidos, tales como, por ejemplo, en los exámenes citológicos, el ensayo para la sobreexpresión de p16^{INK4a} por sí solo puede conducir a resultados falsos positivos. Esto se debe al hecho de que aquellas fracciones de células metaplásicas que expresan p16^{INK4a} a niveles detectablemente elevados podrían no diferenciarse según los criterios histológicos.

45 El porcentaje de células que muestran una sobreexpresión de p16^{INK4a} se incrementa durante el curso de la aparición de las displasias. De esta manera, durante las etapas neoplásicas o preneoplásicas, en el caso de que únicamente se encuentre presente una población restringida de células neoplásicas o preneoplásicas en las muestras, la inmunorreactividad de p16^{INK4a} puede ser débil. Esta débil inmunorreactividad puede ser de aproximadamente del nivel provocado por las células metaplásicas. En etapas posteriores de las displasias, la inmunorreactividad global de p16^{INK4a} es más fuerte y por lo tanto las lesiones neoplásicas son fácilmente discernibles de las metaplasias, incluso en un formato de ensayo citológico. Esto podría conducir a casos en los que la presencia de células metaplásicas que expresan p16^{INK4a} se confunda con la presencia de células neoplásicas y de esta manera genere un resultado falso positivo.

55 Especialmente en los ensayos de cribado, en los que la detección de etapas tempranas de las neoplasias resulta deseable, esta condición resulta bastante indeseable. Ello resulta especialmente cierto porque el diagnóstico basado en p16^{INK4a} ha demostrado ser una herramienta valiosa en los exámenes histológicos y la aplicación en un procedimiento de cribado basado en la citología podría mejorar dichos procedimientos establecidos.

60 Para reducir los resultados falsos positivos en los formatos de ensayo citológico y de esta manera incrementar adicionalmente la fidelidad del diagnóstico mediado por p16^{INK4a} de las lesiones anogenitales, resultaría deseable un método para discriminar las metaplasias de las lesiones neoplásicas y displásicas. Un método para la discriminación de las metaplasias de las lesiones neoplásicas y preneoplásicas se proporciona en las realizaciones reivindicadas según la presente invención.

Para proporcionar soporte a la discriminación de las lesiones metaplásicas de las neoplásicas en los procedimientos de ensayo basados en la sobreexpresión de p16^{INK4a} resultaría deseable una molécula marcadora que se expresase en células y tejidos neoplásicos y/o preneoplásicos y que no se expresase simultáneamente con productos génicos INK4a en una misma célula metaplásica.

Una solución al problema existente en la técnica se proporciona en los métodos reivindicados según la presente invención. Durante el curso de los experimentos que han conducido a la presente invención, los inventores han encontrado que una combinación de detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de p16^{INK4a} y por lo menos un marcador para la proliferación celular tal como, por ejemplo, Ki67, Ki-S2, mcm5 ó mcm2, podría resolver el problema existente en la técnica.

En la técnica se presenta un par de documentos referentes a la utilización de una combinación de marcadores moleculares para el diagnóstico mejorado de las displasias. En la patente WO n° 0208764 se da a conocer un método para el diagnóstico mejorado de los tumores malignos cervicales utilizando una combinación de un marcador de VPH y un marcador para la proliferación celular o la actividad vírica. Se menciona p16^{INK4a} en el contexto de la presente invención como marcador de la actividad vírica para la combinación con marcadores de VPH.

En la patente EP n° 1217377 se da a conocer un método para la detección automática de tumores malignos cervicales mediada por la detección de más de una molécula marcadora. Se indican algunas combinaciones definidas de marcadores en dicho documento. No se proporciona enseñanza en dicho documento referente a la elección de marcadores adecuados para una combinación. El propósito de la combinación en la presente solicitud es una fidelidad mejorada del análisis automatizado de los patrones de tinción en especímenes citológicos biológicos. Dicho documento menciona la combinación de p16^{INK4a} con otros marcadores tumorales.

La patente WO n° 2059616 da a conocer un método para la detección de alteraciones del ciclo celular para el diagnóstico mejorado de los tumores malignos cervicales. El documento da a conocer que las células displásicas muestran alteraciones en el control del ciclo celular y que de esta manera podrían identificarse mediante la detección de las proteínas de tipo ciclina E conjuntamente con sustancias posteriores a la etapa G1 en las células.

Jeffrey Keating en "Ki67, Cyclin E, and p16INK4a Are Complimentary Surrogate Biomarkers for human papilloma Virus-Related Cervical Neoplasia" (American Journal of Surgical Pathology 25(7):884-891, 2001) da a conocer la complementariedad de la utilización de p16INK4a, Ki67 y ciclina E en el curso del diagnóstico de las displasias cervicales. El documento se refiere a los problemas de cada marcador individual en la detección de las displasias y los estados, a que p16^{INK4a} en combinación con la ciclina E podría resultar adecuado para superar las desventajas de las molécula marcadoras individuales, especialmente en el caso de que se examinen especímenes citológicos. No se proporciona ninguna exposición que enseñe la utilización de p16^{INK4a} conjuntamente con un marcador característico para células proliferantes, tal como Ki67. El documento no enseña la combinación de p16^{INK4a} para la utilización en métodos diagnósticos; además, la exposición se refiere a un uso restringido de Ki67 en el diagnóstico cervical diferencial y, de esta manera, no enseña la utilización de dicho marcador en el diagnóstico de los tumores malignos cervicales.

En la técnica no da a conocer ninguna enseñanza sobre la utilización de una combinación de p16^{INK4a} con un marcador característico para la proliferación celular para la utilización en un método diagnóstico de la discriminación mejorada de las células no displásicas positivas para p16^{INK4a} respecto de las displasias positivas para p16^{INK4a}. La patente WO n° 02059616 no sugiere la utilización de p16^{INK4a} en la detección de la proliferación celular displásica. La patente EP n° 1217377 no proporciona ninguna enseñanza sobre una utilización para la combinación de marcadores tumorales durante el curso de la detección aparte de la automatización del procedimiento de análisis. No se proporciona exposición referente a la ventaja de combinaciones para los fines de discriminación específica, tales como la discriminación de células displásicas de, por ejemplo, células metaplásicas en especímenes cervicales.

Los inventores de la presente invención han buscado superar la desventaja presente en la técnica de que p16^{INK4a}, sobreexpresado en diversas displasias, también puede detectarse en algunas otras células no displásicas. La discriminación entre las células positivas para p16^{INK4a} no displásicas y las células displásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} podría basarse en las características de proliferación de las células respectivas. En las células normalmente controladas, p16^{INK4a} inhibe cdk4 y de esta manera inhibe la proliferación. En contraste, en las células displásicas esta regulación se encuentra alterada. De esta manera, p16^{INK4a} no conduce a una inhibición de la proliferación celular a pesar de su nivel de expresión excepcionalmente alto.

Los inventores de la presente invención han encontrado que las células displásicas pueden discriminarse de las células que muestran una proliferación celular controlada, mediante la detección simultánea de p16^{INK4a} y un marcador característico de la proliferación celular. Debido al hecho de que en células normales los niveles elevados de p16^{INK4a} inhiben la proliferación celular, las células que sobreexpresan p16^{INK4a} pueden clasificarse como displásicas con la condición de que muestren las características de proliferación celular activa.

La presente invención se refiere a un método para la discriminación de lesiones neoplásicas, preneoplásicas y/o displásicas de las células no displásicas que muestran niveles elevados de p16^{INK4a}, en muestras biológicas en un procedimiento de ensayo histológico o citológico basado en la detección de la presencia o ausencia de células que expresan el gen *p16^{INK4a}* simultáneamente con marcadores de la proliferación celular en dichas muestras biológicas.

Pueden ser marcadores adecuados de proliferación celular, por ejemplo, Ki67, Ki-S2, Ki-S5, mcm5 ó mcm2. En una realización de la invención, la proteína o ARNm de los marcadores de proliferación celular pueden servir como marcador para la discriminación de metaplasias y lesiones displásicas o preneoplásicas tempranas en las muestras.

En un aspecto de la presente invención se proporciona un método para discriminar las células displásicas que sobreexpresan productos del gen *INK4a* de otras células que expresan productos del gen *INK4a* a un nivel detectable en muestras biológicas, que comprende determinar en un procedimiento de ensayo citológico o histológico la coexpresión de por lo menos dos molécula marcadores en por lo menos una célula individual, en el que por lo menos una molécula marcadora es un producto de expresión codificado por el gen *INK4a* y por lo menos una molécula marcadora adicional es un marcador de la proliferación celular, en el que la sobreexpresión de por lo menos un producto del gen *INK4a* y la expresión de por lo menos un marcador para la proliferación celular activa a un nivel inmunoquímicamente detectable dentro de dicha célula individual es indicativo del estado displásico de la célula y en el que la sobreexpresión de por lo menos un producto del gen *INK4a* y la expresión de por lo menos un marcador de senescencia, diferenciación terminal de las células, apoptosis o detención del ciclo celular a un nivel detectable dentro de dicha célula individual es indicativo del estado no displásico de la célula.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit de ensayo para la determinación de displasias en muestras según el método dado a conocer en la presente memoria, tal como se establece en las reivindicaciones del kit.

Durante los experimentos que han conducido a la presente invención se encontró que, bajo determinadas circunstancias, las células no displásicas pueden mostrar inmunorreactividad para p16^{INK4a}. Los inventores encontraron que dichas células que mostraban un control ordenado de la proliferación celular en respuesta a niveles elevados de los productos del gen *INK4a* experimentaban la detención del crecimiento. De esta manera, estas células individuales no mostraban inmunorreactividad para marcadores de la proliferación celular. En contraste, las células transformadas que sobreexpresaban p16^{INK4a} mostraban un control desregulado de la proliferación celular y no respondían a un nivel elevado de p16^{INK4a} con un cese de la proliferación. De esta manera, estas células displásicas muestran una expresión simultánea de p16^{INK4a} y marcadores de la proliferación celular. Los inventores encontraron de esta manera que una detección simultánea de p16^{INK4a} y marcadores de la proliferación celular podría servir para discriminar las células displásicas de células detenidas que sobreexpresaban p16^{INK4a}, tales como, por ejemplo, las células metaplasias.

El descubrimiento de que p16^{INK4a} sobreexpresado en diversas displasias también puede detectarse en algunas otras células no displásicas condujo a los inventores del método presentado a establecer una técnica para discriminar entre células positivas para p16^{INK4a} no displásicas y células displásicas que sobreexpresan p16^{INK4a}, basándose en las características de proliferación de las células respectivas. Mientras que en las células controladas normalmente p16^{INK4a} inhibe cdk4 y de esta manera inhibe la proliferación celular, esto no es cierto para las células displásicas. De esta manera, en las células displásicas p16^{INK4a} no conduje a una inhibición de la proliferación celular a pesar de su nivel de expresión excepcionalmente alto.

El método dado a conocer en la presente memoria se basa en el hecho de que las células displásicas pueden discriminarse de las células que muestran una proliferación celular controlada normalmente a partir de la detección simultánea de un producto del gen *INK4a*, tal como, por ejemplo, p16^{INK4a} con un marcador característico de la proliferación celular.

El término marcador, así como moléculas marcadoras en general, se utilizan en la presente memoria en referencia a los productos de expresión génica marcadores de la proliferación, así como los productos de expresión del gen *INK4a*.

Las denominaciones proporcionadas en todo el presente texto para los genes pueden referirse en parte a los genes o proteínas tal como se han descubierto en cualquier organismo. En el contexto de la presente invención dicha denominación se referirá al homólogo respectivo de los marcadores indicados en el organismo particularmente en cuestión para un método dado a conocer en la presente memoria. En determinadas realizaciones de la presente invención dicho organismo es un mamífero, y en una realización puede ser un ser humano. De esta manera, en una realización de la presente invención los marcadores mencionados serán los homólogos humanos de los denominados, respectivamente.

Generalmente, en todo el texto la expresión "marcador de proliferación (celular)" en las diversas formas gramaticales se utiliza para referirse a marcadores tanto proteicos como de ácidos nucleicos. En el caso de que en la presente memoria se utilice el nombre de proteína de un marcador, tal como, por ejemplo, "proteína de replicación", esta

utilización debe entenderse metonímicamente y referirse a las moléculas marcadoras tanto de proteína como de ácidos nucleicos codificantes de la proteína particular.

Un marcador útil según la presente invención puede ser cualquier molécula transcrita a partir de un gen o cualquier molécula traducida a partir de dicho transcrito. De esta manera, el producto génico tal como se utiliza en el contexto de la presente invención puede comprender polinucleótidos tales como, por ejemplo, ADN o ARN y polipéptidos tales como proteínas, proteoglicanos, péptidos, etc. El producto o productos de expresión utilizados en el contexto de la presente invención comprenderán cualquier transcrito de un locus génico en dirección directa o inversa, incluyendo cualesquier marcos de lectura y variantes de procesamiento. Los productos de expresión tal como se utilizan en la presente memoria comprenden, de esta manera, cualesquier productos alternativos codificados por los ácidos nucleicos de un locus génico particular.

