

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 128**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2006 E 10010856 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2258877**

54 Título: **Ensayo de mRNA de E6, E7 de HPV y métodos de empleo del mismo**

30 Prioridad:

02.02.2005 US 50384

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.08.2016

73 Titular/es:

**INCELLDX, INC. (100.0%)
1700 El Camino Real
Menlo Park CA 94027, US**

72 Inventor/es:

PATTERSON, BRUCE K.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 128 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de mRNA de E6, E7 de HPV y métodos de empleo del mismo

Campo técnico

5 El invento se refiere, en general, a un ensayo de mRNA de HPV para la detección de trastornos relacionados con HPV tales como el cáncer cervical y lesiones cervicales. Más específicamente, el invento se refiere a un ensayo que permite identificar y cuantificar mRNA de E6, E7 de HPV en células cervicales. El Ensayo de mRNA de E6, E7 de HPV, al que aquí se hace referencia como "Ensayo de HPV en Célula", permite una detección sensible y específica de células anormales cancerosas y precancerosas así como de células normales que experimentan una transformación maligna.

10 **Fundamento del invento**

15 El cáncer cervical afecta a aproximadamente 13.000 mujeres al año en los Estados Unidos y a más de 400.000 mujeres en todo el mundo. El noventa por ciento de los cánceres cervicales contiene las cepas de alto riesgo 16 y 18 de DNA de HPV ("HPV-16" y "HPV-18", respectivamente). Por contraste, los HPVs de bajo riesgo, tales como HPV-6 y HPV-11, raramente se desarrollan hasta un cáncer. La presencia de HPVs de bajo riesgo y alto riesgo es identificada por medio del uso de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"; del inglés, polymerase chain reaction) o del Ensayo Hybrid Capture® II para HPV ("Ensayo HC II para HPV"; Digene Corp., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.).

20 Patterson et al. (2002), "High throughput cervical cancer screening using intracellular HPV E6, E7 mRNA quantification by ultrasensitive fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry", Acta Cytologica 46 (1): 206-207, describen un ensayo para la exploración de alta eficacia del cáncer cervical mediante un inmunofenotipaje y una hibridación ultrasensible *in situ* con fluorescencia simultáneos para mRNA de E6, E7 de HPV.

25 Además, en el Documento WO 99/29890 se describe un método para evaluar la fase y el pronóstico de una infección por papilomavirus humano (HPV; del inglés, human papilloma virus) midiendo el nivel de expresión de dos o más genes de HPV, por ejemplo, los genes E6, E7, L1 y E2 de HPV, en un estado morbooso y comparando su expresión entre sí o con genes de referencia.

30 El frotis de Papanicolaou ("Pap") permite evaluar el riesgo de cáncer cervical de una paciente por examen de la presencia de lesiones intraepiteliales escamosas ("SILs"; del inglés, squamous intraepithelial lesions) en la cervix. El frotis de Pap ha sido la norma de atención en los EE.UU. a lo largo de 50 años, dando lugar a una disminución del 74% en las muertes debidas al cáncer cervical. Sin embargo, el frotis de Pap no está exento de desventajas; en particular, errores en el muestreo cervical y la interpretación contribuyen a una sensibilidad del frotis de Pap de sólo el 58% [Hakama, *Screening for Cervical Cancer*, CANCER TREND RES. 86: 41-49 (1996); Nanda et al., *Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities*, ANN. INTERN. MED. 132: 810-819 (2000)]. En 1996, la "Food and Drug Administration" aprobó el Ensayo de Pap ThinPrep® (Cytex Corp., Marlborough, Massachusetts, EE.UU.) como una alternativa al frotis convencional de Pap para la exploración de SILs. El ensayo de Pap ThinPrep permite explorar SILs usando una citología de base líquida ("LBC"; del inglés, liquid based cytology) con una producción automatizada de portaobjetos con monocapas. El uso de LBC ha dado lugar a un aumento de muestras adecuadas y de la detección de SILs; sin embargo, las muestras para LBC tienen una sensibilidad de sólo el 80% [Corkill et al., *Specimen Adequacy of the ThinPrep Sample Preparations in a Direct-to-Vial Study*, ACTA CYTOL. 41: 39-44 (1997); Wilbur et al., *Clinical Trials of the CYTORICH Specimen-Preparation Device for Cervical Cytology*, ACTA CYTOL. 41: 24-29 (1997)].

45 Aunque el ciclo vital del HPV indica que las mujeres con HPVs de alto riesgo desarrollarán SILs de grado bajo ("LGSILs"; del inglés, low grade SILs; es decir, SILs de una lesión premaligna precoz) o SILs de grado elevado ("HGSILs"; del inglés, high grade SILs; es decir, SILs de una lesión premaligna avanzada) y evolucionarán hasta un cáncer, mientras que las mujeres con HPVs de bajo riesgo, no, en realidad, sólo una minoría de las mujeres infectadas con HPVs de alto riesgo y que presentan LGSILs o HGSILs evolucionará hasta el cáncer. En la tabla siguiente se muestran los índices de regresión y progreso de mujeres a quienes se ha diagnosticado ASCUS (células escamosas anormales de significación indeterminada; del inglés, abnormal squamous cells of undetermined significance), LGSILs y HGSILs por medio del frotis de Pap o de la LBC [de Melnikow et al., *Natural History of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions: A Meta-Analysis*, J. OBSTET. GYNECOL. 92: 727-735 (1998); véase también Woodman et al., *Natural History of Cervical Human Papillomavirus Infection in Young Women: A Longitudinal Cohort Study*, LANCET 357: 1831-1836 (2001)].

CITOLOGÍA	REGRESIÓN HASTA LA NORMALIDAD	PROGRESO HASTA UN GRADO MAYOR A LO LARGO DE 24 MESES	PROGRESO HASTA UN CÁNCER INVASIVO A LO LARGO DE 24 MESES
ASCUS	68%	7%	0,25%
LGSIL	47%	21%	0,15%
HGSIL	35%	23%	1,44%

Como demuestran los datos de la tabla precedente, la mayoría de las mujeres a quienes se ha diagnosticado ASCUS, LGSILs y HGSILs no evoluciona hasta un cáncer; en consecuencia, el frotis de Pap tradicional y el ensayo de LBC, que meramente permiten identificar la presencia de SILs anormales, no son ensayos eficaces para distinguir lesiones benignas de lesiones con un potencial maligno. Similarmente, puesto que la mayoría de las mujeres a quienes se ha diagnosticado ASCUS, LGSILs y HGSILs está normalmente infectada con un HPV de alto riesgo, resulta que la identificación de una infección con un HPV de alto riesgo no es un indicador biológicamente relevante para la detección del cáncer cervical. Por lo tanto, existe en la técnica la necesidad de un método mucho más sensible mediante el cual explorar el cáncer cervical.

10 Sumario del invento

El presente invento supera la necesidad anteriormente mencionada de la técnica al proporcionar ensayos para explorar el cáncer cervical explorando, detectando y cuantificando mRNA intracelular de E6, E7 de HPV en células cervicales. Que sepa el inventor, no se ha publicado ni descrito previamente dicho ensayo para mRNA de E6, E7 de HPV.

15 Un aspecto del invento es un ensayo *in vitro* para determinar la transformación maligna de células cervicales, ensayo que comprende identificar y cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales sobre una base por célula, en que la transformación maligna de las células cervicales viene indicada por la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula.

20 Se describe aquí un ensayo para determinar la transformación maligna de células cervicales, que comprende las operaciones de: (a) obtener células cervicales de un individuo; (b) preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC); y (c) hibridar la muestra para LBC usando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV, en que la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica la transformación maligna de las células cervicales. Aquí, el mRNA de E6, E7 de HPV puede ser cuantificado por medio de citometría de flujo.

25 Se describe además un método para la exploración de una paciente en cuanto a la transformación maligna de células cervicales, que comprende identificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales. En una descripción preferida, se identifica el mRNA de E6, E7 de HPV utilizando una hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV y se cuantifica el mRNA de E6, E7 de HPV usando citometría de flujo.

30 Generalmente, la transformación maligna de las células cervicales viene indicada por la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, por ejemplo, la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula es lo más preferido.

35 Las células cervicales que se pueden utilizar tanto en el ensayo como en el método anteriormente descritos son seleccionadas del grupo que consiste en células normales, células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales de grado elevado (HGSILs).

40 Se describe además un método para la exploración de una paciente con células cervicales anormales en cuanto a células cervicales premalignas, que comprende cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales, en que células que expresan 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indican células con un potencial maligno, y células que expresan menos de 200 copias de mRNA de E6, E7 de HPV indican células benignas. Las células cervicales anormales son seleccionadas del grupo que consiste en células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales de grado elevado (HGSILs). En una descripción preferida, se identifica el mRNA de E6, E7 de HPV utilizando una hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV y se cuantifica el mRNA de E6, E7 de HPV usando citometría de flujo.

45 Se describe además un ensayo para identificar tipos de células cervicales malignamente transformadas, que comprende las operaciones de: (a) obtener células cervicales de un individuo; (b) preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC); (c) teñir las células cervicales con una combinación de

CD16 y CAM 5.2; y (d) hibridar la muestra para LBC usando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV, en que los neutrófilos son identificados por una tinción CD16⁺, las células endocervicales columnares son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁺, y las células ectocervicales escamosas son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁻, y la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica una transformación maligna de las células cervicales. Aquí, la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV por célula puede ser cuantificada por medio de citometría de flujo, viniendo indicada la transformación maligna de las células cervicales por la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo preferida la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo más preferida la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula y siendo muy preferida la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula. Células endocervicales columnares malignamente transformadas indican un estado cervical de preadenocarcinoma o adenocarcinoma, y células ectocervicales escamosas malignamente transformadas indican un estado cervical de carcinoma de células preescamosas o de carcinoma de células escamosas.