Los productos génicos codificados por *INK4a* tal como se utilizan en el contexto de la presente invención son cualesquier ARNm transcritos a partir del locus génico *INK4a* o cualquier polipéptido traducido a partir de dicho ARNm. En una realización de la invención, los productos de expresión codificados por el gen *INK4a* pueden mostrar pesos moleculares de entre aproximadamente 5 y 40 kDa o cualquier valor comprendido entre ellos y preferentemente de entre aproximadamente 10 y 20 kDa o cualquier valor comprendido entre ellos, y más preferentemente entre aproximadamente 14 y aproximadamente 19 kDa, o cualquier valor comprendido entre ellos, respectivamente.

Los productos del gen *INK4a* adecuados para el método según la presente invención pueden comprender, por ejemplo, productos génicos tales como, por ejemplo, p16^{INK4a} y p14ARF.

La expresión "marcador de proliferación (celular)" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención comprende cualquier molécula marcadora que es conocido de la técnica que es característica del estado de proliferación de las células. El estado de proliferación puede ser, por ejemplo, un estado de células activamente en proliferación, de proliferación celular retardada de proliferación celular detenida, de células senescentes, de células terminalmente diferenciadas, de apoptosis, etc. En una realización de la invención, el marcador de proliferación celular es una molécula marcadora característica de la proliferación celular activa. En otra realización de la invención, la molécula marcadora de la proliferación puede ser una molécula característica de células detenidas, terminalmente diferenciadas, senescentes o apoptóticas.

En determinadas realizaciones, los marcadores de proliferación para la utilización en el contexto de la presente invención pueden comprender genes participantes en la replicación del ADN, tales como, por ejemplo, proteínas del complejo de preinicio o de la horquilla de replicación. Dichas moléculas pueden comprender, por ejemplo, helicasas, tales como la helicasa eucariótica o las proteínas MMC (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 y MCM7), la proteína TP tal como se da a conocer en las patentes WO n° 0050451 y n° 0217947 (también denominada HELAD1, Pomfil2 ó Unc-53), las quinasas o fosfatasa participantes en el proceso de la replicación, tales como, por ejemplo, las proteínas quinasas CDC6 y CDC7, Dbf4, la proteína fosfatasa CDC14, CDC45 y MCM10. Además, los marcadores de proliferación pueden comprender proteínas implicadas en la horquilla de replicación procesiva, tales como, por ejemplo PCNA o la ADN polimerasa delta, la proteína de replicación A (RPA), el factor de replicación C (RFC) y FEN1.

En otras realizaciones, los marcadores de proliferación pueden comprender moléculas necesarias para el mantenimiento de la proliferación celular, tales como Ki67, Ki-S5 ó Ki-S2. En la presente realización, las proteínas pueden encontrarse presentes, por ejemplo, durante la totalidad del ciclo celular. Resultan útiles para poner en práctica el método según la presente invención con la condición de que sean características de la proliferación celular activa y no se expresen significativamente en los estados detenido, terminalmente diferenciado, apoptótico o senescente de las células. Ki67, Ki-S2 y Ki-S5 tal como se utilizan en la presente memoria se referirán a las moléculas proteicas marcadoras detectadas por los anticuerpos respectivos, así como a los ácidos nucleicos codificantes de dichos antígenos.

En otra realización, los marcadores de la proliferación celular para la utilización en un método según la presente invención pueden ser una molécula marcadora característica de la proliferación celular retardada o detenida, tales como, por ejemplo, un marcador de senescencia, un marcador de detención del ciclo celular, un marcador característico de células terminalmente diferenciadas o un marcador de apoptosis. Dichas moléculas comprenden, por ejemplo, p21, p27, caspasas, BAD, CD95, ligando Fas, proteínas PARP, etc.

La discriminación tal como se utiliza en el contexto de la presente invención comprende una evaluación de si una muestra debe clasificarse de una manera u otra. En una realización de la invención, la discriminación se refiere a la evaluación de si un tejido o componentes del mismo es displásico o no. De esta manera, la discriminación tal como se utiliza en la presente memoria es un juicio sobre las propiedades de crecimiento de las células en una muestra biológica.

En una forma de realización de la presente invención, la discriminación comprende la detección de la expresión de un producto del gen *INK4a* simultáneamente a la detección de la expresión de un marcador característico de la proliferación celular activa. En este caso, las células que coexpresan ambas moléculas marcadoras deben clasificarse como displásicas.

En otra realización de la presente invención la discriminación comprende la detección de un producto del gen *INK4a* simultáneamente a la detección de la expresión de un marcador característico de la proliferación celular detenida o parada o retardada. En este caso, las células que coexpresan ambas moléculas marcadoras deben clasificarse como no displásicas.

En determinadas realizaciones de la presente invención resultará útil detectar la presencia o ausencia y/o el nivel de más de dos moléculas marcadoras. En una realización, se detecta un producto de expresión del gen *INK4a* concertadamente con dos o más marcadores de la proliferación celular. Esto puede resultar útil para incrementar la identificación de las propiedades de proliferación de las células expresantes del producto del gen *INK4a* en las muestras. Algunos marcadores de proliferación se encuentran restringidos a etapas específicas del ciclo celular o se encuentran presentes en baja abundancia en las células. Debido a este hecho, en algunos casos la detección de células proliferantes que expresan productos del gen *INK4a* puede mejorarse mediante la detección de dos o más marcadores de proliferación. En estos casos, por ejemplo un marcador expresado durante el ciclo celular proliferativo completo, puede detectarse simultáneamente a marcadores que son característicos de etapas específicas del ciclo celular. Por ejemplo, Ki67, Ki-S5 ó Ki-S2 pueden detectarse conjuntamente con mcm5, mcm2, PCNA, rPA, rFC, etc. En otros casos, por ejemplo proteínas participantes en la replicación del ADN, pueden detectarse conjuntamente con Ki67, Ki-S5 ó Ki-S2. En todavía otro caso, Ki67 puede detectarse conjuntamente con Ki-S2. Debe entenderse que estos ejemplos pretenden ejemplificar las posibilidades combinatoriales y que no son exhaustivos, de manera que diversas otras combinaciones de marcadores de proliferación de manera similar resultan útiles y adecuadas en el procedimiento del método según la presente invención.

Según sea el caso, la combinación de dos o más moléculas marcadoras de la proliferación celular puede aplicarse para un método tal como se da a conocer en la presente memoria. En otra realización, dos o más moléculas marcadoras que son detectables en tramos más amplios del ciclo celular o incluso en el ciclo celular completo pueden detectarse concertadamente en un método tal como el dado a conocer en la presente memoria. Una combinación de más de una molécula marcadora de la proliferación celular puede resultar útil de manera general para mejorar la sensibilidad de la detección de las características de proliferación de las células.

En determinadas realizaciones de la presente invención una combinación puede comprender además otras moléculas marcadoras, tales como moléculas marcadoras de senescencia, marcadores de células detenidas, marcadores de células terminalmente diferenciadas, marcadores de células apoptóticas, marcadores de infección vírica o de actividad vírica en células o proteínas reguladoras del ciclo celular como marcadores. En determinadas realizaciones en relación a las displasias asociadas a la infección por el VPH, la detección de las moléculas marcadoras asociadas al VPH o los marcadores de actividad vírica pueden resultar útiles para la detección de una displasia. Los métodos útiles para la detección de la infección por VPH en muestras son conocidos por el experto en la materia. Estos métodos pueden comprender métodos que utilizan sondas específicas para agentes VPH o pueden utilizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. La detección de una infección vírica puede llevarse a cabo simultánea o posteriormente a la detección del *INK4a* y de las moléculas marcadoras de la proliferación.

El término displásico utilizado en el contexto de la presente invención se refiere a las displasias leves a severas y sus estadios precursores, así como el carcinoma, tal como los carcinomas *in situ* o los carcinomas invasivos y las células tumorales diseminadas. De esta manera, displásico tal como se utiliza en la presente memoria también comprende estadios tempranos y precursores de displasias y carcinomas.

Las células que sobreexpresan los productos del gen *INK4a* sin ser displásicas (no displásicas tal como se utiliza en la presente memoria) tal como se indican en la presente memoria pueden comprender, por ejemplo, células metaplásicas, células senescentes, células terminalmente diferenciadas o células que en determinadas etapas del ciclo celular muestran niveles elevados de los productos del gen *INK4a*. En determinadas células, los niveles elevados de los productos del gen *INK4a* incluso pueden producirse como respuesta a señales externas, tales como hormonas, transmisores, etc. En una realización de la presente invención, entre las células no displásicas que sobreexpresan los productos del gen *INK4a* se incluyen, por ejemplo, las células metaplásicas, las células endometriales, etc.

El método de detección del nivel de expresión de los productos génicos codificados por *INK4a* y/o los productos génicos de marcador de proliferación según la presente invención, es cualquier método que puede (aunque no necesariamente) resultar adecuado, por ejemplo, para detectar cantidades incluso muy pequeñas de moléculas biológicas específicas en muestras biológicas. La reacción de detección según la presente invención es una detección al nivel de ácidos nucleicos o al nivel de los polipéptidos.

Se dice que una molécula marcadora es detectable tal como se utiliza en el contexto de la presente invención en el caso de que el marcador pueda detectarse durante el curso de un procedimiento de detección adecuado tal como, por ejemplo, la hibridación *in situ*, la tinción inmunoquímica, un ensayo de captura híbrida, etc. El nivel de expresión de una molécula marcadora puede hacerse detectable utilizando reacciones informadoras adecuadas, tales como, por ejemplo una tinción inmunoquímica cromogénica o basada en fluorescencia o un procedimiento de hibridación *in situ* para el análisis microscópico o automatizado. Pueden aplicarse métodos adecuados para incrementar la señal informadora conocidos por el experto en la materia durante el curso de un método según la presente invención. De esta manera, se dice que el marcador es detectable en el caso de que la tinción supere la tinción de fondo respectiva obtenida inherentemente en el procedimiento de tinción inmunoquímica de manera que se produzcan resultados de tinción significativos.

Las moléculas marcadoras pueden detectarse utilizando reactivos que reconocen específicamente dichas moléculas. La reacción de detección de los productos génicos INK4a y/o los productos génicos marcadores de proliferación pueden comprender una o más reacciones con agentes detectores que reconocen las moléculas marcadoras iniciales o que reconocen las moléculas anteriormente indicadas utilizadas para reconocer otras moléculas.

En determinadas realizaciones de la presente invención, pueden utilizarse dos o más sondas para la detección de una molécula marcadora individual. Por ejemplo, pueden utilizarse dos o más agentes de unión diferentes (por ejemplo anticuerpos) o sondas oligonucleótidas dirigidas contra una molécula marcadora individual (ya que pueden dirigirse contra epítomos o secuencias diferentes) durante el curso del método tal como se da a conocer en la presente memoria.

La detección de los diferentes productos génicos puede llevarse a cabo en un recipiente de reacción o contaminante o en diferentes recipientes, simultánea o sucesivamente en el tiempo. De esta manera, los diferentes productos génicos pueden detectarse simultáneamente en una célula que coexpresa ambos productos. Alternativamente pueden utilizarse células que coexpresan los productos génicos para una reacción de detección separada (separada en el espacio o en el tiempo) para detectar cada marcador individual en las células. En otra realización pueden utilizarse células que expresan uno u otro marcador. La detección de las moléculas marcadoras en las diferentes células también puede llevarse a cabo simultánea o separadamente en el tiempo y/o en el espacio.

La reacción de detección puede comprender además una reacción informadora que indica la presencia o ausencia y/o el nivel de los productos génicos de la molécula informadora. La reacción informadora puede ser, por ejemplo, una reacción que produzca un compuesto de color, una reacción de bioluminiscencia, una reacción de fluorescencia, generalmente una reacción emisora de radiación, etc.

En determinadas realizaciones, diferentes moléculas marcadoras pueden ser reconocidas por agentes que producen diferentes señales informadoras, de manera que pueden distinguirse las señales procedentes de las moléculas marcadoras. En una realización preferente de la invención, la detección de la expresión de dos o más productos génicos INK4a y/o de marcador de proliferación se lleva a cabo simultáneamente. En este caso, la reacción informadora puede utilizar, por ejemplo, diferentes marcapos fluorescentes para las diferentes moléculas detectadas.

Sin embargo, dentro del contexto de la presente invención, no se contesta necesariamente a la pregunta de si se expresa en las células uno u otro marcador de proliferación o producto génico marcador INK4a. En determinadas realizaciones la cuestión es si se expresa algún marcador de proliferación y/o producto génico INK4a. De esta manera, durante el curso de los experimentos puede seleccionarse un procedimiento que proporcione la misma señal de fluorescencia como indicación de la presencia de un marcador de proliferación. Este procedimiento resulta adecuado para mejorar la sensibilidad de detección de las características de proliferación celular (diferentes marcadores característicos de la proliferación celular activa). Del mismo modo, el procedimiento puede aplicarse para producir tres, cuatro o incluso más moléculas marcadoras que sean características de la proliferación celular. Análogamente, lo mismo puede ser cierto bajo determinadas circunstancias para los productos de expresión del gen *INK4a*. Debe entenderse que pueden ser deseables diferentes señales de tinción para diferentes moléculas marcadoras de proliferación. Pueden aplicarse los procedimientos a las necesidades del experimento respectivo.

En determinadas realizaciones de la presente invención puede detectarse una combinación de dos o más (por ejemplo dos diferentes) productos génicos INK4a con una combinación de uno o más, por ejemplo un conjunto de dos, un conjunto de tres, un conjunto de cuatro, un conjunto de cinco o un conjunto de todavía más marcadores de la proliferación celular. La detección de las moléculas marcadoras de la proliferación celular puede producir únicamente una señal informadora. En otros casos, cada marcador individual de la proliferación celular puede producir una señal informadora específica o grupos de moléculas marcadoras pueden producir señales informadoras específicas.

Las señales para la indicación de la presencia de inmunorreactividad pueden ser señales cromogénicas producidas mediante diversos métodos conocidos de la técnica. Alternativamente, o incluso en combinación, pueden utilizarse

señales fluorescentes. Las señales informadoras adecuadas comprenden marcajes fluorescentes, tales como fluoresceína, rodamina, etc.

Los formatos aplicables para la reacción de detección según la presente invención pueden ser técnicas de transferencia, tales como la transferencia western, la transferencia southern, la transferencia northern, y los procedimientos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos. Las técnicas de transferencia son conocidas por el experto ordinario en la materia y pueden llevarse a cabo, por ejemplo, electrotransferencias, transferencias semisecas, transferencias en vacío o transferencias por puntos. Los procedimientos de tinción inmunocito/histoquímica son conocidos por el experto en la materia y pueden comprender la detección mediada por agentes de unión de polipéptidos, así como técnicas de hibridación *in situ*. Ambas técnicas diferentes pueden incluso aplicarse simultáneamente. En determinadas realizaciones puede utilizarse la captura híbrida de ácidos nucleicos para la detección. La reacción de amplificación también puede aplicarse a la detección de, por ejemplo, moléculas de ácidos nucleicos.

En una realización de la invención, la detección del nivel de *INK4a* y/o de productos génicos marcadores de proliferación se lleva a cabo mediante la detección de los ácidos nucleicos respectivos (por ejemplo ARNm) o fragmentos de los mismos presentes en la muestra. Los medios para la detección de moléculas de ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la materia. El procedimiento de detección de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una reacción de unión de la molécula que debe detectarse a sondas de ácidos nucleicos complementarias, a proteínas con especificidad de unión para los ácidos nucleicos o cualesquiera otras entidades que reconozcan y se unan específicamente a dichos ácidos nucleicos. En una realización puede utilizarse la hibridación *in situ* de sondas oligonucleótidas a ácidos nucleicos en una sonda, para la detección de productos de expresión o marcadores.

Las sondas tal como se utilizan en el contexto de la presente invención pueden ser cualesquiera agentes que se unan específicamente a una molécula. En el caso de los ácidos nucleicos, una sonda puede ser un oligonucleótido que se hibride a una secuencia particular. En una realización la sonda puede ser, por ejemplo, un cebador. En el caso de la detección de polipéptidos o proteínas, la sonda tal como se utiliza en la presente memoria puede ser, por ejemplo, un agente de unión, tal como un anticuerpo. En determinadas realizaciones de la presente invención, las sondas pueden marcarse detectablemente. El marcaje puede seleccionarse de entre el grupo que comprende un isótopo radioactivo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico o un enzima. Pueden aplicarse sondas en cualquier procedimiento de detección conocido del arte, por ejemplo durante el curso de un procedimiento de hibridación *in situ*, durante el curso de ensayos de captura híbrida, durante el curso de una reacción de tinción inmunológica, durante el curso de técnicas de transferencia, etc.

Dicho método puede llevarse a cabo además *in vitro*, tal como directamente *in situ*, por ejemplo durante el curso de una reacción de tinción de detección. Otra manera de detectar los ARNm marcadores en una muestra llevada a cabo en el método según la presente invención es una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que puede llevarse a cabo de una manera cuantitativa, tal como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa. En una realización preferente de la presente invención puede utilizarse la PCR-RT en tiempo real para cuantificar el nivel de los ARNm marcadores en muestras de displasias o tumores (muestras de células o tejidos).

En otra realización preferente de la invención, la detección del nivel de *INK4a* y/o de los productos génicos marcadores de proliferación se lleva a cabo determinando el nivel de expresión de una proteína o fragmentos de la misma. La determinación del producto génico marcador sobre el nivel de proteína puede llevarse a cabo, por ejemplo, en una reacción que comprende un agente de unión específico para la detección del polipéptido marcador particular.

Los agentes de unión pueden utilizarse en muchas técnicas de detección diferentes, por ejemplo en una transferencia western, ELISA o inmunoprecipitación. Generalmente la detección basada en un polipéptido agente de unión puede llevarse a cabo tanto *in vitro* como directamente *in situ*, por ejemplo durante el curso de una reacción de tinción inmunológica. Puede utilizarse cualquier otro método para determinar la cantidad de polipéptidos particulares en muestras biológicas según la presente invención.

Los procedimientos inmunocitoquímicos de obtención de imágenes para la utilización en el contexto de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, la tinción de preparaciones citológicas o histológicas con pigmentos cromogénicos o fluorescentes. La tinción puede comprender, por ejemplo, la unión de las moléculas que deben detectarse con un primer agente de unión, que a su vez se detecta con un agente de unión secundario, el cual puede marcarse. El primer agente de unión puede ser, en determinadas realizaciones, un ácido nucleico o un agente de unión a proteína (por ejemplo un anticuerpo) y el agente de unión secundario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo secundario que reconozca el primer agente de unión.

Pueden aplicarse cualesquiera de los métodos conocidos de la técnica para la realización de tinciones citoquímicas o histoquímicas, durante el curso de un método según la presente invención.

Los agentes de unión utilizados en el contexto de la presente invención para la detección del nivel de polipéptidos INK4a, tales como los polipéptidos p16^{INK4a} o p14ARF y los polipéptidos marcadores de proliferación tales como, por ejemplo, mcm5, mcm2, Ki67, Ki-S5, PCNA o Ki-S2, pueden comprender anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno, anticuerpos híbridos bifuncionales, peptidomiméticos que contienen epítopos de unión a antígeno mínimos, anticulinas (anti-calinaTM), etc.

Se entiende que un anticuerpo o agente de unión a antígeno reacciona específicamente en el caso de que reaccione a un nivel detectable con una proteína dada a conocer en la presente memoria y no reaccione significativamente con otras proteínas. Los anticuerpos que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término anticuerpo o anticuerpo monoclonal pretende incluir moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpo. Además, entre los anticuerpos que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención se incluyen los anticuerpos quiméricos, los de cadena sencilla y los anticuerpos humanizados.

Según la presente invención pueden utilizarse agentes de unión aislados o en combinación. Mediante la combinación resulta posible alcanzar un grado más elevado de sensibilidad. El término anticuerpo preferentemente se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente de anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como diferentes preparaciones de anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de fragmentos del polipéptido de la invención que contienen fragmentos utilizando cualquiera de entre una diversidad de técnicas conocidas por el experto ordinario en la materia; ver, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En una de dichas técnicas, un inmunógeno que comprende el polipéptido antigénico o una parte sintética del mismo inicialmente se inyecta en cualquiera de una amplia diversidad de mamíferos (por ejemplo ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras). En esta etapa, los polipéptidos de la presente invención pueden servir como inmunógeno sin modificación. Alternativamente, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, puede inducirse una respuesta inmunológica superior en el caso de que el polipéptido se una a una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino o hemocianina de lapa americana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferentemente siguiendo un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. A continuación pueden purificarse anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido a partir de dichos antisueros mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad, utilizando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Dentro del contexto de la presente invención no resulta necesario contestar a la cuestión de si se expresa en las células uno u otro marcador de proliferación. En determinadas realizaciones, la cuestión principal puede ser si se expresa algún marcador de proliferación. De esta manera, durante el curso de los experimentos se seleccionó un procedimiento que proporcionaba la misma señal de fluorescencia a modo de indicación de la presencia de un marcador de proliferación. Este procedimiento resulta adecuado para mejorar la sensibilidad de la detección de las características de proliferación celular. El procedimiento puede aplicarse a proporcionar una señal detectable para tres, cuatro o incluso más moléculas marcadoras que son características de la proliferación celular. Análogamente, lo mismo puede ser cierto bajo determinadas circunstancias para los productos de expresión del gen *INK4a*. Debe entenderse que pueden resultar deseables diferentes señales de tinción para diferentes moléculas marcadoras de proliferación. Los procedimientos pueden aplicarse a las necesidades del experimento respectivo.

Los productos del gen *INK4a* y/o productos génicos marcadores de proliferación pueden según la presente invención detectarse simultáneamente. En el presente contexto, simultáneamente según la presente invención se refiere literalmente al mismo instante o a dentro del mismo procedimiento de ensayo, de manera que las etapas de detección individuales son temporalmente consecutivas.

El procedimiento de detección según la presente invención puede comprender además un procedimiento de tinción citoquímica que produce una tinción cromogénica o fluorescente de las células o comportamientos celulares. Dichos procedimientos de tinción son conocidos por el experto en la materia y pueden comprender, por ejemplo, la tinción para estructuras acidofílicas o basofílicas de regiones subcelulares (por ejemplo el núcleo, las mitocondrias, los Golgi, el citoplasma, etc.) de moléculas específicas (los cromosomas, de lípidos, de glucoproteínas, de polisacáridos, etc.) en los especímenes citológicos. Pueden utilizarse pigmentos fluorescentes, tales como DAPI, quinacrina, cromomicina, etc. Además, pueden aplicarse pigmentos cromogénicos, tales como azán, naranja de acridina, hematoxilina, eosina, rojo Sudán, tinciones tiazina (azul de toluidina, tionina). En otras realizaciones, pueden utilizarse procedimientos de tinción tales como la tinción Pap, la tinción Giemsa, la tinción de hematoxilina-eosina, la tinción de van-Gieson, la tinción de Schiff (utilizando el reactivo de Schiff), procedimientos de tinción que utilizan la precipitación de metales (tales como, por ejemplo, de plata en procedimientos de tinción que utilizan nitrato de plata) o tinciones insolubles tales como, por ejemplo, azul de Turnbull (u otros cianuros metálicos

insolubles), durante el curso de un método dado a conocer en la presente memoria. Debe entenderse que los pigmentos y métodos de tinción indicados son ejemplos de los métodos aplicables y que puede aplicarse a un método tal como se da a conocer en la presente memoria cualquier otro método conocido de la técnica.

Los procedimientos de tinción pueden producir tinciones cromogénicas para la inspección mediante microscopía óptica o tinciones fluorescentes para la inspección bajo condiciones de microscopía de fluorescencia. En otra realización de la presente invención pueden utilizarse para un método según la presente invención procedimientos con sustancias que alteran la transmisión de la radiación u otros medios de contraste para la obtención de imágenes de las condiciones citológicas en una muestra (por ejemplo la generación de impresión óptica por medios tales como la generación de imágenes (micro)autorradiográficas o (micro)radiográficas.

Todos los procedimientos de tinción y obtención de imágenes pueden utilizarse para el análisis no sólo en procedimientos de microscopía sino también en procedimientos de análisis automatizado, tales como la citometría de flujo, el análisis de microscopía automatizado (computerizado o asistido por ordenador) o cualquier otro método de análisis de especímenes citológicos teñidos.

El análisis de los resultados de tinción u obtención de imágenes de los diferentes procedimientos puede llevarse a cabo en una única etapa de análisis o en diferentes etapas posteriores. Por ejemplo, la inspección mediante microscopía óptica de un espécimen puede llevarse a cabo antes o después de la inspección mediante microscopía de fluorescencia del espécimen. En la microscopía de fluorescencia los análisis de diferentes tinciones con diferentes longitudes de onda de excitación puede ser análisis simultáneos o sucesivos. Pueden utilizarse otros métodos de obtención de imágenes simultáneamente o posteriormente a los procedimientos indicados.

Pueden darse diversas circunstancias bajo las que las combinaciones de diferentes métodos de tinción resultarán adecuadas. Por ejemplo, en casos en los que no puedan conseguirse resultados de tinción citológica satisfactorios mediante la tinción inmunquímica, la aplicación adicional de técnicas generales de tinción citológica puede resultar adecuada.