Se expondrán aspectos, ventajas y características adicionales del invento, en parte en la descripción que viene a continuación y en parte resultarán evidentes a los expertos en la técnica tras el examen de lo que viene a continuación, o podrán ser aprendidos mediante la práctica del invento.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico que muestra la relación entre la intensidad media de fluorescencia ("MFI"; del inglés, mean fluorescence intensity) del mRNA de E6, E7 de HPV cuantificado mediante el Ensayo de HPV en Célula, usando citometría de flujo para la cuantificación, frente a las copias de mRNA de E6 de HPV cuantificado por PCR con transcriptasa inversa (RT; del inglés, reverse transcriptase) en tiempo real ("RT-PCR en tiempo real") en células ectocervicales normales HPV⁻ y células SiHa y HeLa HPV⁺.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la relación lineal entre diluciones sucesivas de una población mixta de células HeLa HPV⁺ en células ectocervicales normales HPV⁻, frente al porcentaje de células de la población mixta que expresan mRNA de E6, E7 de HPV cuantificado mediante el Ensayo de HPV en Célula usando citometría de flujo.

Las **Figuras 3A-3E** muestran colectivamente la detección y la morfología de células anormales y normales teñidas en portaobjetos (barra de escala: 20 µm). La **Figura 3A** muestra la morfología de células anormales que expresan mRNA de E6, E7 de HPV, y la **Figura 3B** muestra la morfología de células epiteliales escamosas normales. Las **Figuras 3C-3E** muestran que las células anormales tienen una relación de núcleo a citoplasma característicamente elevada (flechas) mientras que las células normales presentan una relación de núcleo a citoplasma baja (puntas de flecha).

Las **Figuras 4A-4I** muestran histogramas, por citometría de flujo, de células cervicales normales y anormales acotadas por dispersión lumínica, teñidas con una combinación de CD16⁻ y CAM 5.2⁻ para identificar células ectocervicales, y analizadas en cuanto a la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV usando el Ensayo de HPV en Célula del presente invento. La **Figura 4A** muestra el análisis de células cervicales por dispersión frontal y lateral (caja primera) con una muestra (caja interna primera) seleccionada para tinción para células ectocervicales (caja segunda) y con una muestra seleccionada (caja interna segunda) de células ectocervicales analizadas en cuanto a mRNA de E6, E7 de HPV usando el Ensayo de HPV en Célula, utilizando 100 copias por células como punto de corte para determinar el porcentaje de células en una muestra que expresa mRNA de E6, E7 de HPV. Las **Figuras 4B-4E** muestran el ensayo aplicado a cuatro mujeres con citología anormal (HGSIL) y las **Figuras 4F-4I** muestran el ensayo aplicado a cuatro mujeres con citología normal (WNL). En la esquina superior derecha de las cajas se indica el porcentaje de células que expresan más de 100 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula en cada muestra.

Descripción detallada del invento

DEFINICIONES Y NOMENCLATURA

Antes de describir realizaciones detalladas del invento, resultará útil exponer las definiciones que se usan en la descripción del invento. Las definiciones siguientes se utilizan para describir el invento. La terminología utilizada en las definiciones es con el fin de describir las realizaciones particulares del invento y no está destinada a ser restrictiva.

Como se usan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

La expresión "Ensayo de HPV en Célula" se refiere al ensayo de inmunofluorescencia y de hibridación ultrasensible *in situ* con fluorescencia simultáneas, descrito en los Ejemplos 1 y 2. El Ensayo de HPV en Célula permite identificar SILs cancerosos y precancerosos al detectar la presencia de un número muy bajo de copias de mRNA de E6, E7 de HPV en las SILs. Cuando resulta apropiado, el mRNA de E6, E7 de HPV detectado mediante el Ensayo de HPV en Célula puede ser cuantificado utilizando una citometría de flujo; de este modo, como aquí se utiliza, la expresión "Ensayo de HPV en Célula" se usa generalmente para referirse a la identificación y, cuando es apropiado, la

cuantificación del mRNA de E6, E7 de HPV.

La expresión "Sistema de Bethesda" se refiere al sistema de clasificación actualmente utilizado para el análisis mediante el frotis de Pap y el ensayo de Pap ThinPrep. El Sistema de Bethesda se describe en www.cytopathology.org/NIH e incluye las clasificaciones WNL, ASCUS, LGSIL y HGSIL ya referenciadas aquí, así como la expresión "carcinoma de células escamosas" para células cervicales malignamente transformadas. A las clasificaciones por el Sistema de Bethesda también se hace aquí referencia como "citologías".

Como aquí se utiliza, la expresión "células cervicales" se refiere generalmente a las células epiteliales escamosas que revisten la superficie de la cervix. La expresión se utiliza generalmente para incluir células cervicales normales así como las células cervicales anormales; es decir, ASCUS, LGSILs, HGSILs y carcinomas de células escamosas.

La expresión "lesiones intraepiteliales escamosas" o "SILs" se refiere a lesiones que se forman en las células escamosas cervicales, e incluye las lesiones tanto de grado bajo (LGSILs) como de grado elevado (HGSILs).

Las expresiones "adenocarcinoma" y "carcinoma de células escamosas" se usan convencionalmente para referirse a tumores malignos de células epiteliales de las glándulas (adenocarcinoma) y a tumores malignos del epitelio escamoso (carcinoma de células escamosas). Las expresiones "preadenocarcinoma" y "carcinoma de células preescamosas" se refieren a lesiones que aún no se han transformado malignamente. Como aquí se usan, los términos "adenocarcinomas" y "preadenocarcinomas" se refieren a tumores y lesiones del epitelio glandular de la cervix, y las expresiones "carcinomas de células escamosas" y "carcinomas de células preescamosas" se refieren a tumores y lesiones de las células epiteliales escamosas de la cervix.

La expresión "análisis de ácido nucleico" se refiere, en general, a todos los ácidos nucleicos, tales como todos los DNAs y RNAs, y segmentos de los mismos. En el contexto del presente invento, la expresión incluye DNA, RNA y mRNA.

Como aquí se usa, la expresión "multiplicación de diana" se refiere a procedimientos enzimáticamente mediados que permiten producir miles de millones de copias de ácido nucleico diana. Los ejemplos de procedimientos enzimáticamente mediados para multiplicación de diana conocidos en la técnica incluyen PCR, multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico ("NASBA"; del inglés, nucleic acid sequences based amplification), multiplicación mediada por transcripción ("TMA"; del inglés, transcription mediated amplification), multiplicación por desplazamiento de cadena ("SDA"; del inglés, strand displacement amplification) y reacción en cadena de la ligasa ("LCR"; del inglés, ligase chain reaction).

El procedimiento de multiplicación de diana más ampliamente usado es la PCR, descrito por vez primera para la multiplicación de DNA por Mullins et al. en la Patente de EE.UU. nº 4.683.195 y Mullis en la Patente de EE.UU. nº 4.683.202. El procedimiento de la PCR es bien conocido por quienes tienen una experiencia normal en la técnica. Cuando el material de partida para la reacción PCR es RNA, se prepara DNA complementario ("cDNA") a partir de RNA por medio de una transcripción inversa. A una PCR usada para multiplicar productos de RNA se hace referencia como PCR con transcriptasa inversa o "RT-PCR".

Como aquí se utiliza, la expresión "PCR específica del tipo" se refiere al uso de la PCR para identificar DNA de HPV de alto riesgo y bajo riesgo.

PCR en tiempo real y RT-PCR en tiempo real se refieren a la detección de productos de PCR por medio de una señal fluorescente generada mediante la copulación de una molécula colorante fluorogénica y un componente sofocador con los mismos o diferentes sustratos oligonucleotídicos. Los ejemplos de sondas comúnmente usadas, utilizadas en la PCR en tiempo real y la RT-PCR en tiempo real, incluyen las sondas siguientes: sondas Taqman[®], sondas Balizas Moleculares, sondas Scorpions[®] y sondas SYBR[®] Green. En pocas palabras, cada sonda Taqman, Baliza Molecular y sonda Scorpion tiene un colorante informador fluorescente (también llamado un "fluor") fijado al extremo 5' de la sonda, y un componente sofocador copulado con el extremo 3' de la sonda. En el estado no hibridado, la proximidad de las moléculas de fluor y sofocador evita la detección de la señal fluorescente procedente de la sonda; durante la PCR, cuando la polimerasa replica un molde al cual está unido una sonda, la actividad 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la sonda, aumentando de este modo la fluorescencia con cada ciclo de replicación. Las sondas SYBR Green se unen a DNA de doble cadena y, tras la excitación, emiten luz; de este modo, aumenta la fluorescencia conforme se acumula el producto de la PCR.

En el contexto del presente invento, se usa la RT-PCR en tiempo real para identificar mRNA oncogénico en muestras cervicales anormales, tal como, por ejemplo, el mRNA de E6 hallado en HPV-16 y HPV-18. En los Ejemplo 6 y 7 se utiliza una RT-PCR en tiempo real con una sonda Taqman. Se diseñan sondas Taqman para que se hibriden con una región interna de un producto de PCR. En el estado no hibridado, la proximidad de las moléculas de fluor y sofocador evita la detección de la señal fluorescente procedente de la sonda; durante la PCR, cuando la polimerasa replica un molde al cual está unido una sonda Taqman, la actividad 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la sonda, aumentando de este modo la fluorescencia con cada ciclo de replicación.

La expresión "multiplicación de señales" se refiere a técnicas que permiten detectar y cuantificar la cantidad de

analito de ácido nucleico en una muestra al multiplicar la señal de una diana en proporción directa a la cantidad de diana. Puesto que la cantidad de diana no se altera, los procedimientos para multiplicación de señales son útiles para cuantificar la cantidad de analito de ácido nucleico en una muestra. Los ejemplos de procedimientos para multiplicación de señales conocidos en la técnica incluyen la multiplicación de señales de DNA ramificado ("bDNA"; del inglés, *branched DNA*; Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, New York, EE.UU.), la Captura de Híbridos ("HC"; del inglés, *Hybrid Capture*; Digene Corp., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y la Multiplicación de Señales con Tiramida ("TSA"; del inglés, *Tyramide Signal Amplification*; Perkin Elmer, Inc., Wellesley, Massachusetts, EE.UU.).

En el contexto del presente invento, el Ensayo HC II para HPV es un ensayo de multiplicación de señales utilizado para detectar la presencia de DNA de HPV en muestras clínicas. El Ensayo HC II para HPV incluye las operaciones siguientes: se combinan muestras clínicas con una disolución de base que rompe el virus y libera DNA diana; se combina el DNA diana con sondas de RNA específicas que crean híbridos de RNA:DNA; se capturan múltiples híbridos de RNA sobre una fase sólida revestida con anticuerpos de captura universales específicos para híbridos de RNA:DNA; se detectan los híbridos de RNA:DNA capturados, con múltiples anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina ("AP"; del inglés, *alkaline phosphatase*; la multiplicación puede alcanzar un aumento de 3000 órdenes de magnitud); y se detecta la fosfatasa alcalina unida, con un sustrato quimioluminiscente de dioxetano. Tras la escisión por la AP, el sustrato produce una luz que se puede medir en unidades lumínicas relativas ("RLUs"; del inglés, *relative light units*) con un luminómetro. El Ensayo HC II para HPV permite detectar 13 tipos de HPV de alto riesgo: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59 y HPV-68.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE mRNA DE E6, E7 DE HPV

El presente invento proporciona un ensayo para mRNA de E6, E7 de HPV (el Ensayo de HPV en Célula) que permite identificar células cervicales precancerosas y cancerosas al detectar la presencia de mRNA de E6, E7 de HPV en las células. Puesto que el mRNA de E6, E7 de HPV es un biomarcador muy sensible para la detección de la transformación maligna de células cervicales, el Ensayo de HPV en Célula aquí descrito permite detectar la transformación maligna de células cervicales que presentan una citología normal además de las células que presentan una citología anormal, por ejemplo, ASCUS, LGSILs y HGSILs (Ejemplos 6 y 7).

El Ensayo de HPV en Célula consiste en un ensayo de hibridación *in situ* llevado a cabo con sondas oligonucleotídicas para mRNA de E6, E7 de HPV y, cuando es apropiado, una citometría de flujo para cuantificar el mRNA de E6, E7 de HPV. En los Ejemplos 1 y 2 se describen dos diferentes metodologías de hibridación *in situ* para llevar el Ensayo de HPV en Célula a cabo, y en el Ejemplo 3 se describe el uso de la citometría de flujo para cuantificar el mRNA de E6, E7 de HPV.

Basándose en los principios precedentes, en una primera descripción se proporciona un ensayo para determinar la citología de células cervicales, que comprende las operaciones de: (a) obtener células cervicales de un individuo; (b) preparar las células cervicales como una muestra para LBC; y (c) hibridar la muestra para LBC usando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV, en que la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica una transformación maligna de las células cervicales. En la primera descripción, el mRNA de E6, E7 de HPV puede ser cuantificado por medio de citometría de flujo.

En una segunda descripción, se proporciona un método para explorar una paciente en cuanto a la transformación maligna de células cervicales, que comprende identificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales. En esta segunda descripción, se identifica el mRNA de E6, E7 de HPV utilizando hibridación *in situ* y se cuantifica el mRNA de E6, E7 de HPV usando citometría de flujo.

Tanto en el ensayo como en el método de las descripciones primera y segunda de la presente invención, las células cervicales son seleccionadas del grupo que consiste en células normales, células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales de grado elevado (HGSILs). Como se mencionó anteriormente, una ventaja significativa del Ensayo de HPV en Célula con respecto a los otros métodos disponibles para detectar citología de células cervicales es que el Ensayo de HPV en Célula, a través de la detección de la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV, permite identificar una transformación maligna precoz en células que por lo demás parecen normales. Ninguno de los métodos actualmente disponibles para la exploración de células cervicales es capaz de dichas sensibilidad y especificidad. En los Ejemplo 6 y 7 se describe la capacidad del Ensayo de HPV en Célula para detectar mRNA de E6, E7 de HPV en células con citología normal. En el Ejemplo 6, 3 de 41 mujeres de alto riesgo con citología cervical normal se mostraron positivas para mRNA de E6, E7 de HPV al utilizar el Ensayo de HPV en Célula, y, en el Ejemplo 7, 10 de 109 mujeres de bajo riesgo se mostraron positivas para mRNA de E6, E7 de HPV, lo que indica una transformación maligna en las células "normales" de estas mujeres.

Como se indicó anteriormente, los resultados diagnósticos del Ensayo de HPV en Célula fueron confirmados en los Ejemplos 6 y 7 usando RT-PCR en tiempo real y en el Ejemplo 7 usando tanto RT-PCR en tiempo real como el Ensayo HC II para HPV. Como se indicó previamente y se reitera en el Ejemplo 7, el Ensayo de HPV en Célula del presente invento es superior al Ensayo HC II para HPV para la detección del cáncer cervical porque el Ensayo de HPV en Célula permite detectar células malignamente transformadas en una etapa muy temprana mientras que el

Ensayo HC II para HPV sólo permite detectar DNA de HPV de alto riesgo, es decir, HPV-16 y HPV-18, ninguno de los cuales es indicador de transformación maligna de células. El Ensayo de HPV en Célula es también superior al uso de la RT-PCR en tiempo real para la detección del cáncer cervical porque, a diferencia de la PCR en tiempo real, que es un procedimiento para multiplicación de dianas que sólo permite identificar la multiplicación de una población de células, el Ensayo de HPV en Célula es un procedimiento muy específico que permite identificar la multiplicación de una célula individual. En otras palabras, comparando la multiplicación de un millón de copias de mRNA de E6, E7 de HPV obtenidas por RT-PCR en tiempo real frente a un millón de copias de mRNA de E6, E7 de HPV obtenidas mediante el Ensayo de HPV en Célula del presente invento, la RT-PCR en tiempo real sólo permitirá discernir que se han producido un millón de copias del gen; por contraste, el Ensayo de HPV en Célula permite discernir exactamente cuántas células han producido el millón de copias. De este modo, bajo una RT-PCR en tiempo real, el facultativo común será incapaz de identificar si un millón de células individuales produjeron el millón de copias, como ocurre en un individuo normal, o si cada una de mil células produjo mil células, como ocurre en el cáncer. El Ensayo de HPV en Célula del presente invento supera esta deficiencia de la RT-PCR en tiempo real al identificar, por medio de una cuantificación citométrica de flujo, el número exacto de copias de mRNA de E6, E7 de HPV que son producidas por célula. De este modo, en los Ejemplo 6 y 7, sólo se usó la RT-PCR en tiempo real para verificar la presencia de mRNA de E6, E7 de HPV.

Tanto en la descripción primera como en la segunda, la transformación maligna de las células cervicales viene indicada por la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo preferida la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo más preferida la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula y siendo muy preferida la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula. Aunque se halló que la sensibilidad teórica del análisis citométrico de flujo del Ejemplo 3 era de 10 a 20 copias de mRNA de E6, E7 de HPV, una calibración ulterior del ensayo citométrico de flujo debería reducir teóricamente la sensibilidad del análisis citométrico de flujo hasta tan poco como de una a dos copias de mRNA de E6, E7 de HPV y hasta tanto como 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula.

En una tercera descripción, se proporciona un método para explorar una paciente con células cervicales anormales en cuanto a células cervicales premalignas, que comprende cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales, en que células que expresan 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indican células con un potencial maligno y células que expresan menos de 200 copias de mRNA de E6, E7 de HPV indican células benignas. Las células anormales que se pueden examinar en esta tercera descripción pueden ser seleccionadas del grupo que consiste en células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales de grado elevado (HGSILs). Similarmente a la descripción previamente discutida, el mRNA de E6, E7 de HPV se identifica por medio de hibridación *in situ* y se cuantifica por medio de citometría de flujo.

Cuando se desea, se puede determinar la morfología específica de las células cervicales mediante el procedimiento expuesto en el Ejemplo 5 y representado en la Figura 3. Específicamente, al teñir las células cervicales con una combinación de CD16 (un marcador de neutrófilos) y CAM 5.2 (un anticuerpo expresado en células endocervicales pero no en células ectocervicales), es posible identificar la citología de las células que expresan el mRNA de E6, E7 de HPV. De un modo similar, la fórmula para tinción de anticuerpos del Ejemplo 5 puede ser también utilizada para estudiar una clase específicas de células, tal como los niveles de expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en células ectocervicales escamosas de una cohorte específica de alto riesgo o bajo riesgo (Ejemplo 6).

Basándose en los principios ejemplificados en los Ejemplos 5 y 6, la cuarta descripción proporciona un ensayo que permite fenotipar simultáneamente células malignamente transformadas. Este ensayo para identificar tipos de células cervicales malignamente transformadas incluye las operaciones siguientes: (a) obtener células cervicales de un individuo; (b) preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC); (c) teñir las células cervicales con una combinación de CD16 y CAM 5.2; y (d) hibridar la muestra para LBC usando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV, en que los neutrófilos son identificados por una tinción CD16⁺, las células endocervicales columnares son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁺, y las células ectocervicales escamosas son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁻, y la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica una transformación maligna de las células cervicales. Células endocervicales columnares malignamente transformadas indican un estado cervical de preadenocarcinoma o adenocarcinoma, y células ectocervicales escamosas malignamente transformadas indican un estado cervical de carcinoma de células preescamosas o de carcinoma de células escamosas. Como las descripciones primera y segunda anteriormente descritas, la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV por célula puede ser cuantificada por medio de citometría de flujo, viniendo indicada la transformación maligna de las células cervicales por la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo preferida la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula, siendo más preferida la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula y siendo muy preferida la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula.