Una muestra según el método de la presente invención puede comprender cualquier muestra que comprenda células. Las muestras pueden comprender, por ejemplo, secreciones, frotis, líquidos corporales y muestras de células o tejidos.

En una realización de la presente invención, las muestras comprenden células del tracto anogenital, del tracto respiratorio o de la piel y sus apéndices. En determinadas realizaciones, las células pueden ser células del cérvix uterino, la vagina, la vulva, el pene, el ano, el recto, el árbol bronquial, el pulmón, el peritoneo, el espacio peritoneal, el espacio nasofaríngeo, la cavidad oral o la piel. En determinadas realizaciones de la presente invención, la muestra puede ser una muestra histológica, una biopsia, o una muestra citológica, tal como, por ejemplo, un frotis, una obtenida con un hisopo, un lavado, un líquido corporal que contiene células (esputo, una secreción, saliva, etc.). En determinadas realizaciones de la presente invención las muestras pueden comprender células infectadas por el virus del papiloma. Las muestras pueden comprender en determinadas realizaciones frotis cervicales, lavados bronquioalveolares, etc.

En determinadas realizaciones especiales de la presente invención la muestra puede prepararse en forma de una monocapa o preparación de capa fina de un espécimen citológico. Los métodos respectivos para la preparación de monocapas o la preparación de capas finas en citología son conocidos por el experto en la materia. En una realización, la preparación puede comprender, por ejemplo, la tecnología ThinPrep. Otros métodos comprenden frotis convencionales, o un método que utiliza suspensiones de células para la preparación de los especímenes citológicos.

La preparación de una muestra puede comprender, por ejemplo, obtener una muestra de un tejido, de un líquido corporal, de células de un paciente. Según la presente invención, la preparación de la muestra puede comprender además varias etapas de preparación posterior de la muestra, tales como la preparación de disecciones, la preparación de suspensiones celulares, la extensión o aplicación de las células que deben examinarse sobre portaobjetos de microscopía, la preparación de matrices de tejidos, el aislamiento de polipéptidos o ácidos nucleicos, la preparación de péptidos o ácidos nucleicos fijos sobre una fase sólida o la preparación de perlas, membranas o portaobjetos a los que las moléculas que deben determinarse pueden acoplarse covalente o no covalentemente.

En determinadas realizaciones de la presente invención el método puede llevarse a cabo de una manera automática. La automatización del método puede conseguirse mediante la tinción automatizada y el análisis de especímenes histológicos o citológicos sobre una superficie sólida por medios microscópicos. En otra realización, la automatización puede comprender un análisis de citometría de flujo de la tinción de las células en solución.

Las lesiones displásicas a las que puede aplicarse el método según la presente invención comprenden cualesquiera lesiones displásicas caracterizadas por la sobreexpresión de productos del gen *INK4a*, tales como, por ejemplo,

p16^{INK4a} o p14ARF. En determinadas realizaciones, dichas lesiones son displasias asociadas a infecciones por virus del papiloma, tales como, por ejemplo, VPH. En una realización, el VPH puede ser un subtipo del VPH de alto riesgo, tal como VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66, VPH68, etc. En una realización, las lesiones displásicas que pueden detectarse según la presente invención comprenden lesiones anogenitales, lesiones del tracto respiratorio, lesiones de la cabeza y el cuello o lesiones de la piel y sus apéndices. Dichas lesiones pueden comprender, por ejemplo, displasias del ano o recto, de la vulva, de la vagina, del cérvix o del pene, del árbol bronquial, de pulmón, de la cavidad oral o del espacio nasofaríngeo.

Otro aspecto de la presente invención es un kit de ensayo para poner en práctica el método según la presente invención. El kit puede ser, por ejemplo, un kit diagnóstico o un kit de investigación.

Un kit según la presente invención comprende por lo menos un agente adecuado para detectar los productos génicos INK4a. De esta manera, un kit según la presente invención comprende por lo menos una o más sondas para la detección de la presencia o ausencia y/o el nivel de sobreexpresión de por lo menos un producto génico INK4a y por lo menos un producto génico marcador de la proliferación celular en muestras biológicas, en el que los componentes del kit facilitan la detección simultánea de por lo menos un producto génico INK4a y por lo menos un producto génico marcador de la proliferación celular en una sola célula dentro de las muestras biológicas, y en el que se generan por lo menos dos señales detectables distinguibles, siendo indicativa por lo menos una señal detectable del nivel de expresión de por lo menos un producto génico INK4a y siendo indicativa por lo menos otra señal detectable, del nivel de expresión de por lo menos un gen marcador de proliferación celular, y en el que las sondas son: a) uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra polipéptidos codificados por *INK4a* o fragmentos de los mismos y uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra polipéptidos codificados marcadores de la proliferación celular o fragmentos de los mismos, o b) uno o más ácidos nucleicos específicamente hibridantes de productos génicos INK4a y uno o más ácidos nucleicos específicamente hibridantes de los productos génicos marcadores de la proliferación celular.

Los reactivos para la detección de los productos génicos marcadores pueden incluir cualquier agente capaz de unión a los productos génicos marcadores. Entre dichos reactivos pueden incluirse proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, péptido ácidos nucleicos, glucoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos o lípidos.

El producto génico INK4a y muestras de producto génico marcador de la proliferación para llevar a cabo un control positivo pueden comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos en forma aplicable, tales como solución o sal, péptidos en forma aplicable, muestras de sección de tejidos o células positivas.

En una realización preferente de la invención, la detección de los productos génicos marcadores se lleva a cabo al nivel de los polipéptidos. En la presente realización, los agentes de unión pueden ser, por ejemplo, anticuerpos específicos para los productos génicos marcadores o fragmentos de los mismos.

En otra realización del kit de ensayo, la detección de los productos génicos marcadores se lleva a cabo al nivel de los ácidos nucleicos. En la presente realización de la invención, el reactivo para la detección puede ser, por ejemplo, una sonda de ácidos nucleicos o un cebador inversamente complementario a dichos ácidos nucleicos marcadores.

De esta manera, el problema que debía resolverse era proporcionar un método para discriminar entre células displásicas y otras células que no presentan potencial de crecimiento maligno. El método puede aplicarse en cualquier etapa de las displasias y puede resultar especialmente útil en etapas tempranas, cuando los métodos diagnósticos citológicos basados en la sobreexpresión de p16^{INK4a} requieren información adicional para la identificación de las células metaplásicas.

Además, la presente invención proporciona un kit para poner en práctica el método según la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: tinción fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 1 muestra la tinción de una displasia severa que utiliza anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}; para los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunoreactividad para p16^{INK4a} produce fluorescencia verde. Prácticamente la totalidad de las células de la lesión se tiñen difusamente positivas en el citoplasma y en los núcleos.

Figura 2: tinción fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 2 muestra la tinción de una displasia severa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67; para los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunoreactividad para Ki67 produce fluorescencia roja. Muchas células de la displasia muestran positividad nuclear para Ki67.

Figura 3: tinción doble fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 3 muestra la tinción de una displasia severa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67 y aquellos dirigidos contra p16^{INK4a}; para

los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunorreactividad para Ki67 produce fluorescencia roja; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produce fluorescencia verde; la superposición de las fluorescencias roja y verde produce fluorescencia amarilla. Muchas células de la displasia muestran positividad nuclear para Ki67, así como positividad para p16^{INK4a} y de esta manera dan lugar a fluorescencia amarilla.

Figura 4: tinción fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 4 muestra la tinción de una metaplasia escamosa utilizando anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}; para los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produce fluorescencia verde. Algunas células de la metaplasia se tiñen positivas en el citoplasma y en los núcleos.

Figura 5: tinción fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 5 muestra la tinción de una metaplasia escamosa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67; para los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunorreactividad para Ki67 produce fluorescencia roja. Muchas células de la metaplasia escamosa muestran positividad nuclear para Ki67. Las áreas que han sido identificadas como positivamente expresantes de p16^{INK4a} no muestran ninguna tinción positiva para Ki67, indicando falta de expresión del antígeno en estas áreas.

Figura 6: doble tinción fluorescente de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 6 muestra la tinción de una metaplasia escamosa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67 y aquellos dirigidos contra p16^{INK4a}; para los datos experimentales ver el Ejemplo 1; la inmunorreactividad para Ki67 produce fluorescencia roja; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produce fluorescencia verde; la superposición de las fluorescencias roja y verde produce fluorescencia amarilla. Las áreas que expresan positivamente p16^{INK4a} no muestran ninguna tinción positiva para Ki67, indicando falta de expresión del antígeno en estas áreas. Ninguna célula en el espécimen dio lugar a fluorescencia amarilla.

Figura 7: doble tinción cromogénica de un espécimen histológico del cérvix uterino. La figura 7 muestra tinción de una displasia severa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67 y aquellos dirigidos contra p16^{INK4a}; para los datos experimentales ver el Ejemplo 6; la inmunorreactividad para Ki67 produjo tinción nuclear roja; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produjo tinción parduzca en toda la célula; la doble tinción produjo células marrones con núcleos rojos. Muchas células de la displasia muestran positividad nuclear para Ki67, así como positividad para p16^{INK4a} y de esta manera dan lugar a un patrón de células marrones con núcleos rojos.

Figura 8: doble tinción cromogénica de un espécimen citológico del cérvix uterino. La figura 8 muestra la tinción de una displasia severa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67 y aquellos dirigidos contra p16^{INK4a}; para los datos experimentales ver el Ejemplo 7; la inmunorreactividad para Ki67 produjo tinción nuclear roja; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produjo tinción parduzca en toda la célula; la doble tinción produjo células marrones con núcleos rojos. Muchas células de la displasia muestran positividad nuclear para Ki67, así como positividad para p16^{INK4a} y de esta manera dan lugar a un patrón de células marrones con núcleos rojos.

Los ejemplos a continuación se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención dada a conocer en la presente memoria. Con fines ilustrativos, los métodos dados a conocer en la presente memoria se ejemplifican utilizando preparaciones histológicas. Los ejemplos histológicos ayudan a valorar si las células teñidas de una u otra manera deben clasificarse como displásicas o metaplásicas. Los métodos pueden transferirse fácilmente a especímenes citológicos mediante la alteración del protocolo de una manera apropiada. Estas alteraciones son conocidas por el experto ordinario en la materia.

Ejemplo 1: detección inmunofluorescente de la sobreexpresión de p16^{INK4a} y Ki67 en muestras del cérvix uterino (doble tinción)

Unas secciones de muestras de tejido del cérvix uterino fijadas en formalina e incluidas en parafina se tiñeron inmunofluorescentemente utilizando anticuerpos específicos para p16^{INK4a} y Ki67.

Las secciones de tejidos se rehidrataron mediante incubación en xileno y una serie de gradación de etanol, y se transfirieron a agua bidestilada. La recuperación de los antígenos se llevó a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para p16^{INK4a} y Ki67. Por lo tanto, los portaobjetos se calentaron en un baño de agua durante 40 minutos a una temperatura de entre 95°C y 98°C. Los portaobjetos se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos, se transfirieron a tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%/DakoCytomation, nº de código: S3006).

Para evitar la unión no específica del anticuerpo secundario (especie: cabra), los especímenes se incubaron con suero de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios, anticuerpo de ratón anti-p16^{INK4a} humano (3,84 µg/ml) y anticuerpo de conejo anti-Ki67 (1:25) durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguidamente los portaobjetos se enjuagaron con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco

durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y se cubrió cada espécimen con 200 µl del reactivo secundario, que contenía anticuerpo de cabra antirratón, conjugado con AlexaFluor®488 y anticuerpo de cabra anticonejo, conjugado con AlexaFluor®488, y después se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces tal como anteriormente y se montaron directamente con un medio de montaje especial para medir la fluorescencia.

El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que las células eran inmunorreactivas con p16^{INK4a} y al ser inmunorreactivas también con Ki67, pueden encontrarse únicamente en muestras que pueden identificarse microscópicamente como presentes exclusivamente en muestras de lesiones displásicas. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originaban de metaplasias, no se tiñeron mediante la reacción específica para Ki67. La inspección al microscopio de la tinción con marcador de proliferación celular muestra que las células metaplásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} no son inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra Ki67. Las muestras que contenían áreas de tejido displásico en contraste comprendían células que eran inmunorreactivas con Ki67 y con anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}. De esta manera, en contraste con las displasias, en las metaplasias ninguna célula presentaría doble tinción con los anticuerpos específicos de Ki67 y de p16^{INK4a}.