UTILIDAD

El Ensayo de HPV en Célula aquí descrito es útil como un método de exploración muy sensible y específico para la detección de células cervicales precancerosas y cancerosas, que puede ser llevado a cabo en menos de tres horas. El Ensayo de HPV en Célula parte de la premisa de la identificación y cuantificación de mRNA de E6, E7 de HPV, en

que la presencia de niveles elevados de mRNA de E6, E7 de HPV en células cervicales indica la transformación maligna de las células.

5 El Ensayo de HPV en Célula es superior a los métodos actualmente disponibles para la exploración de células cervicales ya que permite detectar una transformación maligna en células que presentan una citología normal. A causa de su sensibilidad y especificidad acusadas, el Ensayo de HPV en Célula tiene utilidad como un método alternativo y superior para la exploración primaria de células cervicales con respecto al frotis tradicional de Pap o el ensayo de Pap ThinPrep, los cuales meramente permiten identificar células cervicales anormales (es decir, ASCUS, LGSILs y HGSILs), y la PCR y el Ensayo HC II para HPV, los cuales meramente permiten identificar HPV de alto riesgo frente al HPV de bajo riesgo. Como se explicó previamente, ni la citología cervical ni la identificación de HPVs de bajo riesgo o alto riesgo son marcadores fiables para determinar una malignidad en células cervicales. Para aquellas situaciones en que se usa la PCR o el Ensayo HC II para HPV, el Ensayo de HPV en Célula encuentra utilidad como un marcador secundario para pacientes que son positivos en cuanto a DNA de HPV. En otras palabras, tras la exploración primaria de DNA de HPV por medio de PCR o HPV HC II, se puede utilizar el Ensayo de HPV en Célula para determinar si las SILs que presentan DNA de HPV de alto riesgo han resultado malignamente transformadas.

Además de lo precedente, el Ensayo de HPV en Célula presenta también utilidad como un método alternativo y muy deseable para la exploración de células cervicales ya que puede ser llevado a cabo en menos de tres horas con protocolos experimentales establecidos. Lo precedente demuestra que el Ensayo de HPV en Célula no sólo es más preciso que cualquier método actualmente utilizado para detectar una transformación maligna de células cervicales sino que también es más eficaz en cuanto al tiempo y el coste.

Se exponen los ejemplos siguientes con objeto de proporcionar a quienes tienen una experiencia normal en la técnica una revelación y una descripción completas de cómo preparar y utilizar las composiciones del invento. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero, por supuesto, se deberían tener en cuenta ciertos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a ella. A menos que se indique otra cosa, todos los componentes se obtuvieron comercialmente.

PARTE EXPERIMENTAL

A menos que se indique otra cosa, todas las formulaciones aquí descritas se llevaron a cabo con productos comercialmente asequibles. En los Ejemplos se usaron los protocolos siguientes.

Sujetos: Mujeres que estaban siendo sometidas a citología cervical rutinaria en múltiples sitios fueron inscritas en un estudio después de un consentimiento informado. Se recogieron muestras para citología cervical usando un citocepillo y se conservaron usando SurePath™ (Tripath Imaging, Burlington, Carolina del Norte, EE.UU.), un fijador para citología de base líquida. Los frotis se clasificaron utilizando el Sistema de Bethesda.

Líneas celulares: Se obtuvieron células HeLa del American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, EE.UU.) y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones. Se cultivaron células ectocervicales humanas normales (Clonetics, Inc., ahora Cambrex, Inc., East Rutherford, New Jersey, EE.UU.) en medios proporcionados por la compañía.

RT-PCR en tiempo real y Ensayo HC II para HPV: Para la multiplicación específica de mRNA oncogénico, se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real usando sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Para la multiplicación de señales, se llevó a cabo el Ensayo HC II para HPV de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un conjunto de sondas de alto riesgo.

Citometría: Se llevó a cabo la citometría de flujo usando un análisis de tres colores en un citómetro FACScan (BDIS, San Jose, California, EE.UU.). El análisis se restringió a células ectocervicales, definidas por características de dispersión de luz y la falta de expresión de la citoqueratina CAM 5.2 de bajo peso molecular. Se excluyeron del análisis los neutrófilos polimorfonucleares ("PMN") acotando las células positivas para el marcador CD16 de PMN.

Análisis de imágenes: El análisis de imágenes se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal láser Olympus®. Las células se incluyeron en el análisis si presentaban fluorescencia verde (fluoresceína, mRNA+ de E6, E7 de HPV) y fluorescencia azul (DAPI, todas las células) pero carecían de fluorescencia roja (PMNs, células endocervicales).

Análisis estadístico: Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando una prueba t o una prueba Mann-Whitney de suma de rangos. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

EJEMPLO 1

INMUNOFLUORESCENCIA E HIBRIDACIÓN ULTRASENSIBLE *IN SITU* CON FLUORESCENCIA SIMULTÁNEAS PARA DETECTAR E6, E7 de HPV ("ENSAYO DE HPV EN CÉLULA")

De la muestra para citología cervical de base líquida, aislada de los sujetos, se separó una parte alícuota de 1 ml.

Las células fueron recogidas como sedimento por centrifugación a 400 x g y fueron lavadas una vez en disolución salina tamponada con fosfato ("PBS"; del inglés, phosphate buffered saline), pH de 7,4. Las células fueron resuspendidas en 100 µl de PBS, pH de 7,4, y fueron teñidas con una dilución 1:10 de anti-CAM 5.2 conjugado con ficoeritrina ("PE"; del inglés, phycoerythrin) y anti-CD16 conjugado con PE/cy5 (BDPharmingen, San Diego, California, EE.UU.). Las células fueron luego incubadas a 4 °C durante 20 minutos en oscuridad. Después de la incubación, las células fueron fijadas, permeabilizadas, lavadas una vez en PBS, pH de 7,4, recogidas como sedimento por centrifugación a 400 x g, lavadas de nuevo en SSC 2x y recogidas como sedimento por centrifugación. Las células fueron luego resuspendidas en una mezcla de hibridación que consistía en SSC 5x, formamida al 30% y 100 µg/ml de DNA fragmentado de esperma de salmón ("ssDNA") y un coctel de sondas oligonucleotídicas para mRNA de E6, E7 de HPV marcadas con 5'- y 3'-fluoresceína, que se pueden obtener de Invirion Inc., Frankfort, Michigan, EE.UU., bajo el nombre "HPV OncoTect" o se pueden preparar mediante técnicas para la preparación de oligonucleótidos conocidas en este campo técnico. Véase, por ejemplo, Caruthers et al., *Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method*, METHODS ENZYMOLOGY. 154: 287-313 (1987). La hibridación se llevó a cabo a 37° durante 30 minutos y fue seguida de un lavado de 5 minutos en SSC 2x, Triton X-100 al 0,1%, y un lavado de 15 minutos en SSC al 0,1%, Triton X-100 al 0,1%.

Las células preparadas de tal modo fueron resuspendidas en PBS, pH de 7,4, con suero de ternera fetal al 2% para el análisis citométrico de flujo.

EJEMPLO 2

EL ENSAYO DE HPV EN CÉLULA BASADO EN PORTAOBJETOS

Se transfirieron 100 µl de células (1×10^6 células/ml) de la muestra para citología cervical de base líquida, aislada de los sujetos, y se pusieron en una citocentrífuga o un sistema de portaobjetos de base líquida. Se centrifugaron los portaobjetos a 800 x g durante 2 minutos a temperatura ambiental. Después de un lavado en PBS 1x, pH de 7,4, los portaobjetos fueron incubados en reactivo PermiFlow (Invirion Inc., Frankfort, Michigan, EE.UU.) 1x para fijación/permeabilización en una cubeta Coplin a temperatura ambiental durante 1 hora. Luego se lavaron los portaobjetos una vez en PBS y una vez en SSC 2x. Las células fueron hibridadas con un cóctel de las sondas OncoTect para HPV en una estufa de hibridación a 37 °C durante 30-120 minutos. Los portaobjetos fueron luego lavados durante 5 minutos en una cubeta Coplin que contenía 50 ml de SSC 2x y Triton X-100 al 0,1% precalentados y fueron incubados durante 15 minutos en una cubeta Coplin que contenía 50 ml de SSC 0,1x y Triton X-100 al 0,1% precalentados. Después de un breve enjuague en PBS, pH de 7,4, los portaobjetos fueron cubiertos con cubreobjetos usando medio de montaje Fluorsave (CalBioChem, San Diego, California, EE.UU.).

EJEMPLO 3

VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE HPV EN CÉLULA

Para validar la eficacia del Ensayo de HPV en Célula, se desarrollaron en cultivo células ectocervicales normales comercialmente asequibles, es decir, células ectocervicales HPV⁻, y células SiHa y HeLa HPV⁺, se dividieron en 20 muestras y se analizaron en cuanto a mRNA de E6, E7 de HPV mediante el Ensayo de HPV en Célula con citometría de flujo y en cuanto a mRNA de E6 de HPV mediante RT-PCR en tiempo real con un límite de detección de 10 copias por célula. En la Figura 1 se muestra la relación entre la MFI de mRNA de E6, E7 de HPV y las copias de mRNA de E6 de HPV en cada una de las poblaciones celulares. El análisis de los resultados de la Figura 1 por regresión lineal dio lugar a una correlación de 0,88 con un valor de *p* de 0,001. Basándose en los resultados de este experimento, se calculó que la sensibilidad teórica del Ensayo de HPV en Célula era de 10 a 20 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula. En todos los subsiguientes análisis de muestras de pacientes, las células fueron consideradas positivas en cuanto a mRNA de E6, E7 de HPV si presentaban una MFI superior a 200 copias por célula, representando el 200 un número de copias de HPV que no pueden ser fácilmente eliminadas de una paciente media.