Las figuras 1 a 6 muestran los resultados de tinciones para una displasia severa del cérvix uterino y para una metaplasia escamosa utilizando anticuerpos dirigidos contra Ki67 y aquellos dirigidos contra p16^{INK4a}. La inmunorreactividad para Ki67 produce fluorescencia roja; la inmunorreactividad para p16^{INK4a} produce fluorescencia verde y la superposición de fluorescencias roja y verde produce fluorescencia amarilla. En el espécimen displásico (figs. 1 a 3), muchas células de la displasia muestran positividad nuclear para Ki67, así como positividad para p16^{INK4a} y de esta manera dan lugar a fluorescencia amarilla (ver la figura 3). En contraste, en el espécimen metaplásico (figs. 4 a 6), las áreas que expresan positivamente p16^{INK4a} no muestran ninguna tinción positiva para Ki67, indicando la falta de expresión del antígeno en estas áreas. Puede observarse doble tinción en este espécimen (fig. 6) y, de esta manera, ninguna célula en el espécimen da lugar a fluorescencia amarilla.

Los resultados demuestran que la doble tinción de las células con reactivos específicos para Ki67 permite discriminar las metaplasias sobreexpresantes de p16^{INK4a} de las displasias.

Ejemplo 2: detección de células que coexpresan p14ARF y mcm2 en muestras del cérvix uterino mediante hibridación *in situ*

Los frotis del cérvix uterino pueden analizarse semicuantitativamente para el nivel de ARNm de p16^{INK4a} y mcm2 en una reacción de tinción *in situ*. La reacción de tinción se llevó a cabo de la manera siguiente:

para la rehidratación, los frotis fijados con spray se incubaron en EtOH al 50% fresco en un dispositivo oscilante. La película de PEG producida mediante el procedimiento de fijación se eliminó mediante enjuague intensivo. A continuación, se lavaron los frotis en agua bidestilada. Los frotis se incubaron con proteinasa K (10 µg/ml en PBS) durante 10 minutos a 37°C. Seguidamente, los portaobjetos se transfirieron a tampón de lavado (PBS/Tween20 al 0,1%) y finalmente el área que contenía las células se rodeó con un lápiz lipídico.

La mezcla de hibridación se preparó mediante la mezcla de 50 µl de tampón de hibridación listo para utilizar (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) con aproximadamente 5 a 10 pmoles de las sondas. Las sondas eran oligonucleótidos marcados con biotina y digoxigenina se secuencias complementarias a los ARN respectivos.

La mezcla de hibridación se calentó a 95°C y seguidamente se equilibró a 37°C. Tras el procedimiento de ebullición, los frotis se incubaron con cada 50 µl de la mezcla de hibridación durante 4 horas a 42°C. Las muestras se lavaron en volúmenes en exceso de los tampones de lavado dos veces en 2xSSC a 37°C durante 15 minutos y una vez en 1xSSC a 37°C durante 15 minutos. A continuación, los frotis se enjuagaron dos veces a temperatura ambiente en 2xSSC. Tras este procedimiento de lavado, las disecciones se incubaron durante 30 minutos con tampón de bloqueo (NEN, Blockingbuffer) a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo una incubación de 1 hora con estreptavidina-fosfato alcalina diluida 1:100 (en tampón de bloqueo, ver anteriormente) y con anticuerpos monoclonales de ratón anti-digoxigenina marcados con HRP (Molecular Probes). Seguidamente, los frotis se lavaron 2 veces en 1xPBS/Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una etapa de lavado con 1xPBS, MgCl₂ 50 mM (pH 9,2) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se llevó a cabo la reacción de tinción con fosfato ELF-97 (Molecular Probes) durante 10 segundos a 7 minutos a temperatura ambiente. El exceso de sustrato se lavó 3 veces con 1xPBS/Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. En una segunda etapa de tinción, la sección se incubó con tiramidas-Alexa Fluor594 durante 10 segundos a 7 minutos. El exceso de sustrato se lavó 3 veces con 1xPBS/Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los frotis se sumergieron en H₂O_{dest} y se incluyeron en medio de montaje de fluorescencia (DakoCitomation). A continuación, las disecciones teñidas pueden analizarse mediante microscopía de fluorescencia.

El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que las células positivas para la expresión de p16^{INK4a} y que también expresaban mcm2 únicamente podían encontrarse en muestras identificadas microscópicamente como muestras de lesiones displásicas. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que son identificables como metaplasias no se teñían mediante la reacción específica para mcm2. La inspección al microscopio de la hibridación de ARNm demuestra que las células metaplásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} no expresan significativamente el ARNm de mcm2. En contraste, las células displásicas pueden teñirse mediante hibridación *in situ* con sondas específicas para mcm2 y con sondas dirigidas contra p16^{INK4a}. De esta manera, en contraste con las células displásicas, en las células metaplásicas no se observa doble tinción utilizando las sondas específicas para Ki67 y p16^{INK4a}.

Los resultados demuestran que la doble tinción de las células con reactivos específicos para mcm2 permite discriminar las metaplasias sobreexpresantes de p16^{INK4a} de las displasias.

Ejemplo 3: detección inmunofluorescente de la sobreexpresión de p16^{INK4a} y de Ki-S2 en muestras del cérvix uterino (doble tinción)

Unas muestras citológicas fijadas con Merckofix[®] (frotis convencionales y citologías basadas en líquidos (ThinPreps[®])) del cérvix uterino se tiñeron inmunofluorescentemente utilizando anticuerpos específicos para p16^{INK4a} y Ki-S2.

Los frotis convencionales y las muestras citológicas basadas en líquidos (ThinPreps[®]) se rehidrataron en etanol (al 50%) durante 10 minutos y se transfirieron a agua bidestilada. La recuperación de los antígenos se llevó a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para p16^{INK4a} y Ki67. Por lo tanto, los portaobjetos de calentaron en un baño de agua durante 40 minutos a una temperatura de entre 95°C y 98°C. Los portaobjetos se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos, se transfirieron a tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%/DakoCytomation, código nº S3006) y finalmente las muestras se rodearon con un lápiz lipídico.

Para evitar la unión no específica del anticuerpo secundario (especie: cabra), los especímenes se incubaron con suero de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, los portaobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios, anticuerpo anti-p16^{INK4a} humano (clon E6H4) (3,48 µg/ml) y anticuerpo de conejo anti-Ki-S2 (1:25) durante 30 minutos a temperatura ambiente, los portaobjetos se enjuagaron seguidamente con tampón de lavado y se introdujeron en un baño con tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y el espécimen se cubrió con 200 µl del reactivo secundario, que contenía anticuerpo de cabra antirratón, conjugado con AlexaFluor[®]488 y anticuerpo de cabra anticonejo, conjugado con AlexaFluor[®]546, y después se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron dos veces tal como anteriormente y se montaron directamente con un medio de montaje especial para fluorescencia.

El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que las células inmunorreactivas con p16^{INK4a} y que también eran inmunorreactivas con Ki-S2 podían identificarse microscópicamente como células displásicas. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que no se habían teñido mediante la reacción específica para Ki-S2, podían ser clasificadas por un patólogo experimentado como metaplásicas o de origen endometrial. La inspección al microscopio de la tinción de marcador de proliferación celular demuestra que las células metaplásicas que sobreexpresan p16^{INK4a} no son inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra Ki-S2. En contraste, las células displásicas que son inmunorreactivas con Ki-S2 y con anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}. Por lo tanto, en contraste con las células displásicas, en las metaplasias las células pueden teñirse doblemente utilizando los anticuerpos específicos de Ki-S2 y de p16^{INK4a}.

Los resultados demuestran que la doble tinción de las células con reactivos específicos para Ki-S2 permite discriminar las células metaplásicas sobreexpresantes de p16^{INK4a} de las células displásicas.

Ejemplo 4: detección inmunofluorescente de la sobreexpresión de p16^{INK4a}, Ki67 y PCNA en muestras de lavado bronquioalveolar de individuos con diagnóstico de cáncer pulmonar de células pequeñas (doble tinción)

Las células contenidas en especímenes de lavado bronquioalveolar de pacientes se prepararon según la tecnología Thin-Prep. Unas muestras citológicas fijadas con Merckofix[®] de los lavados de pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar de células pequeñas se tiñeron inmunofluorescentemente utilizando anticuerpos específicos para p16^{INK4a}, Ki67 y PCNA.

En el presente experimento se utilizó un procedimiento que no discrimina entre la tinción originada a partir de la inmunoreactividad contra los dos marcadores de proliferación, PCNA y Ki67. Dentro del contexto de la presente invención no se contesta necesariamente a la cuestión de si se expresa uno u otro marcador de proliferación en las células. La cuestión principal es si se expresa algún marcador de proliferación. De esta manera, durante el curso de los experimentos se seleccionó un procedimiento que proporcionase la misma señal de fluorescencia como

indicación de la presencia de un marcador de proliferación. Este procedimiento resulta adecuado para mejorar la sensibilidad de la detección de las características de proliferación celular. De esta manera, el procedimiento puede aplicarse a la producción de una señal detectable para tres, cuatro o incluso más moléculas marcadoras que son características de la proliferación celular. Análogamente, bajo determinadas circunstancias lo anterior resulta aplicable a los productos de expresión del gen *INK4a*. Debe entenderse que puede resultar deseable que sean diferentes las señales de tinción para diferentes moléculas marcadoras de proliferación. Los procedimientos pueden aplicarse a los requisitos de cada experimento.

Las secciones de tejido se rehidrataron mediante incubación en xileno y una serie de gradación de etanol y se transfirieron a agua bidestilada. Se rehidrataron en etanol (al 50%) frotis convencionales y muestras citológicas basadas en líquido, durante 10 minutos y se transfirieron a agua bidestilada. Se extrajeron los antígenos con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para p16^{INK4a}, Ki67 y PCNA. Por lo tanto, los portaobjetos se calentaron en un baño de agua durante 40 minutos a una temperatura de entre 95°C y 98°C. Los portaobjetos se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos, se transfirieron a tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%/DakoCytomation: código n° S3006) y finalmente las muestras se rodearon con un lápiz lipídico.

Para evitar la unión no específica del anticuerpo secundario (especie: cabra), los especímenes se incubaron con suero de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los portaobjetos seguidamente se incubaron con los anticuerpos primarios, anticuerpo de ratón anti-p16^{INK4a} humano (3,48 µg/ml), anticuerpo de conejo anti-Ki67 y anticuerpo de conejo anti-PCNA (cada uno 1:25) durante 30 minutos a temperatura ambiente; los portaobjetos se enjuagaron seguidamente con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y el espécimen se cubrió con 200 µl del reactivo secundario, que contenía anticuerpo de cabra anticonejo, conjugado con AlexaFluor®488 y anticuerpo de cabra anticonejo, conjugado con AlexaFluor®546, y después se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación los portaobjetos se lavaron dos veces tal como anteriormente y se montaron directamente con un medio de montaje especial para fluorescencia.

El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que las células inmunorreactivas con p16^{INK4a} y que también eran inmunorreactivas con Ki67 ó PCNA podían identificarse microscópicamente como células de cáncer de pulmón de células pequeñas. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originan de metaplasias, no se teñían mediante la reacción específica para Ki67 y PCNA. La inspección al microscopio de la tinción con marcador de proliferación celular muestra que las células metaplásicas sobreexpresantes de p16^{INK4a} no son inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra Ki67 y PCNA. En contraste, las muestras que contenían células displásicas comprendían células que eran inmunorreactivas con Ki67/PCNA y con anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}. Por lo tanto, en contraste con las displasias, en las metaplasias ninguna célula se tiñó triplemente utilizando los anticuerpos específicos para Ki67, PCNA y p16^{INK4a}.

Los resultados demuestran que la triple tinción de las células con reactivos específicos para Ki67/PCNA permite discriminar las células no displásicas sobreexpresantes de p16^{INK4a} de las displasias.

Ejemplo 5: detección mediante citometría de flujo de las células displásicas mediante la detección simultánea de ARNm de mcm5, proteína p14ARF y proteína Ki67 en células de origen cervical

Unas muestras citológicas (suspensiones celulares en PBS, pH 7,4) de cérvix uterino se tiñeron fluorescentemente utilizando anticuerpos específicos para p14ARF y Ki-67 y oligosondas para mcm-5 y se evaluaron mediante análisis FACS fluorescente de tres colores.

Las células se centrifugaron, se decantó el sobrenadante y se fijaron y permeabilizaron con 100 ml de Permeafix (OrthoDiagnostic, Raitan, NJ, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron en PBS estéril, pH 7,4, se peletizaron y se resuspendieron en 100 ml de Permeafix durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron en PBS estéril, pH 7,4, se peletizaron y se resuspendieron en PBS estéril. Se incubaron con anticuerpo anti-p14ARF conjugado con PE y anticuerpo anti-Ki57 conjugado con PE-Cy5 durante 1 hora a +4°C. Las células se lavaron en PBS estéril, pH 7,4, se peletizaron y se resuspendieron en 100 ml de Permeafix durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron en PBS estéril, se peletizaron mediante centrifugación y seguidamente se lavaron nuevamente en 2x solución salina con citrato estándar (SSC). Tras la centrifugación, el pellet celular se resuspendió en solución de hibridación (2x SSC, formamida al 30%, esperma de salmón sonificado, ADN de transferencia de levadura) que contenía 500 ng de 5-carboxi-fluoresceína marcado en los dos extremos, sondas oligonucleótidas específicas para mcm5. La hibridación intercelular se llevó a cabo a 42°C durante 1 hora, seguido de lavados sucesivos en 2x SSC, Triton X-100 al 0,5% y 1x SSC, Triton X-100 al 0,5% a 42°C. Las células se resuspendieron para el análisis en PBS, pH 8,3, y se analizaron en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, IS). Para cada análisis, se recolectaron 30.000 a 100.000 sucesos. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando CellQuest (Becton Dickinson, IS).