Para validar la sensibilidad y la especificidad del Ensayo de HPV en Célula a nivel de una sola célula, se usó el Ensayo de HPV en Célula con citometría de flujo para cuantificar el mRNA de E6, E7 de HPV en una población celular mixta de células HeLa (HPV⁺) en células ectocervicales normales (HPV⁻). Como se muestra en la Figura 2, cuando se representaron gráficamente las diluciones sucesivas de las células mixtas (% de células HPV⁺) frente al porcentaje de células que expresaban mRNA de E6, E7 de HPV en la población celular mixta, según se determinó mediante el Ensayo de HPV en Célula, el resultado fue un intervalo lineal entre 0,3% y 100% para las células positivas para mRNA de E6, E7 de HPV. La relación señal a ruido en este experimento se calculó en 1,5 a 2,0 valores logarítmicos.

EJEMPLO 4

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DEL MENSAJE DE mRNA DE E6, E7 DE HPV EN CÉLULAS ANORMALES

Para confirmar la especificidad del Ensayo de HPV en Célula para detectar células anormales, se hibridaron células HeLa HPV⁺ y células ectocervicales normales HPV⁻ con las sondas OncoTect para mRNA de E6, E7 de HPV y se

examinó la morfología de las células que expresaban niveles detectables de mensaje de mRNA de E6, E7 de HPV (Figura 3). El Ensayo de HPV en Célula produjo un característico patrón de tinción citoplásmica en las células HeLa. Por contraste, la línea celular HPV⁻ no se tiñó (se usó la línea C33A) (Cajas A y B, respectivamente). Utilizando el mismo cóctel de sondas usado en la citometría de flujo, se detectaron células atípicas por su característica relación de núcleo a citoplasma elevada en un campo de muchas células escamosas normales (Cajas C a E). Una imagen de superposición de la imagen por contraste de fase Nomarski con una imagen confocal de fluorescencia a 488 nm confirmó la localización de la señal de hibridación sobre las células anormales.

EJEMPLO 5

ENRIQUECIMIENTO CITOMÉTRICO DE CÉLULAS QUE EXPRESAN E6, E7 DE HPV EN UNA MUESTRA HETEROGÉNEA PARA CITOLOGÍA CERVICAL

Puesto que las muestras para citología cervical contienen numerosos tipos celulares que incluyen, pero no se limitan a, células ectocervicales escamosas, células endocervicales columnares, PMNs (leucocitos polimorfonucleares) y linfocitos, se desarrolló un cóctel de anticuerpos para ser utilizado junto con el Ensayo de HPV en Célula con objeto de distinguir los tipos celulares de interés en una muestra para LBC. Para distinguir entre células ectocervicales, células endocervicales y PMNs en las preparaciones para LBC de los sujetos bajo estudio, las muestras de células cervicales fueron teñidas con una combinación de CD16, un marcador de neutrófilos, y CAM 5.2, un anticuerpo que detecta una citoqueratina con 70 kDa de peso molecular que se expresa en células endocervicales pero no en células ectocervicales. Las células que se teñían para un marcador particular fueron retroacotadas ("backgated") para identificar su presencia en los acotamientos de las dispersiones lumínicas frontal y ortogonal (dispersión lateral a 90°), para distinguir entre células ectocervicales, células endocervicales y PMNs. Véase, Grundhoefer y Patterson, *Determination of Liquid-Based Cervical Cytology Specimen Adequacy Using Cellular Light Scatter and Flow Cytometry*, CYTOMETRY 46: 340-344 (2001). Como se muestra en las Figuras 4A-4I, se identificaron las células ectocervicales en muestras de células cervicales normales (WNL) y anormales (HGSIL) acotando para una falta de expresión de CD16 y CAM 5.2 (CD16⁻, CAM 5.2⁻) (Figura 4A, dos primeras cajas) y se analizaron las células ectocervicales en cuanto a la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV usando el Ensayo de HPV en Célula del presente invento, utilizándose 100 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula como punto de corte para determinar el porcentaje de células de una muestra que expresan mRNA de E6, E7 de HPV (Figura 4A, tercera caja). El porcentaje anotado en la esquina superior derecha de cada una de las Figuras 4B-4I indica el porcentaje de células en las muestras de HGSIL (Figuras 4B-4E) y WNL (Figuras 4F-4I), que expresan más de 100 copias de mRNA de HPV por célula. De forma similar, se puede analizar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en células endocervicales utilizando una estrategia de acotamiento que permita identificar la expresión de CD16⁻, CAM 5.2⁺.

EJEMPLO 6

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL ENSAYO DE HPV EN CÉLULA FRENTE AL FROTIS DE PAP PARA DETECTAR SILs ANORMALES EN UNA COHORTE DE ALTO RIESGO

Para explorar las condiciones premalignas en LBCs, se obtuvieron muestras para LBC de una cohorte de alto riesgo que consistía en 41 mujeres con citología cervical normal y 41 mujeres con citología cervical anormal. Como se describió en el Ejemplo 4, las células anormales son identificadas por una relación de núcleo a citoplasma característicamente elevada mientras que las células epiteliales escamosas normales presentan una relación de núcleo a citoplasma baja. Las mujeres con las células anormales consistían en las citologías siguientes: 9 ASCUS, 22 LGSIL y 10 HGSIL. Para los fines de este experimento, el corte cuantitativo para un resultado positivo en cuanto a mRNA de E6, E7 de HPV fue ajustado a 2 desviaciones estándares de la media de negativos verdaderos. Las células cervicales fueron teñidas con CD16 y CAM 5.2 (como se describió en el Ejemplo 5) e hibridadas (como se describió en el Ejemplo 1). Las células ectocervicales se diferenciaron de las células endocervicales tanto por las dispersiones lumínicas frontal y ortogonal como por la expresión de CAM 5.2 en las células endocervicales pero no en las células ectocervicales (Ejemplo 5, Figura 4A). Las células ectocervicales revestidas con neutrófilos se eliminaron del análisis por la presencia de tinción CD16⁺. El Ensayo de HPV en Célula permitió detectar mRNA de E6, E7 de HPV en 5 de 9 muestras de ASCUS, 13 de 22 muestras de LGSIL, 10 de 10 muestras de HGSIL y 3 de 41 muestras de citología cervical normal (WNL). Dos de las 3 muestras normales tenían mRNA de E6, E7 de HPV, confirmado por una RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando sondas Taqman. Similarmente al procedimiento usado en el Ejemplo 3, las células fueron consideradas positivas para mRNA de E6, E7 de HPV si presentaban una MFI superior a 200 copias por célula. Como testigos, se incluyeron células HeLa HPV⁺ y células C33A HPV⁻ en cada prueba. El porcentaje de células que expresaban mRNA de E6, E7 de HPV se correlacionaba positivamente con el diagnóstico citológico, como se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

CITOLOGÍA	% DE HPV EN CÉLULA ELEVADO	% DE HPV EN CÉLULA BAJO	% DE HPV EN CÉLULA MEDIANO	RENDIMIENTO DEL ENSAYO DE HPV EN CÉLULA
WNL	5,6	0,1	0,5	3/41
ASCUS	7,3	0,1	1,9*	5/9
LGSIL	12,7	0,1	2,7**	13/22
HGSIL	46,1	2,1	13,9***	10/10

*ASCUS>WNL, $p<0,05$

**LGSIL>WNL, $p<0,01$; LGSIL>ASCUS, no significativo

***HGSIL>WNL, $p<0,001$; HGSIL>ASCUS, $p<0,001$; HGSIL>LGSIL, $p<0,001$

El porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV en HGSILs fue significativamente mayor que el porcentaje de células que expresan en WNLs ($p<0,001$), ASCUS ($p<0,001$) y LGSILs ($p<0,001$). Similarmente, el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV en LGSILs fue significativamente mayor que el porcentaje de células que expresan en WNLs ($p<0,01$) pero no significativamente mayor que el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV en ASCUS, lo que sugiere que las alteraciones moleculares en ASCUS se parecen más fielmente a LGSIL que a HGSIL. La sensibilidad y la especificidad globales del Ensayo de HPV en Célula para las lesiones de grado elevado fueron 100% y 93%, respectivamente.

EJEMPLO 7

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL ENSAYO DE HPV EN CÉLULA CON EL ENSAYO HC II PARA HPV PARA DETECTAR SILs ANORMALES EN UNA COHORTE DE BAJO RIESGO

Para comparar la capacidad del Ensayo de HPV en Célula y el Ensayo HC II para HPV para detectar lesiones cervicales de grado elevado, se obtuvieron 149 muestras para LBC de una cohorte de bajo riesgo con las citologías siguientes: 109 WNL, 21 ASCUS, 5 LGSIL, 12 HGSIL, y 2 con cáncer cervical invasivo identificado por examen citológico. En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis comparativo. Como se discutió previamente, el Ensayo de HPV en Célula permite examinar la presencia de mRNA de E6, E7 de HPV mientras que el Ensayo HC II para HPV permite explorar la presencia de DNA de HPV de alto riesgo, tal como, por ejemplo, HPV-16 y HPV-18.

TABLA 2

	CITOLOGÍA	ENSAYO DE HPV EN CÉLULA	ENSAYO HC II PARA HPV
	WNL	10/109	13/109
	ASCUS	14/21	9/21
	LGSIL	4/5	3/5
	HGSIL	8/12	8/12
	carcinoma de células escamosas	2/2	1/2
SENSIBILIDAD	≥HGSIL	71,4%	64,2%
ESPECIFICIDAD	≥HGSIL	91%	88%

Similarmente a los resultados que atañían a la cohorte de alto riesgo (Ejemplo 6), el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV detectadas mediante el Ensayo de HPV en Célula se correlacionaba positivamente con los diagnósticos citológicos. Usando la HGSIL y el cáncer cervical invasivo como punto final, la sensibilidad y la especificidad del Ensayo de HPV en Célula para detectar anomalías cervicales fueron 71,4% y 91%, respectivamente, y la sensibilidad y la especificidad del Ensayo HC II para HPV para detectar anomalías cervicales fueron 64,2% y 88%, respectivamente. Tanto el Ensayo de HPV en Célula como el Ensayo HC II para

HPV permitieron detectar 8 de 12 HGSILs, pero el Ensayo de HPV en Célula también permitió identificar un cáncer cervical invasivo que no se vio por RT-PCR en tiempo real (datos no mostrados) ni mediante el Ensayo HC II para HPV.

Las siguientes realizaciones de la descripción se numeran como Realizaciones 1 a 28 y se refieren a:

- 5 1. Un ensayo para determinar una transformación maligna de células cervicales, que comprende las operaciones de:
 - (a) obtener células cervicales de un individuo;
 - (b) preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC; del inglés, *liquid-based cytology*); y
 - (c) hibridar la muestra para LBC utilizando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV,
- 10 en donde la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica transformación maligna de las células cervicales.
2. El ensayo de la Realización 1, que comprende además
 - (d) cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV por célula mediante citometría de flujo.
3. El ensayo de la Realización 2, en donde la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
- 15 4. El ensayo de la Realización 3, en donde la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
5. El ensayo de la Realización 4, en donde la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
- 20 6. El ensayo de la Realización 2, en donde la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
7. El ensayo de la Realización 1, en donde las células cervicales son seleccionadas del grupo que consiste en células normales, células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS; del inglés, *abnormal squamous cells of undetermined significance*), células con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LGSILs; del inglés, *low grade squamous intraepithelial lesions*) y células con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HGSILs; del inglés, *high grade squamous intraepithelial lesions*).
- 25 8. Un método para explorar a un paciente en cuanto a la transformación maligna de células cervicales, que comprende identificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales.
9. El método de la Realización 8, en donde las células cervicales son seleccionadas del grupo que consiste en células normales, células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HGSILs).
- 30 10. El método de la Realización 8, en donde el mRNA de E6, E7 de HPV se identifica utilizando hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV.
11. El método de la Realización 10, en donde el mRNA de E6, E7 de HPV se cuantifica utilizando citometría de flujo.
- 35 12. El método de la Realización 11, en donde la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
13. El método de la Realización 10, en donde la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
- 40 14. El método de la Realización 11, en donde la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
15. El método de la Realización 8, en donde la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
16. El método de la Realización 8, en donde el mRNA de E6, E7 de HPV se identifica utilizando hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV.
- 45 17. Un método para explorar a un paciente con células cervicales anormales en cuanto a células cervicales premalignas, que comprende cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales, en donde células que expresan 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indican células con potencial ma-

ligno y células que expresan menos de 200 copias de mRNA de E6, E7 de HPV indican células benignas.

18. El método de la Realización 17, en donde las células cervicales anormales son seleccionadas del grupo que consiste en células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HGSILs).
- 5 19. El método de la Realización 17, en donde el mRNA de E6, E7 de HPV se identifica utilizando hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV.
20. El método de la Realización 19, en donde el mRNA de E6, E7 de HPV se cuantifica utilizando citometría de flujo.
21. Un ensayo para identificar tipos de células cervicales malignamente transformadas, que comprende las operaciones de:
- 10 (a) obtener células cervicales de un individuo;
- (b) preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC);
- (c) teñir las células cervicales con una combinación de CD16 y CAM 5.2; y
- (d) hibridar la muestra para LBC empleando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV,
- 15 en donde se identifican neutrófilos por tinción CD16⁺, se identifican células endocervicales columnares por tinción CD16⁻, CAM 5.2⁺, y se identifican células ectocervicales escamosas por tinción CD16⁻, CAM 5.2⁻, y la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV indica transformación maligna de las células cervicales.
22. El ensayo de la Realización 21, que comprende además:
- (e) cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV por célula mediante citometría de flujo.
- 20 23. El ensayo de la Realización 22, en donde la expresión de 2 a 1000 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
24. El ensayo de la Realización 23, en donde la expresión de 5 a 750 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
25. El ensayo de la Realización 24, en donde la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
- 25 26. El ensayo de la Realización 22, en donde la expresión de 200 o más copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula indica transformación maligna de las células cervicales.
27. El ensayo de la Realización 21, en donde células endocervicales columnares malignamente transformadas indican un estado cervical de preadenocarcinoma o adenocarcinoma.
- 30 28. El ensayo de la Realización 27, en donde células ectocervicales escamosas malignamente transformadas indican un estado cervical de carcinoma de células pre-escamosas o carcinoma de células escamosas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ensayo *in vitro* para determinar una transformación maligna de células cervicales, ensayo que comprende identificar y cuantificar la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV en las células cervicales sobre una base por célula, en que la transformación maligna de las células cervicales viene indicada por la expresión de 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula.
2. El ensayo de la reivindicación 1, en que las células cervicales son seleccionadas del grupo que consiste en células normales, células escamosas anormales de significación indeterminada (ASCUS), células con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LGSILs) y células con lesiones intraepiteliales de grado elevado (HGSILs).
- 10 3. El ensayo de la reivindicación 1 o 2, en el que el mRNA de E6, E7 de HPV se identifica usando una hibridación *in situ* con oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV.
4. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que la expresión de mRNA de E6, E7 de HPV por célula es cuantificada usando citometría de flujo.
5. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en que se cuantifica el porcentaje de células que expresan 10 a 500 copias de mRNA de E6, E7 de HPV por célula.
- 15 6. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además preparar las células cervicales como una muestra para citología de base líquida (LBC).
7. El ensayo de la reivindicación 6, que comprende además hibridar la muestra para citología LBC usando oligonucleótidos específicos para mRNA de E6, E7 de HPV.
- 20 8. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además teñir las células cervicales con una combinación de CD16 y CAM 5.2, en que los neutrófilos son identificados por una tinción CD16⁺, las células endocervicales columnares son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁺, y las células ectocervicales escamosas son identificadas por una tinción CD16⁻, CAM 5.2⁻.
9. El ensayo de la reivindicación 8, en que células endocervicales columnares malignamente transformadas indican un estado cervical de preadenocarcinoma o adenocarcinoma
- 25 10. El ensayo de la reivindicación 8, en que células ectocervicales escamosas malignamente transformadas indican un estado cervical de carcinoma de células preescamosas o carcinoma de células escamosas.
- 30 11. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además correlacionar el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV con un diagnóstico citológico, en que el diagnóstico citológico es HGSIL cuando el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV es significativamente mayor que el porcentaje de células que expresan mRNA de E6, E7 de HPV en WNLs ($p < 0,001$), ASCUS ($p < 0,001$) y LGSIL ($p < 0,001$), o el diagnóstico citológico es LGSIL cuando el porcentaje de células que expresan E6, E7 de HPV es significativamente mayor que el porcentaje de células que expresan E6, E7 de HPV en WNL ($p < 0,01$).
12. El ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, llevado a cabo en un método para la exploración de una paciente en cuanto a la transformación maligna de células cervicales.

35

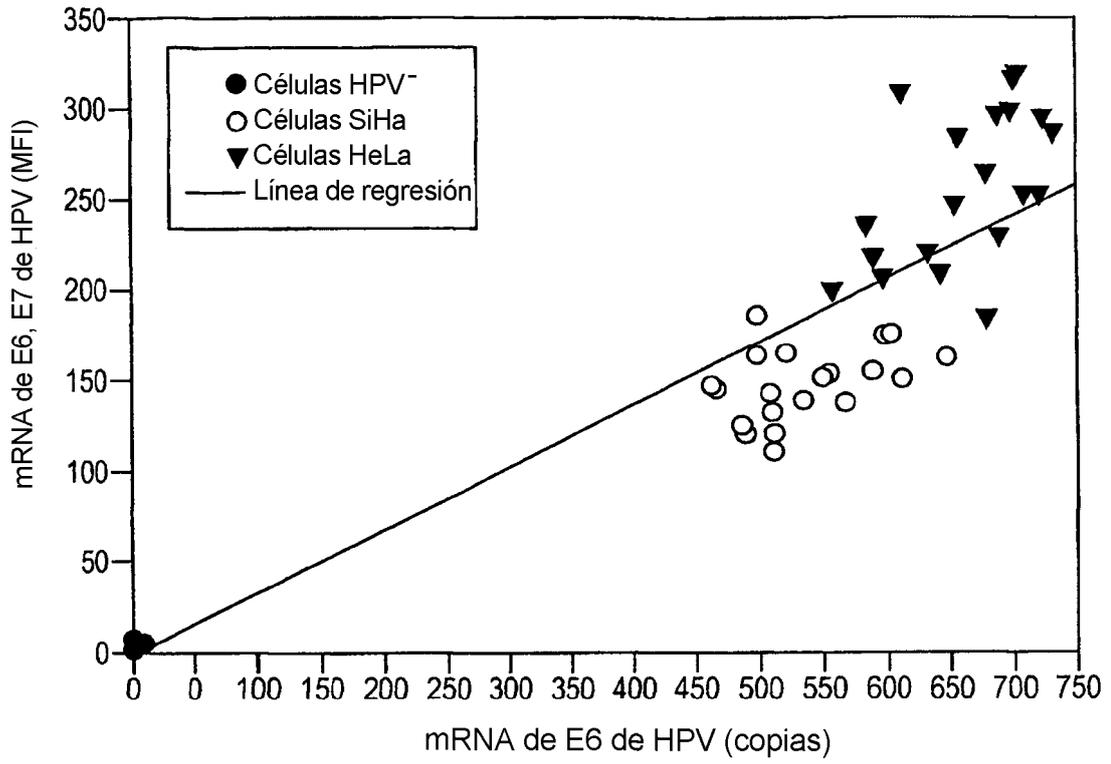


FIG. 1

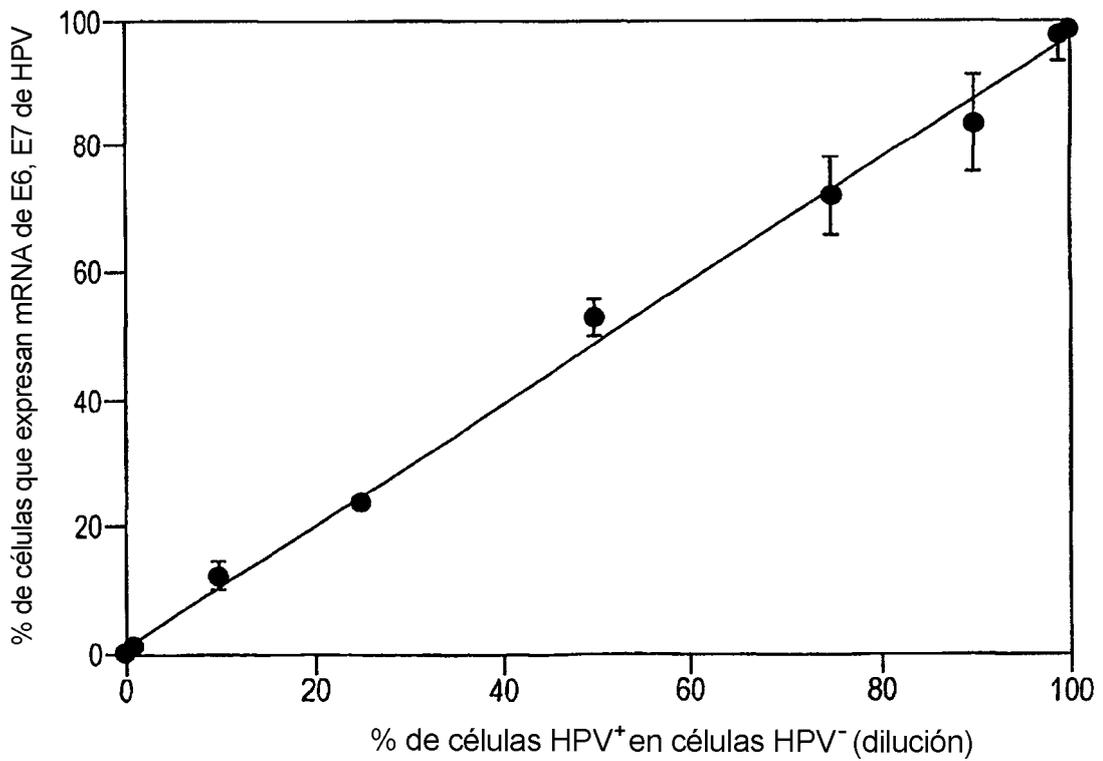


FIG. 2

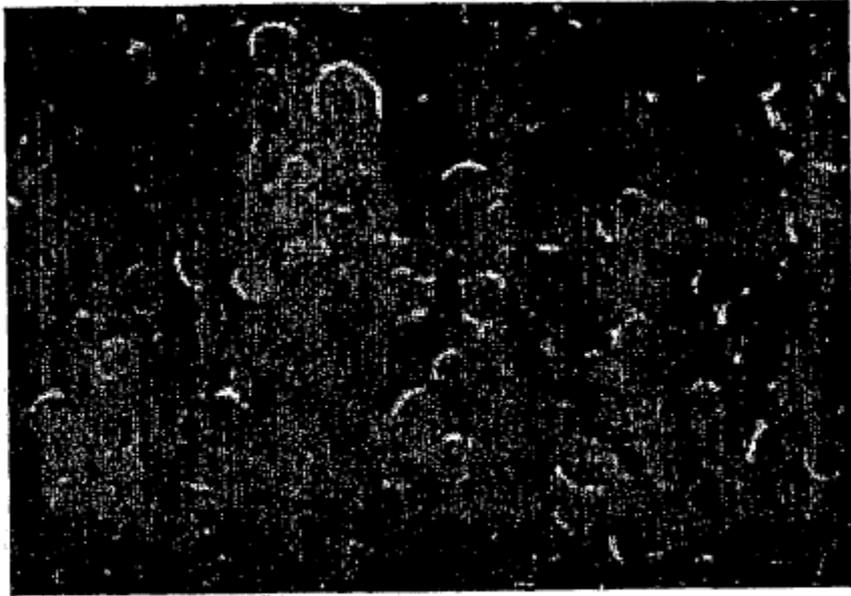


FIG. 3A

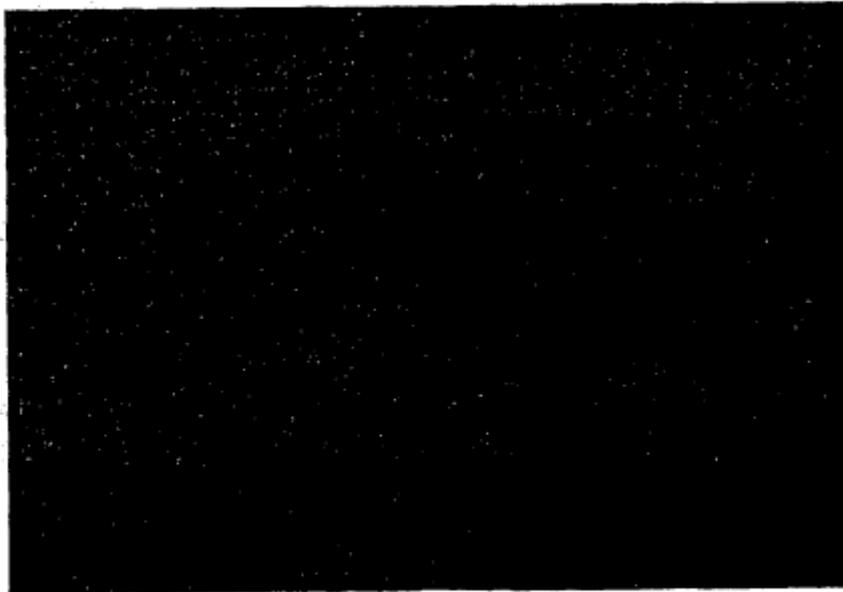


FIG. 3B

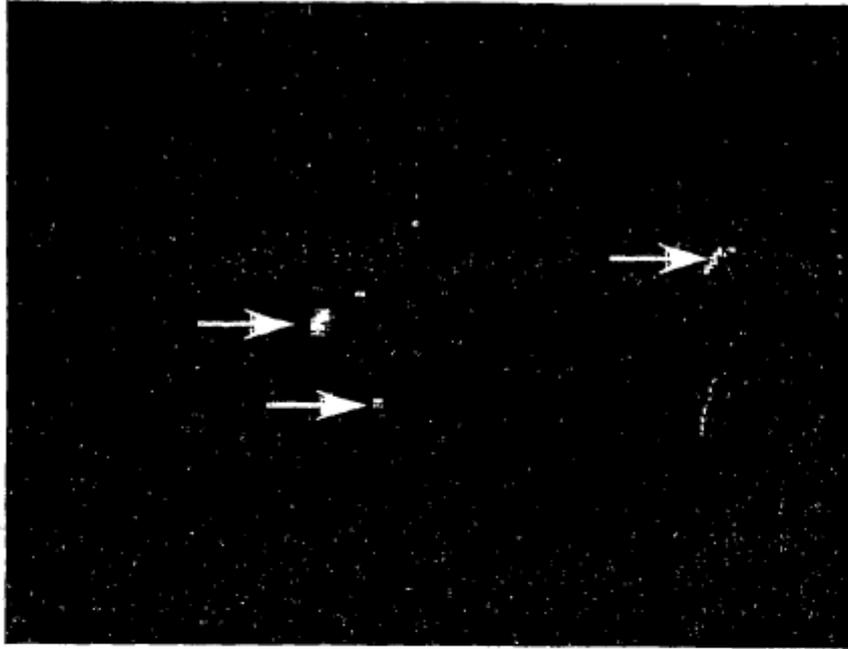


FIG. 3C

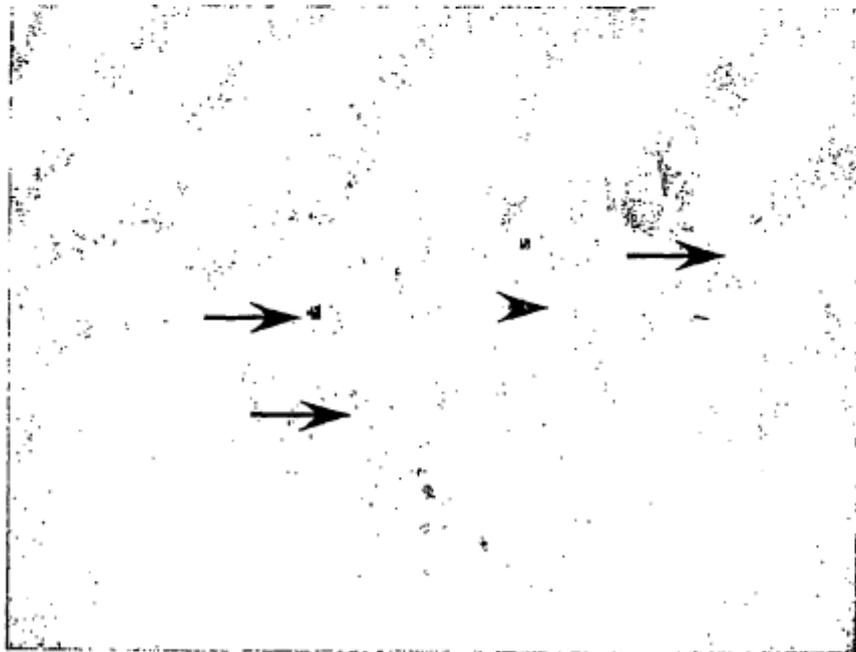


FIG. 3D

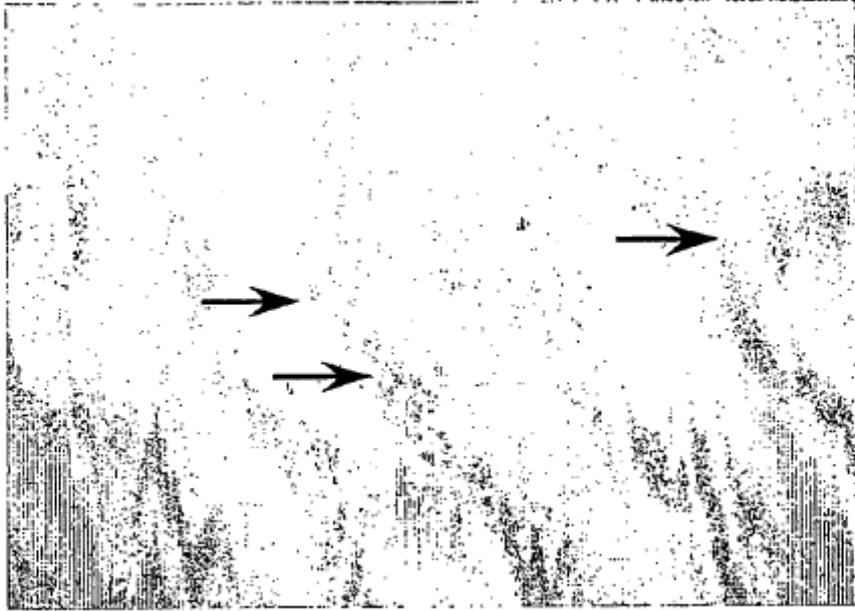


FIG. 3E

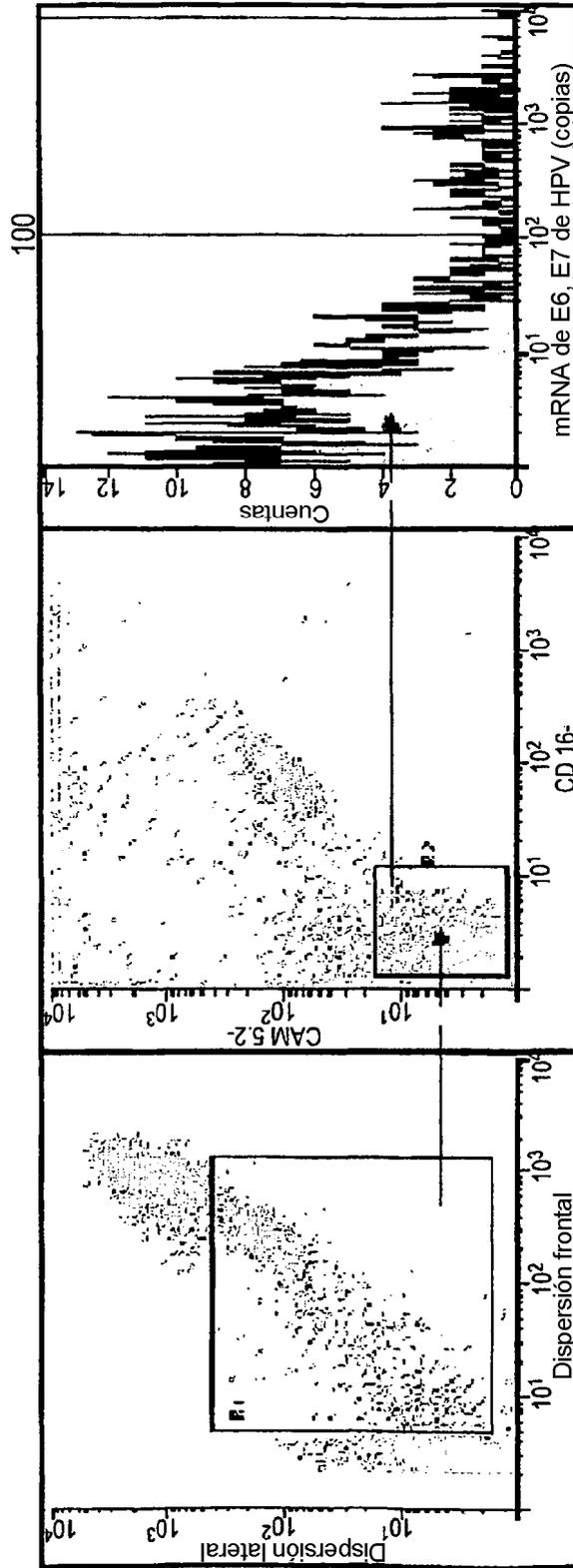


FIG. 4A

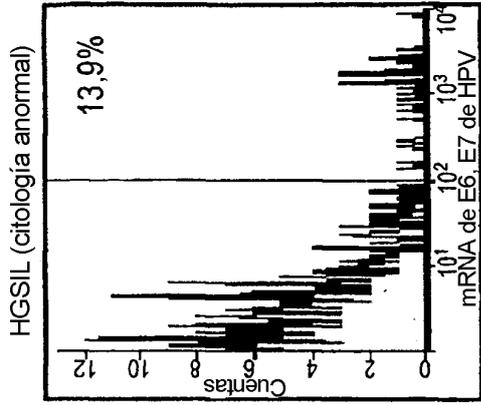


FIG. 4E

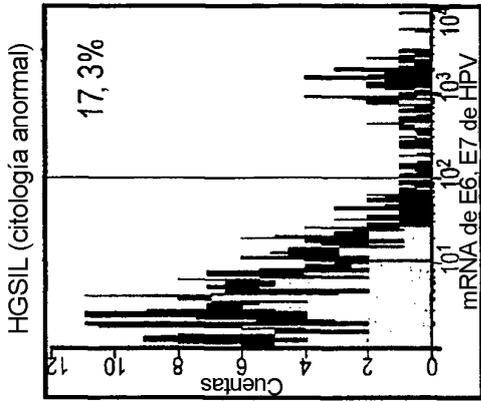


FIG. 4D

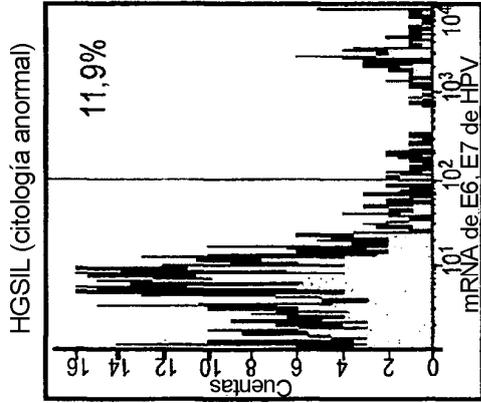


FIG. 4C

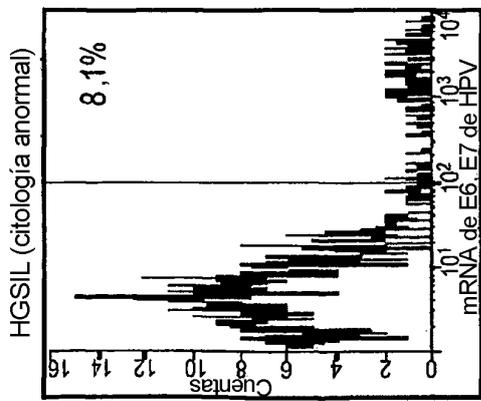


FIG. 4B

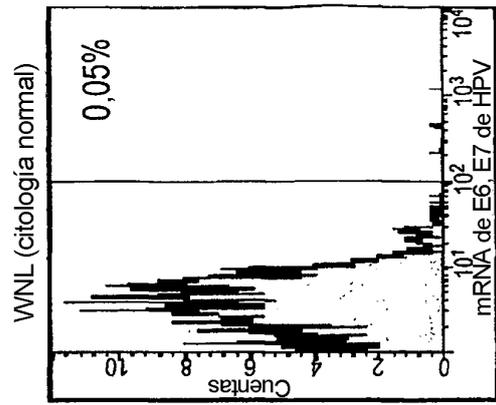


FIG. 4I

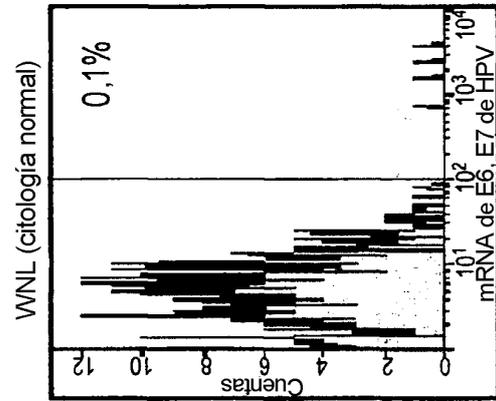


FIG. 4H

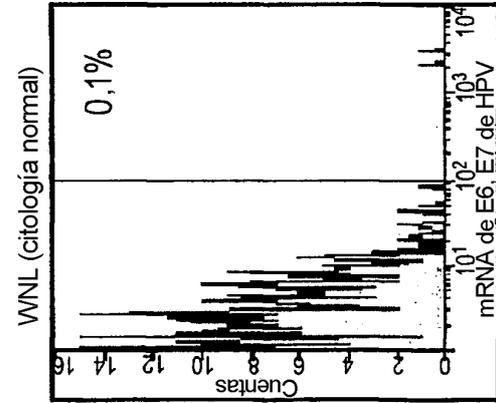


FIG. 4G

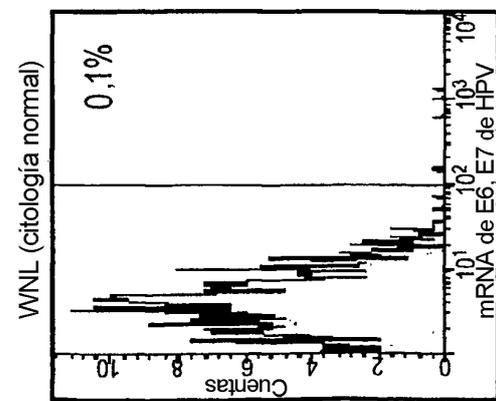


FIG. 4F