El análisis de citometría de flujo reveló que las células inmunorreactivas con p14ARF y que también eran inmunorreactivas con Ki-67 y/o reactivas con las oligosondas de mcm5 únicamente podían identificarse en muestras de pacientes con lesiones displásicas del cérvix. Las muestras procedentes de mujeres sin lesiones displásicas no mostraron tinción concomitante de p14ARF con Ki67 ó mcm5. Los resultados demuestran que la doble o triple tinción de las células con reactivos específicos para Ki67 y/o mcm5 permite discriminar las células no displásicas sobreexpresantes de p14ARF de las células displásicas sobreexpresantes de p14ARF.

Ejemplo 6: detección inmunoenzimática de la sobreexpresión de p16^{INK4a} y Ki67 en muestras histológicas del cérvix uterino (doble tinción secuencial)

Se tiñeron doblemente con tinción inmunoenzimática utilizando anticuerpos específicos para p16INK4a y Ki67 secciones de muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina del cérvix uterino.

Las secciones de tejido se rehidrataron mediante incubación en xileno y una serie de gradación de etanol y se transfirieron a agua bidestilada. La recuperación de los antígenos se llevó a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para p16^{INK4a} y Ki67. Por lo tanto, los portaobjetos se calentaron en un baño de agua durante 40 minutos a una temperatura de entre 95°C y 98°C. Los portaobjetos se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos y se transfirieron a tampón de lavado (DakoCytomation).

Las actividades de peroxidasa endógena se bloquearon con H₂O₂ al 3% (DakoCytomation) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Tras el lavado de los portaobjetos durante 5 minutos a temperatura ambiente, se incubaron con el primer anticuerpo primario, anticuerpo de ratón anti-p16^{INK4a} humano (MTM) durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se enjuagaron con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y se cubrió cada espécimen con 200 µl del reactivo secundario (anticuerpo de cabra antiratón-peroxidasa de EnVision/DakoCytomation) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces tal como anteriormente. Para la visualización cromogénica, se utilizó DAB (DakoCytomation) mediante la incubación de los portaobjetos con el complejo de sustrato-cromógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo en agua desionizada y los portaobjetos se introdujeron en tampón de lavado.

Tras el lavado, los portaobjetos se incubaron con el segundo anticuerpo primario, anticuerpo de conejo anti-Ki67 humano (Dianova, clon Ab-3) durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se enjuagaron con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y cada espécimen se cubrió con 200 µl del reactivo secundario (anticuerpo de cabra anti-conejo-marcado con fosfatasa alcalina/DakoCytomation) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces tal como anteriormente. Para la visualización cromogénica se utilizó FastRed (BioGenex) mediante incubación de los portaobjetos con el complejo de sustrato-cromógeno durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo en agua desionizada.

Tras la contratinción con hematoxilina (DakoCytomation) durante 2 minutos a temperatura ambiente, los portaobjetos se incubaron en agua corriente durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se montaron con medio de montaje acuoso (Aquatex/MERCK).

El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que únicamente podían encontrarse células que eran inmunorreactivas con p16^{INK4a} y además inmunorreactivas con Ki67 procedentes de muestras que podían identificarse microscópicamente como originadas de lesiones displásicas. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originan de metaplasias, no se teñían mediante la reacción específica para Ki67. La inspección al microscopio de la tinción de marcador de proliferación celular mostró que las células metaplásicas sobreexpresantes de p16^{INK4a} no eran inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra Ki67. En contraste, las muestras que contenían áreas de tejido displásico comprendían células que eran inmunorreactivas con Ki67 y con anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}. Por lo tanto, en contraste con las displasias, en las metaplasias ninguna célula se teñía doblemente utilizando los anticuerpos específicos para Ki67 y p16^{INK4a}.

Los resultados proporcionados en la figura 7 muestran que la doble tinción de las células con reactivos específicos para Ki67 y p16INK4a proporciona un patrón de doble tinción específico también en procedimientos de tinción cromogénica.

Ejemplo 7: detección inmunoenzimática de la sobreexpresión de p16^{INK4a} y Ki67 en muestras citológicas del cérvix uterino (doble tinción secuencial)

Las muestras citológicas fijadas con Merckofix® (frotis convencionales y citología basada en líquidos (ThinPreps®)) del cérvix uterino se tiñeron doblemente con tinción inmunoenzimática utilizando los anticuerpos específicos para p16^{INK4a} y Ki67.

- 5 Los frotis convencionales y muestras citológicas basadas en líquidos se rehidrataron en etanol (al 50%) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron a agua bidestilada. La recuperación de los antígenos se llevó a cabo con tampón citrato 10 mM (pH 6,0) para p16^{INK4a} y Ki67. De esta manera, los portaobjetos se calentaron en un baño de agua durante 40 minutos a una temperatura de entre 95°C y 98°C. Los portaobjetos se enfriaron hasta la temperatura ambiente durante 20 minutos y se transfirieron a tampón de lavado.

- 10 Las actividades de peroxidasa endógena se bloquearon con H₂O₂ al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- Tras el lavado, los portaobjetos se incubaron con el primer anticuerpo primario, anticuerpo de ratón anti-p16INK4a humano durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se enjugaron con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y cada espécimen se cubrió con 200 µl del reactivo secundario (anticuerpo de cabra antirratón de EnVision-peroxidasa) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces tal como anteriormente. Para la visualización cromogénica, se utilizó DAB (DakoCytomation) mediante incubación de los portaobjetos con el complejo de sustrato-cromógeno durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo en agua desionizada y los portaobjetos se introdujeron en tampón de lavado.

- Tras el lavado, los portaobjetos se incubaron con el segundo anticuerpo primario, anticuerpo de conejo anti-Ki67 humano (Dianova, clon Ab-3) durante 30 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se enjuagaron con tampón de lavado y se introdujeron en un baño de tampón fresco durante 5 minutos. Se hizo salir el exceso de tampón y cada espécimen se cubrió con 200 µl del reactivo secundario (anticuerpo de cabra anticonejo-marcaje de fosfatasa alcalina/DakoCytomation) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces tal como anteriormente. Para la visualización cromogénica se utilizó Fast Red (BioGenex) mediante incubación de los portaobjetos con el complejo de sustrato-cromógeno durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo en agua desionizada.

- Tras la contratinción con hematoxilina (BakoCytomation) durante 2 minutos a temperatura ambiente, los portaobjetos se incubaron en agua corriente durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se montaron con medio de montaje acuoso (Aquatex/MERCK).

- El examen al microscopio de los portaobjetos reveló que las células inmunorreactivas con p16^{INK4a} y que también eran inmunorreactivas con Ki67 podían identificarse como células displásicas basándose en su morfología. Las células teñidas mediante la reacción específica de p16^{INK4a}, que se originaban de metaplasias, no se teñían mediante la reacción específica para Ki67. La inspección al microscopio de la tinción de marcador de proliferación celular muestra que las células metaplásicas sobreexpresantes de p16^{INK4a} no son inmunorreactivas con los anticuerpos dirigidos contra Ki67. En contraste, las células displásicas son inmunorreactivas con Ki67 y con anticuerpos dirigidos contra p16^{INK4a}. De esta manera, en contraste con las células metaplásicas, en las células displásicas la doble tinción de células individuales puede producirse utilizando los anticuerpos específicos de Ki67 y p16^{INK4a}.

- Los resultados proporcionados en la figura 8 demuestran que la doble tinción de las células con reactivos específicos para Ki67 y p16^{INK4a} proporciona un patrón de doble tinción específico también en procedimientos de tinción cromogénica.

REIVINDICACIONES

1. Método para discriminar las células displásicas que sobreexpresan productos génicos INK4a de otras células que expresan productos génicos INK4a a un nivel detectable en muestras biológicas, seleccionado de entre un grupo que consiste de:
 - a. un método que comprende determinar en un procedimiento de ensayo citológico o histológico la coexpresión de por lo menos dos moléculas marcadoras en por lo menos una célula individual, en el que por lo menos una molécula marcadora es un producto de expresión codificado por el gen *INK4a* y por lo menos una molécula marcadora adicional es un marcador de proliferación celular para la proliferación celular activa, en el que la sobreexpresión de por lo menos un producto génico INK4a y la expresión de por lo menos un marcador para la proliferación celular activa a un nivel detectable dentro de dicha célula individual es indicativa del estado displásico de la célula, y
 - b.. un método que comprende determinar en un procedimiento de ensayo citológico o histológico la coexpresión de por lo menos dos moléculas marcadoras en por lo menos una célula individual, en el que por lo menos una molécula marcadora es un producto de expresión codificado por el gen *INK4a* y por lo menos una molécula marcadora adicional es un marcador de proliferación característico de la proliferación celular retardada o detenida, en el que la sobreexpresión de por lo menos un producto del gen *INK4a* y la expresión de por lo menos un marcador característico de la proliferación celular retardada o detenida a un nivel detectable dentro de dicha célula individual es indicativa del estado no displásico de la célula.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se detecta un conjunto de dos o más marcadores de proliferación celular.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que por lo menos un producto génico INK4a presenta un peso molecular de entre 13 y 19 kDa.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que por lo menos un producto génico INK4a se selecciona de entre un grupo que comprende p16INK4a y p14ARF.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el marcador de proliferación celular para la proliferación celular activa se selecciona de entre un grupo que comprende un marcador de proliferación necesario para el mantenimiento de la proliferación celular, un marcador de proliferación participante en la replicación del ADN y un marcador de proliferación que es o que codifica un miembro de la horquilla de replicación procesiva.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el producto génico necesario para el mantenimiento de la proliferación celular es una molécula seleccionada de entre el grupo que comprende moléculas de Ki67, moléculas de Ki-S5 y moléculas de Ki-S2.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el producto génico participante en la replicación del ADN se selecciona de entre un grupo que comprende helicasas o subunidades de las mismas, moléculas del ciclo de división celular (cdc), moléculas de fosfatasa y moléculas de quinasa.
8. Método según la reivindicación 7, en el que las helicasas o subunidades de las mismas se seleccionan de entre un grupo que comprende MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7 y HELAD1.
9. Método según la reivindicación 7, en el que las moléculas de cdc, las quinasas y las fosfatasas se seleccionan de entre un grupo que comprende proteínas quinasa CDC6 y CDC7, Dbf4, proteína fosfatasa CDC14, CDC45 y MCM10.
10. Método según la reivindicación 5, en el que las moléculas participantes en la horquilla de replicación procesiva se seleccionan de entre un grupo que comprende PCNA y POLD.
11. Método según la reivindicación 1, en el que el marcador característico para la proliferación celular retardada o detenida se selecciona de entre un grupo que comprende un marcador de senescencia, un marcador de detención del ciclo celular, un marcador de apoptosis, p21, p27, caspasas, BAD, CD95, ligando Fas y proteínas Parp.
12. Método según las reivindicaciones 1 a 11, en el que el producto génico es un polipéptido o una molécula de ácidos nucleicos.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que además se detecta por lo menos una molécula marcadora adicional para la mejora de la evaluación del diagnóstico o pronóstico.
14. Método según la reivindicación 13, en el que la molécula marcadora adicional se selecciona de entre un grupo que comprende un marcador de senescencia, un marcador de apoptosis, un marcador de detención del ciclo celular, un marcador de diferenciación terminal de las células, un marcador de infección vírica, un marcador de actividad vírica, una proteína reguladora del ciclo celular, un producto génico necesario para el mantenimiento de la proliferación celular, un producto génico participante en la replicación del ADN y un producto génico que es un miembro de la horquilla de replicación procesiva.
15. Método según la reivindicación 14, en el que el marcador de infección vírica es un marcador de infección por VPH de alto riesgo seleccionado de entre un grupo que comprende VPH16, VPH18, VPH31, VPH33, VPH35, VPH39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se aplica adicionalmente un procedimiento de tinción citológica utilizando por lo menos un pigmento seleccionado de entre un grupo que comprende DAPI, quinacrina, cromomicina, azán, naranja de acridina, hematoxilina, eosina, rojo Sudán, azul de toluidina y tionina, o un método de tinción seleccionado de entre el grupo que comprende la tinción Pap, la tinción Giemsa, la tinción de hematoxilina-eosina, la tinción de van-Gieson, la tinción de Schiff, la tinción con precipitados metálicos, la tinción de azul de Turnbull y la tinción con cianuros metálicos.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células displásicas son células de una lesión cancerosa o precancerosa.
18. Método según la reivindicación 17, en el que la lesión se selecciona de entre un grupo que comprende una lesión del tracto anogenital, una lesión del tracto respiratorio y una lesión de la piel y sus apéndices.
19. Método según la reivindicación 18, en el que la lesión se selecciona de entre un grupo que comprende una lesión del cérvix uterino, una lesión de la vagina, una lesión de la vulva, una lesión del pene, una lesión del ano, una lesión del recto, una lesión del árbol bronquial, una lesión de pulmón, una lesión del espacio peritoneal, una lesión del espacio nasofaríngeo, una lesión de la cavidad oral o una lesión de la piel.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica es una muestra que contiene células, particularmente una preparación citológica o histológica originada en el tracto anogenital, del tracto respiratorio o de la piel y sus apéndices.
21. Método según la reivindicación 20, en el que las células son células originadas en el cérvix uterino, la vagina, la vulva, el pene, el ano, el recto, el árbol bronquial, el pulmón, el espacio nasofaríngeo, la cavidad oral o la piel.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de los productos génicos INK4a y/o las moléculas marcadoras de proliferación celular se lleva a cabo utilizando por lo menos una sonda que reconoce específicamente por lo menos una de las moléculas respectivas que debe detectarse.
23. Método según la reivindicación 22, en el que se marca detectablemente por lo menos una sonda.
24. Método según la reivindicación 23, en el que por lo menos un marcaje se selecciona de entre el grupo que consiste de un isótopo radioactivo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato metálico, un enzima, biotina o digoxigenina.
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que por lo menos una sonda es una proteína y/o un ácido nucleico.
26. Método según la reivindicación 25, en el que por lo menos una sonda es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra un producto génico codificado por INK4a o un producto génico marcador de proliferación celular.
27. Método según la reivindicación 26, que comprende un procedimiento de tinción inmunocitoquímico.
28. Método según la reivindicación 23 ó 24, en el que por lo menos una sonda es un ácido nucleico que se hibrida específicamente con un producto génico INK4a o un producto génico marcador de proliferación celular.

29. Método según la reivindicación 28, que comprende una reacción de detección seleccionada de entre un grupo que comprende: a) una reacción de hibridación *in situ*, y b) una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, particularmente una reacción de amplificación por PCR, NAS-BA o LCR.

5 30. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las reacciones de detección utilizando sondas de ácidos nucleicos y sondas de polipéptidos se llevan a cabo simultáneamente.

31. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un kit diagnóstico o un kit de investigación, que comprende por lo menos una o más sondas para la detección de la presencia o ausencia y/o el nivel de sobreexpresión de por lo menos un producto génico INK4a y por lo menos un producto génico marcador de proliferación celular en muestras biológicas, en el que los componentes del kit facilitan la detección simultánea de por lo menos un producto génico INK4a y por lo menos un producto génico marcador de proliferación celular en una célula individual presente en las muestras biológicas, y en el que se generan por lo menos dos señales detectables distinguibles, siendo indicativa por lo menos una señal detectable, del nivel de expresión de por lo menos un producto génico INK4a y siendo indicativa por lo menos otra señal detectable, del nivel de expresión de por lo menos un gen marcador de proliferación celular, y en el que las sondas son: a) uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra polipéptidos codificados por *INK4a*, o fragmentos de los mismos, y uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra polipéptidos codificados marcadores de proliferación celular, o fragmentos de los mismos, o b) uno o más ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con productos génicos INK4a y uno o más ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con productos génicos marcadores de proliferación celular.

32. Kit según la reivindicación 31, en el que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra los polipéptidos codificados por *INK4a* o fragmentos de los mismos portan un marcaje detectable que es diferente y distinguible del marcaje detectable que portan los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos dirigidos contra los productos génicos marcadores de proliferación.

33. Kit según la reivindicación 31, en el que las sondas de ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con los productos génicos INK4a portan un marcaje detectable que es diferente y distinguible del marcaje detectable que portan las sondas de ácidos nucleicos que se hibridan específicamente con los productos génicos marcadores de proliferación.

34. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en el que los productos génicos INK4a se seleccionan de entre el grupo que comprende p16^{INK4a} y p14ARF.

35. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, en el que los productos génicos marcadores de proliferación celular se seleccionan de entre un grupo que comprende CDC6, MCM3, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, proteína quinasa CDC7, Dbf4, proteína fosfatasa CDC14, CDC45 y MCM10, Ki67, Ki-S2, PCNA o POLD.

36. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, que comprende además por lo menos uno de los siguientes:

- a. una muestra de p16^{INK4a} para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- b. una muestra de p14ARF para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- c. una muestra de Ki67 para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- d. una muestra de Ki-S2 para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- e. una muestra de MCM5 para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- f. una muestra de MCM2 para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- g. una muestra de PCNA para llevar a cabo una reacción de control positivo,
- h. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de p16^{INK4a},
- i. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de p14ARF,
- j. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de Ki67,
- k. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de Ki-S2,
- l. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de MCM5,
- m. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de MCM2,
- n. reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de PCNA,
- o. una o más muestras de productos génicos INK4a para llevar a cabo reacciones de control positivo,
- p. una o más muestras de productos génicos marcadores de proliferación celular para llevar a cabo reacciones de control positivo,
- q. una o más reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de otros productos génicos INK4a,
- r. y uno o más reactivos para la detección de la presencia o ausencia y/o del nivel de otros productos génicos marcadores de proliferación celular.

Figura 1:

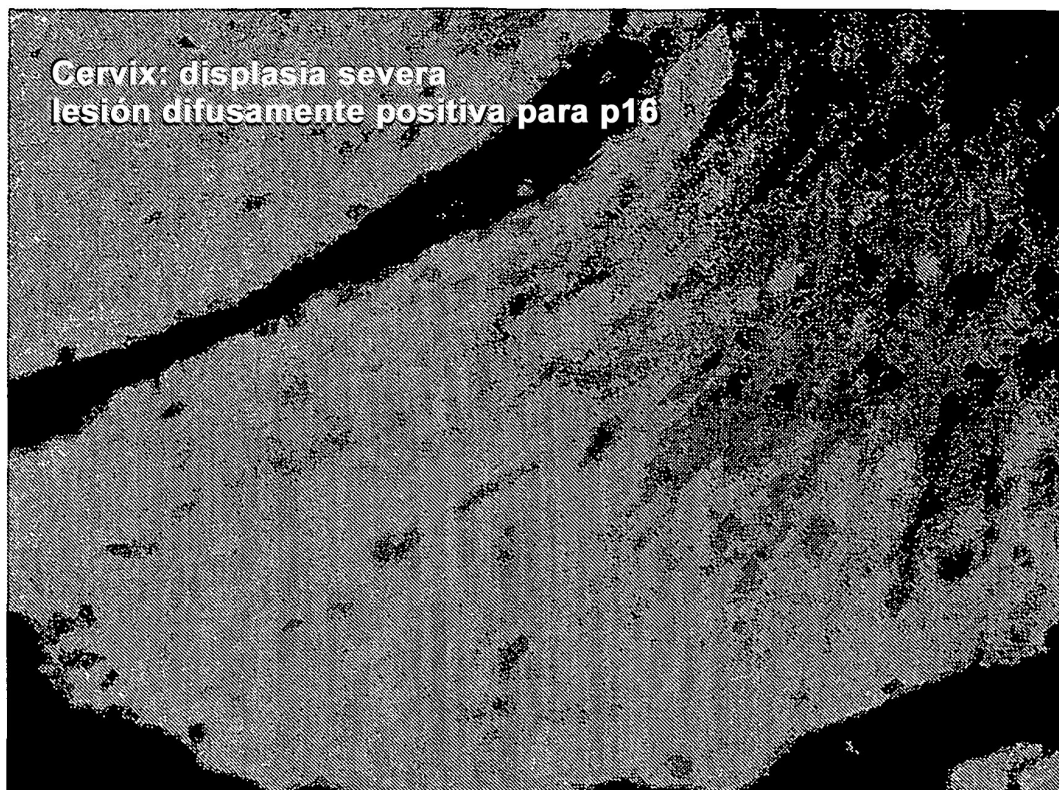


Figura 2:

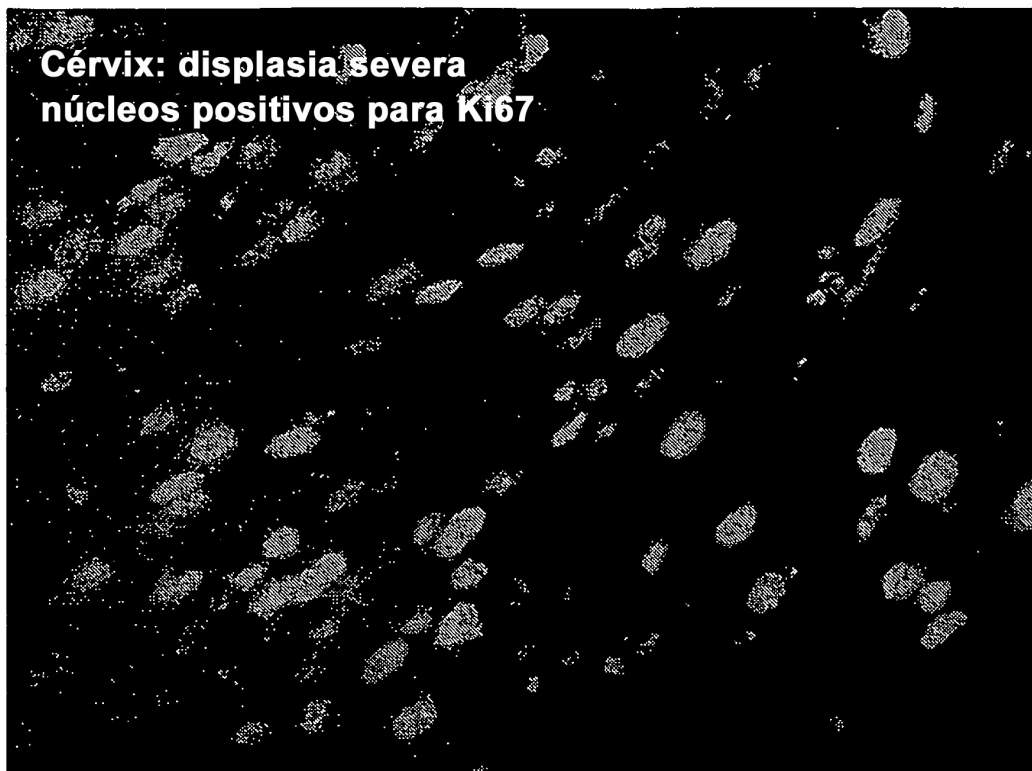


Figura 3:

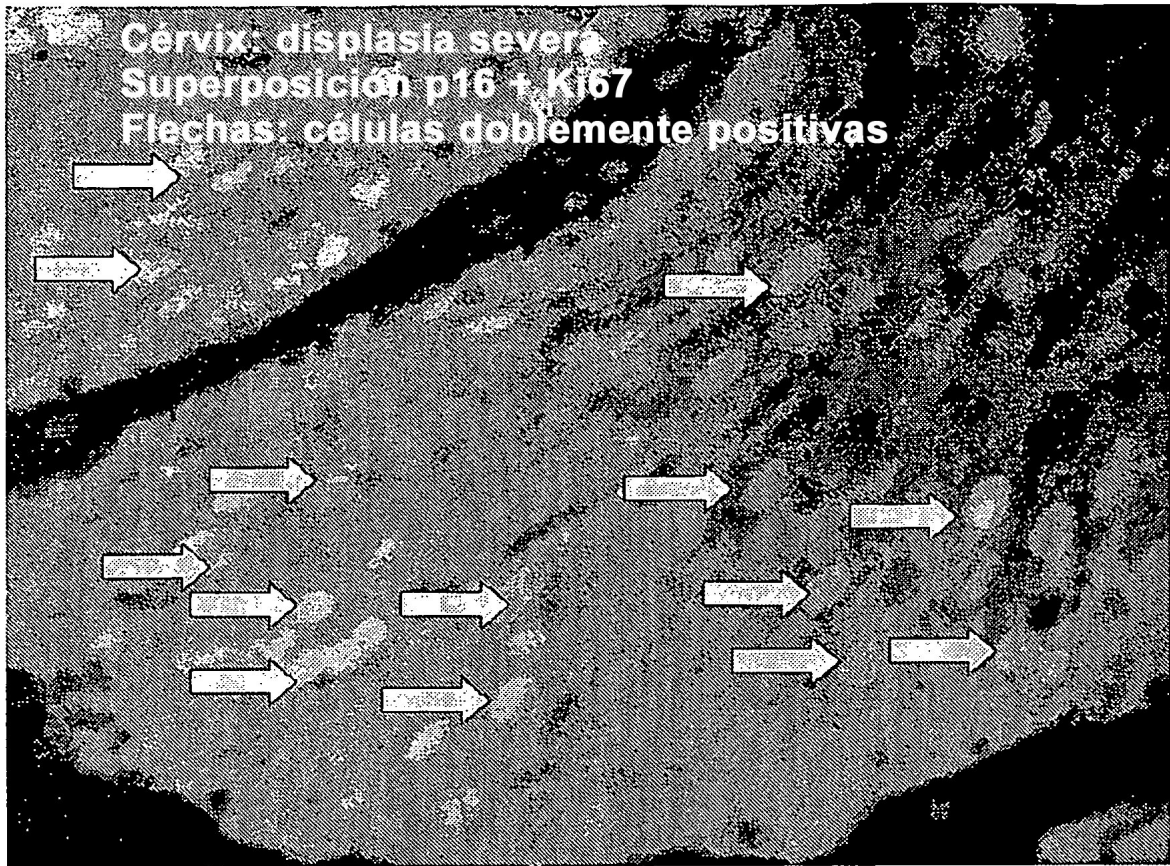


Figura 4:

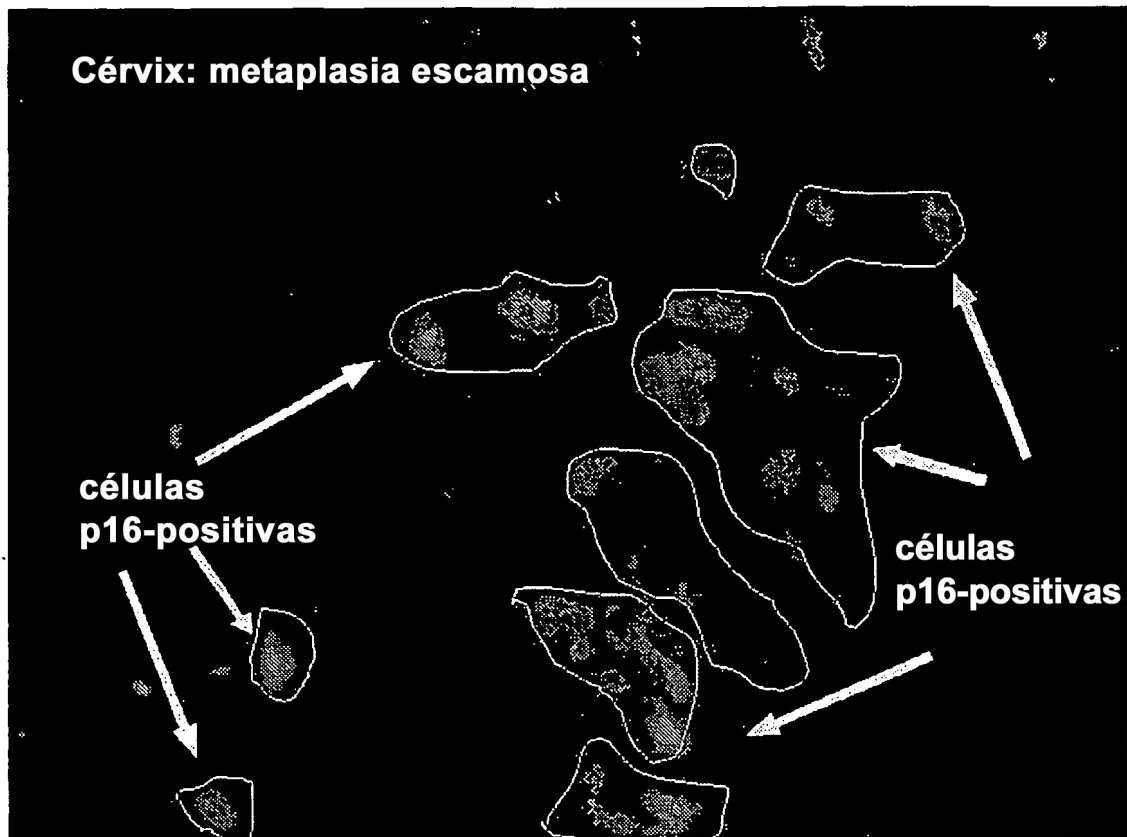


Figura 5:

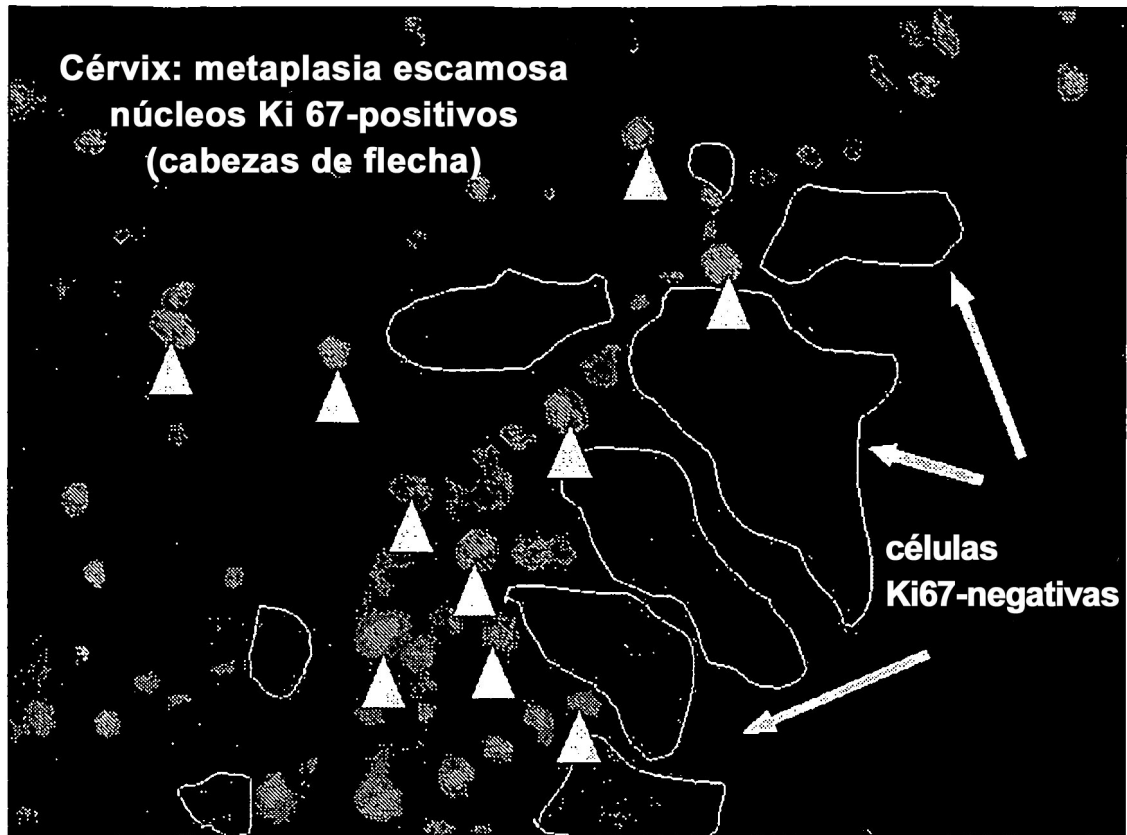


Figura 6:

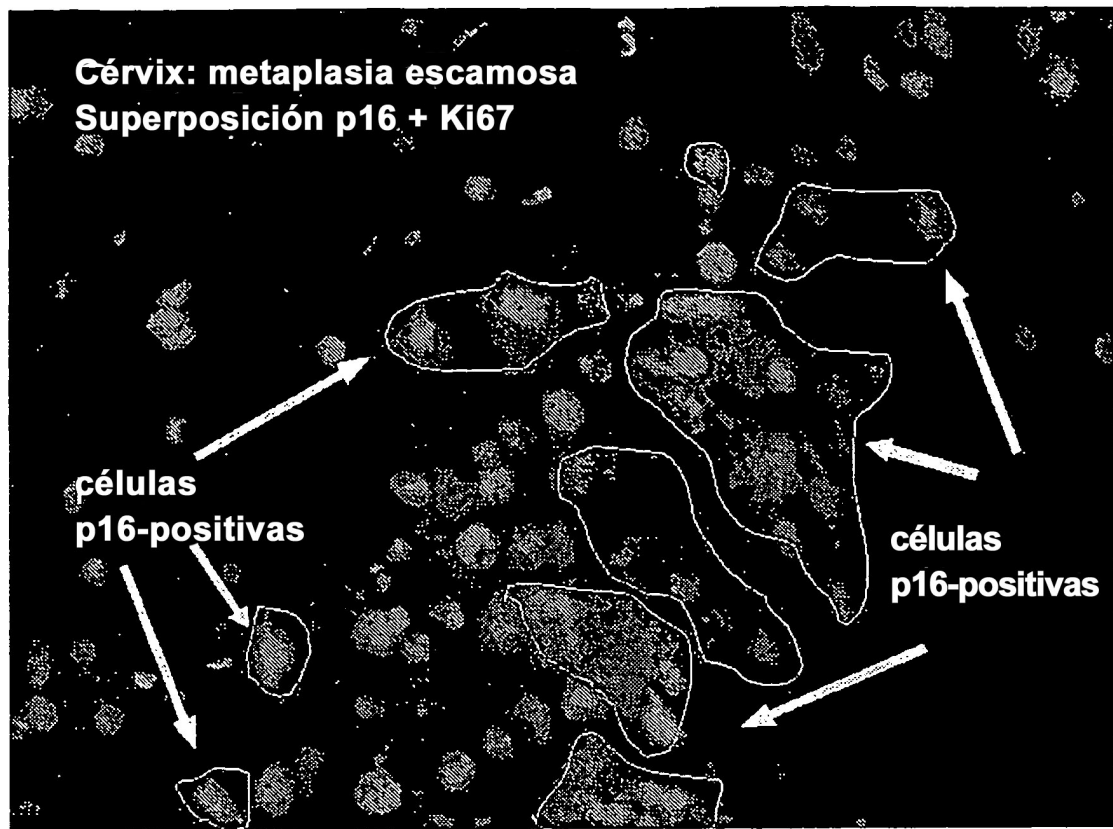


Figura 7:

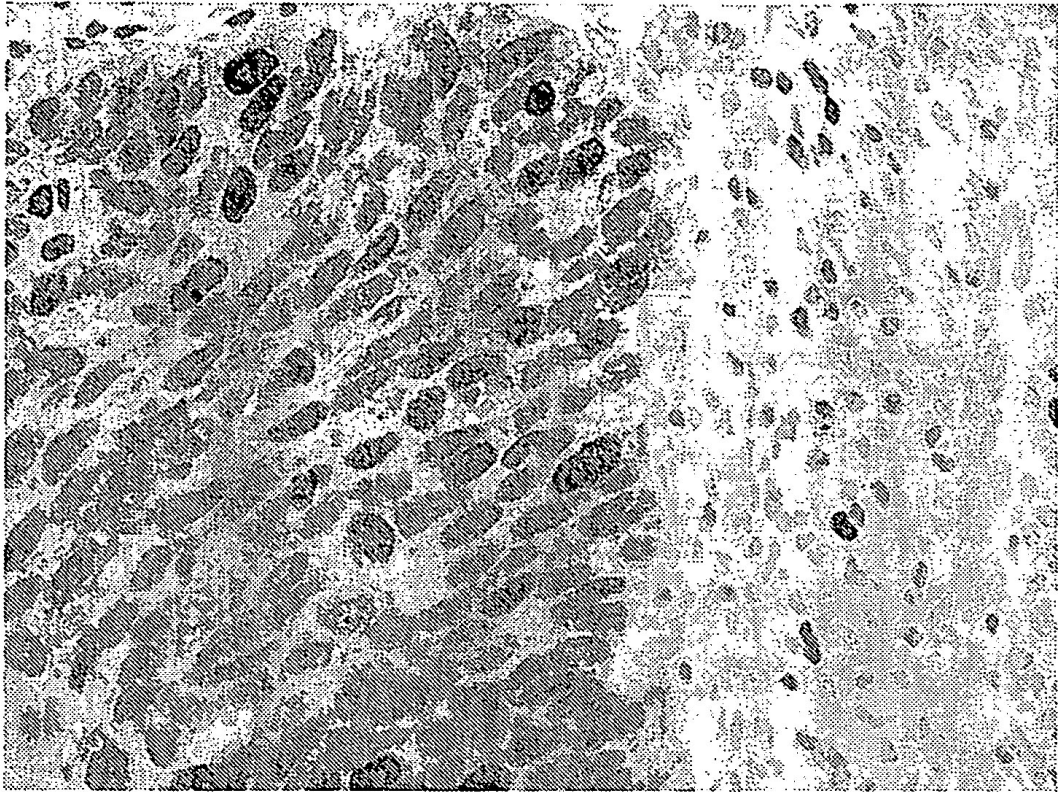


Figura 8:

