

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 069**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2011 PCT/US2011/060270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12065004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2011 E 11839907 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2638396**

54 Título: **Métodos y sistemas para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) a partir de una muestra de células cervicales**

30 Prioridad:

09.05.2011 US 201161484142 P
12.11.2010 US 413302 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2017

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:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 069 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

Métodos y sistemas para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) a partir de una muestra de células cervicales

Introducción

- 5 El frotis de Papanicolaou (PAP) ha sido la piedra angular del cribado del cáncer cervical desde 1949. Por definición, el frotis de PAP es una tinción realizada en células extendidas en un portaobjeto y visualizadas al microscopio. Tras la aparición de la citología cervical en base líquida (LBC, por sus siglas en inglés), se obtenían células del cuello del útero utilizando un cepillo, suspendido en una solución fijadora, y a continuación se aplicaban a un portaobjeto previamente a la tinción. Los citotécnicos y citopatólogos sumamente cualificados, revisan los portaobjetos en busca de evidencias de células anormales, según se indica por las características en la Tabla 1.

Tabla 1

Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LSIL)	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado (HSIL)
cavitación	Relación N/C* (Aumento moderado-marcado)
Relación N/C (aumento leve)	Cromatina gruesa
Hiper Cromatismo	Hiper Cromatismo
	Contorno nuclear irregular
	Células anormales individuales
	Pleomorfismo
*N/C = relación del núcleo con respecto al citoplasma	

- 15 Debido a la necesidad de utilizar portaobjetos para el frotis de PAP, otros biomarcadores utilizados para el cribado del cáncer, especialmente aquellos utilizados para la detección molecular del ADN del VPH, se realizan en un alícuota de LBC aparte. Aunque algunos biomarcadores tales como p16 pueden analizarse en un portaobjeto, el rendimiento no es el deseable para admitir los 60-70 millones de muestras citológicas cervicales obtenidas cada año en los Estados Unidos y las más de 150 millones de muestras en todo el mundo. Además, las técnicas moleculares realizadas en un portaobjeto son complicadas y consumen mucho tiempo, características que no son susceptibles de ser utilizadas en el cribado del cáncer cervical.

- 20 Clínicamente, el frotis de PAP y las pruebas del VPH se utilizan en conjunto aunque son tecnologías muy dispares. El frotis de PAP tiene una sensibilidad (50%) relativamente baja, y una especificidad (90%) relativamente alta para lesiones cervicales de alto grado (lesiones pre-cancerosas cervicales y cáncer cervical). Por el contrario, las pruebas del ADN del VPH tienen una alta sensibilidad (>90%) pero baja especificidad (30%) para lesiones cervicales de alto grado (lesiones pre-cancerosas cervicales y cáncer cervical). Estas características de rendimiento han apoyado el uso combinado de estas pruebas para un cribado eficaz del cáncer cervical. Algunos investigadores han impulsado el uso exclusivo de la detección del VPH para el cribado del cáncer cervical (cribado primario del VPH), sin embargo las pruebas actuales del ADN del VPH carecen de la especificidad proporcionada por una evaluación morfológica al utilizar el frotis de PAP, lo que hace que surja una preocupación por la abrumadora cantidad de procedimientos de colposcopia/biopsia innecesarios. Por tanto, el reemplazo del frotis de PAP por una única prueba de VPH sigue siendo extremadamente controvertido.

Compendio

- 35 La presente invención se define por las reivindicaciones anexas. Cualquier contenido identificado en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que exceda el alcance de la invención según está representado por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada, sino que se utiliza únicamente como información de referencia para una mejor comprensión de la invención.

- 40 Se proporcionan métodos para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Los aspectos de los métodos incluyen obtener datos morfométricos además de datos de biomarcadores y/o datos de células no específicas a partir de una muestra celular cervical líquida sometiendo la muestra a ensayo en suspensión, y a continuación utilizar los diferentes tipos de datos para predecir si el sujeto tiene una lesión CIN. También se proporcionan sistemas que se utilizan en la práctica de dichos métodos. Los métodos y sistemas se utilizan en una variedad de aplicaciones, entre las que se incluyen aplicaciones en el cribado del cáncer cervical.

Entre los aspectos de la invención se incluyen métodos para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia

5 intraepitelial cervical (CIN). En algunos casos, los métodos incluyen obtener datos de una muestra líquida marcada de células cervicales en suspensión del sujeto, en donde los datos comprenden datos morfométricos y datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de biomarcadores, datos de contenido de ADN, datos de porcentaje de nucleación, y combinaciones de los mismos; y predecir a partir de los datos si el sujeto tiene una lesión CIN, por ejemplo, una lesión CIN2+.

10 La predicción puede estar caracterizada por una sensibilidad del 85% o más y/o una especificidad del 85% o más. Los datos pueden obtenerse analizando la muestra líquida con un dispositivo de citometría de flujo, por ejemplo, en un método que incluye hacer fluir la muestra hasta pasar por una fuente de iluminación y uno o más detectores ópticos. Los datos morfométricos pueden incluir datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de dispersión frontal de luz, datos de dispersión lateral de luz, datos de imágenes y combinación de los mismos. En algunos casos, la muestra líquida marcada es una muestra líquida marcada con un biomarcador, en donde los datos comprenden datos de biomarcadores, y en donde los datos de biomarcadores comprenden datos de cuantificación de biomarcadores por célula, en donde los datos de cuantificación de biomarcadores por células pueden incluir datos de detección de marcadores fluorescentes. En algunos casos, el método además comprende preparar la muestra líquida de células cervicales marcada con biomarcadores. La muestra líquida de células cervicales marcada con biomarcadores puede prepararse poniendo en contacto una muestra inicial de células cervicales con una sonda de un biomarcador marcada con fluorescencia que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical. El biomarcador del cáncer cervical puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, ácido nucleico (tal como ácido nucleico de E6, E7) o proteína (p. ej., p16, E6,E7) del VPH. El método puede incluir poner en contacto la muestra inicial de células cervicales con dos o más sondas de un biomarcador marcadas con fluorescencia, cada una de las cuales se une específicamente a un biomarcador diferente del cáncer cervical. En algunos casos, las células en la muestra inicial de células cervicales se fijan y permeabilizan previamente a ser puestas en contacto con una sonda de un biomarcador marcada con fluorescencia que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical. En algunos casos, el método comprende además la recomendación de una biopsia cervical si se determina que existen células anormales presentes en la muestra. En algunos casos, la muestra líquida marcada es una muestra líquida con ADN marcado, en donde los datos comprenden datos del contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, o ambos.

Entre los aspectos de la invención también se incluyen sistemas que comprenden:

- un canal de flujo;
- una fuente de luz configurada para dirigir luz a una región de ensayo del canal de flujo;
- 30 un primer detector configurado para recibir luz desde la región de ensayo del canal de flujo y producir datos morfométricos;
- un segundo detector configurado para recibir luz desde la región de ensayo del canal de flujo y producir datos adicionales;
- y
- 35 un módulo de procesamiento de señal configurado para recibir los datos morfométricos y adicionales del primer y el segundo detector y generar un resultado predictivo sobre si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) en base tanto a los datos morfométricos como a los datos adicionales. Los sistemas pueden configurarse para realizar los métodos de la invención, incluyendo aquellos analizados anteriormente.

40 Entre los aspectos de la invención se incluyen además métodos para determinar la presencia de una célula cancerosa en una muestra de células de un sujeto, donde el método comprende: obtener datos de una muestra líquida marcada de células cervicales en suspensión del sujeto, en donde los datos comprenden datos morfométricos y datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de biomarcadores, datos de contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, y combinaciones de los mismos; y determinar a partir de los datos si una célula cancerosa se encuentra presente en la muestra. Los datos pueden obtenerse analizando la muestra líquida con un dispositivo de citometría de flujo, por ejemplo, en un método que incluye hacer fluir la muestra hasta pasar por una fuente de iluminación y uno o más detectores ópticos. Los datos morfométricos pueden incluir datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de dispersión frontal de luz, datos de dispersión lateral de luz, datos de imágenes y una combinación de los mismos. En algunos casos, la muestra líquida marcada es una muestra líquida marcada con un biomarcador, en donde los datos comprenden datos de biomarcadores, y en donde los datos de biomarcadores comprenden datos de cuantificación de biomarcadores por célula, en donde los datos de cuantificación de biomarcadores por células pueden incluir datos de detección de marcadores fluorescentes. En algunos casos, el método además comprende preparar la muestra líquida de células cervicales marcada con biomarcadores. La muestra líquida de células cervicales marcada con biomarcadores puede prepararse poniendo en contacto una muestra inicial de células cervicales con una sonda de un biomarcador marcado con fluorescencia que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical. El biomarcador del cáncer cervical puede ser un ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico (tal como ácido nucleico de E6, E7) o una proteína (p. ej., p16, E6,E7) del VPH. El método puede incluir poner en contacto la muestra inicial de células cervicales con dos o más sondas de unos biomarcadores marcados con fluorescencia, cada una de las cuales se une específicamente a un biomarcador diferente del cáncer cervical. En algunos casos, las células en la muestra inicial de células cervicales se fijan y

permeabilizan previamente a ser puestas en contacto con una sonda de un biomarcador marcado con fluorescencia que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical. En algunos casos, el método comprende además la recomendación de una biopsia cervical si se determina que existen células anormales presentes en la muestra. En algunos casos, la muestra líquida marcada es una muestra líquida con ADN marcado, en donde los datos comprenden datos del contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, o ambos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un instrumento configurado para utilizar la relación de aspecto contra un gráfico de puntos de un área para identificar células únicas intactas (acotadas) en una muestra de citología cervical en base líquida (LBC).

La FIG. 2 muestra la identificación de células anormales en una muestra de LBC por el análisis de la relación N/C (núcleo-citoplasma) utilizando el instrumento configurado como en la FIG. 1. El aumento en las relaciones N/C son un indicativo de células anormales.

Las FIGs. 3A y 3B muestran ejemplos de datos obtenidos para células únicas en una muestra de LBC. Para cada célula, se muestra una imagen del campo luminoso, una imagen que muestra la hibridación del ARNm de E6/E7 (FITC), una imagen que muestra la cuantificación de ADN (DAPI), y una imagen que muestra una superposición de imágenes del E6/E7 y el DAPI. La FIG. 3A muestra las células que tienen una relación N/C elevada y que tienen un contenido de ADN anormal. La FIG. 3B muestra que las células con una relación N/C baja son negativas en E6/E7 y tienen un contenido de ADN normal.

La FIG. 4 es un gráfico de puntos que muestra que la sobreexpresión del ARNm de E6/E7 se observa en células que han aumentado el contenido de ADN. El análisis del ciclo celular se determinó utilizando un reactivo de tinción de ADN (DAPI; eje X) y el ARNm de E6/E7 se detectó por hibridación de sondas de ARNm de E6/E7 (FITC; eje Y). Las células anormales (con sobreexpresión de E6/E7 y un aumento en el contenido de ADN) se indican en el acotamiento.

Las FIGs. 5A y B muestran gráficos de puntos que muestran las relaciones N/C (eje Y) y el contenido de ADN (eje X) de muestras de LBC para identificar células anormales. La FIG. 5A muestra gráficos de puntos de las relaciones N/C contra el contenido de ADN de células cervicales normales (panel superior) y células cervicales con LSIL (panel inferior). La FIG. 5B muestra gráficos de puntos de las relaciones N/C contra el contenido de ADN de células cervicales con HSIL (paneles superior e inferior). Esta alternativa utiliza únicamente 1 reactivo de tinción, es decir, el reactivo de tinción no específica del ADN.

La FIG. 6 muestra un gráfico de puntos de dispersión lateral (ortogonal) de luz combinada (eje Y) y volumen electrónico (eje X) de células en una muestra de citología cervical. Este gráfico muestra que diferentes células en la muestra pueden ser definidas utilizando estos parámetros morfométricos. Los cuatro diferentes acotamientos identifican detritus, células ectocervicales, células endocervicales, y leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Dicho acotamiento (del inglés *gating*) puede emplearse para acotar las células de interés para analizarlas de acuerdo con aspectos de la presente invención.

Descripción detallada

Se proporcionan métodos para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Los aspectos de los métodos incluyen obtener datos morfométricos además de datos de biomarcadores y/o datos de células no específicas a partir una muestra celular cervical líquida, sometiendo la muestra a ensayo en suspensión, y a continuación utilizar los diferentes tipos de datos para predecir si el sujeto tiene una lesión CIN. También se proporcionan sistemas que se utilizan en la práctica de los métodos. Los métodos y sistemas se utilizan para una variedad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones para el cribado del cáncer cervical.

Antes de que la presente invención se describa en mayor detalle, ha de entenderse que esta invención no está limitada a las realizaciones descritas en particular, ya que las mismas pueden, por supuesto, variar. También ha de entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones en particular, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención será limitada únicamente por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente indique lo contrario, entre el límite superior y el inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor intermedio o expresado en dicho intervalo establecido, se encuentra comprendido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden ser incluidos independientemente en los intervalos más pequeños, y también están comprendidos en la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de aquellos límites incluidos, también se incluyen en la invención.

Se presentan en la presente memoria ciertos intervalos con valores numéricos que están precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se utiliza en la presente patente para proporcionar soporte literal

para el número exacto al que precede, además de un número que está cerca de o que es aproximadamente el número el término al que precede. A la hora de determinar si un número está cerca de o es aproximadamente un número específicamente detallado, el número cercano a o aproximado no detallado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente detallado.

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que la presente invención pertenece. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente memoria pueden también utilizarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales representativos ilustrativos.

10 Ha de señalarse que, tal como se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas en singular "uno", "una", y "el/la" incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto claramente indique lo contrario. Ha de señalarse además que las reivindicaciones pueden estar redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta exposición pretende ser utilizada como base antecedente para el uso de dicha terminología de exclusión tal como "exclusivamente", "únicamente" y similares con respecto a la indicación de los
15 elementos de las reivindicaciones, o al uso de una limitación "negativa".

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por razones de claridad, se describen en el contexto de realizaciones independientes, pueden ser proporcionadas en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por razones de brevedad, se describen el contexto de una única realización, pueden además proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada.

20 Cualquier método indicado puede ser realizado en el orden de eventos indicado o en cualquier orden que sea lógicamente posible.

A la hora de describir adicionalmente las realizaciones de la invención, los aspectos de las realizaciones de los métodos se describirán primero en mayor detalle. A continuación, se analizan las realizaciones de los sistemas que pueden ser utilizados en la práctica de los métodos de la invención.

25 Métodos

Tal como se ha analizado anteriormente, las realizaciones de la invención están dirigidas a métodos para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) o cáncer cervical. El término "lesión CIN" (conocido también en la técnica como displasia cervical) se utiliza en su sentido convencional para hacer referencia al crecimiento anormal de células escamosas en la superficie del cérvix. Tal como se conoce en la técnica, las
30 lesiones CIN pueden clasificarse histológicamente como CIN1, CIN2/3, CIN2 y CIN3. Las lesiones CIN1 son aquellas lesiones que se encuentran limitadas a un 1/3 basal del epitelio, y tiene el menor riesgo de evolucionar a una lesión cancerosa, en relación a las demás categorías de las lesiones. Las lesiones CIN2 se caracterizan por una displasia moderada limitada a los 2/3 basales del epitelio. Las lesiones CIN3 (algunas veces denominadas por los expertos en la técnica como carcinoma cervical in situ), están clasificadas por la presencia de una displasia severa que atraviesa más de 2/3 del epitelio. La categoría CIN2/3 (es decir, CIN2+) en conjunto hace referencia tanto a
35 lesiones CIN2 como CIN3.

Las realizaciones de la invención se caracterizan por predecir la presencia de una lesión CIN en un sujeto con un alto grado de sensibilidad y especificidad. Por predecir se entiende pronosticar o prever la presencia de una lesión CIN en el sujeto sin realmente tomar una biopsia del cérvix del sujeto. Los términos sensibilidad y especificidad se
40 utilizan en su sentido convencional. Como tal, la sensibilidad es una medida de la proporción de los resultados positivos reales (en oposición a falsos positivos) que se identifican correctamente, mientras que la especificidad es una medida de los resultados negativos que se identifican correctamente. Las realizaciones de la invención pueden predecir la presencia o ausencia de cualquier tipo de lesión CIN. Las realizaciones de la invención pueden además predecir el tipo de lesión CIN, p. ej., si la lesión CIN es una lesión CIN1, CIN2+, CIN2 o CIN3. Las realizaciones de
45 los métodos realizan esta predicción, por ejemplo si una lesión está presente, qué tipo de lesión está presente (tal como si está presente una lesión CIN2+), con un alto grado de sensibilidad y especificidad. En algunos casos, la sensibilidad es del 85% o más, tal como del 90% o más, incluyendo el 95% o más. En algunos casos, la especificidad es del 85% o más, tal como el 87% o más, incluyendo el 90% o más.

Entre los aspectos de los métodos se incluye obtener ambos de los siguientes: (1) datos morfológicos y (2) datos de biomarcadores y/o datos de células no específicas a partir de una muestra líquida etiquetadas de células cervicales en suspensión del sujeto, por ejemplo, una muestra líquida marcada con uno o ambos de entre un
50 marcador de un biomarcador y un marcador de célula no específica. En otras palabras, se recoge una muestra líquida de células cervicales del sujeto, en la que las células cervicales están en suspensión en un medio fluido (p. ej., tal como se describe en mayor detalle a continuación), y se somete a ensayo para obtener tanto datos
55 morfológicos como datos de biomarcadores/células no específicas. Por tanto, una muestra líquida marcada de acuerdo con aspectos de los métodos puede ser una muestra líquida marcada con un biomarcador, una muestra líquida marcada con una célula no específica, o una muestra líquida marcada con un biomarcador y una célula no específica. La muestra líquida marcada de células cervicales que se somete a ensayo puede proporcionarse de

acuerdo a cualquier protocolo apropiado.

En una realización, una muestra inicial de células cervicales fluida se prepara tomando una muestra de células del cérvix y combinándola con un medio fluido adecuado. Puede emplearse cualquier protocolo adecuado para recoger células cervicales. Entre los ejemplos de protocolos de interés se incluyen protocolos que emplean un dispositivo de cepillo cervical o citocepillo para recoger células de la superficie del cérvix y el endocérvix. Se proporcionan descripciones de ejemplos de dispositivos de recogida de células cervicales que pueden utilizarse en los métodos de la invención en las Patentes de Estados Unidos Nos. 2.955.591; 3.626.470; 3.815.580; 3.877.464; 3.881.464; 3.945.372; 4.127.113; 4.175.008; 4.700.713; 4.754.764; 4.762.133; 4.754.764; 4.873.992; 4.862.899; 4.953.560; 5.445.164; 5.787.891; 5.795.309; 6.387.058 y 6.740.049.

Después de la recogida, la muestra de células puede ser combinada con un medio líquido adecuado, según se desee. Los medios líquidos de interés incluyen, pero no se limitan a: solución salina, o salina equilibrada (tales como solución salina equilibrada de Hanks, un medio de cultivo tisular mínimo fundamental (MEM), solución POLYSAL™, y suero fisiológico); medios para citología, p. ej., un medio universal de toma de muestras del inglés Universal Collection Medium (UCM); el medio universal de toma de muestras descrito en la Patente de Estados Unidos N° 7.371.518 (cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia); Medio de transporte de muestras estándar (STM, por sus siglas en inglés), medio fluido PRESERVCYT™ (Cytoc, Inc. (Boxborough, Massachusetts)); medio fluido CytoRich™ (TriPath, Inc. (Burlington, Carolina del Norte); y similares.

Cuando se desee, la muestra recogida inicial puede ser evaluada para determinar su idoneidad previamente a proceder más adelante en el proceso. Por ejemplo, se puede someter un alícuota de la muestra a un análisis de dispersión de luz para determinar si están presentes las células adecuadas en la muestra, por ejemplo, según se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.329.167; cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia.

Después de la preparación, la muestra inicial fluida de células cervicales puede fijarse y/o permeabilizarse según se desee. Como tales, los métodos de la invención incluyen fijar la muestra de células poniendo la muestra en contacto con un reactivo de fijación adecuado. Los reactivos de fijación de interés son aquellos que fijan las células en un punto de tiempo deseado. Puede emplearse cualquier reactivo de fijación apropiado, donde los reactivos de fijación adecuados incluyen, pero no se limitan a: formaldehído, paraformaldehído, formaldehído/acetona, metanol/acetona, IncellFP (IncellDx, Inc) etc. Por ejemplo, se ha observado que el paraformaldehído utilizado en una concentración final de aproximadamente 1 a 2% es un buen fijador de entrecruzamiento. En algunos casos, las células en la muestra se permeabilizan poniendo en contacto las células con un reactivo de permeabilización. Los reactivos de permeabilización de interés son reactivos que permiten que las sondas de biomarcadores marcadas, por ejemplo, según se describe en mayor detalle más adelante, accedan al entorno intracelular. Puede emplearse cualquier reactivo apropiado, donde los reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a: detergentes suaves, tales como Triton X-100, NP-40, saponina, etc.; metanol, y similares. Puede también ser deseable marcar las células con un control positivo de metal pesado, por ejemplo un intercalador de ADN marcado con un metal pesado, por ejemplo iridio, etc. Las células pueden además someterse a tinción con un colorante de viabilidad previamente a la fijación, por ejemplo, bromuro de etidio, yoduro de propidio, DAPI, RhCl₃, etc., según se desee.

En determinadas realizaciones, y tal como se ha analizado anteriormente, la muestra que se somete a ensayo para obtener datos morfométricos y datos de biomarcadores es una muestra marcada con un biomarcador. Por consiguiente, la muestra es una que ha sido marcada con uno o más biomarcadores de interés. Por "muestra marcada con un biomarcador" se entiende una muestra que se puesto en contacto con una sonda de un biomarcador marcada (p. ej., tal como se describe en mayor detalle a continuación), que se une específicamente a un biomarcador de interés si el biomarcador se encuentra presente en una muestra de células. Los biomarcadores de interés incluyen, pero no se limitan a, biomarcadores del cáncer cervical. Los biomarcadores del cáncer cervical son un indicador distintivo biológico u obtenido biológicamente, por ejemplo ácidos nucleicos o proteínas, cuya presencia está asociada o unida con la predisposición de un sujeto a desarrollar cáncer cervical o a la presencia de cáncer cervical en un sujeto. Por consiguiente, los biomarcadores de interés incluyen ácido nucleico y analitos de proteínas cuya presencia y/o cantidad en una célula puede ser utilizada para realizar una predicción de, al menos, la predisposición de un sujeto a sufrir un cáncer cervical. Los biomarcadores de interés incluyen, pero no se limitan a: productos de expresión del VPH de genes del VPH, tal como los genes del VPH L1, L2, E2, E4, E5, E6 o E7; inhibidores de quinasa dependientes de ciclinas, por ejemplo, p14, p15INK4b, p16 (es decir, p16INK4a tal como se describe en Serrano, M., et al., Nature, 1993 Dic. 16; 366(6456): 704-7), p18INK4c, p19INK4d, p21WAF1/CIP1 y p27KIP1; proteínas reguladoras del ciclo celular, por ejemplo, p14ARF; microARN específicos o alteraciones del cromosoma 3q asociadas con cáncer cervical, tal como se describe en la publicación de Patente de los Estados Unidos N° No. 20100234445 (cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia); etc.

La muestra de células cervicales líquida marcada con un biomarcador que se somete a ensayo en los métodos de la invención, puede ser preparada utilizando cualquier protocolo de marcaje apropiado. En algunas realizaciones, la preparación de la muestra líquida marcada con un biomarcador incluye poner en contacto una muestra inicial de células cervicales con una sonda de un biomarcadores marcada que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical. Dependiendo del ensayo en particular que se va a realizar, la muestra inicial puede combinarse con una única sonda de un biomarcadores marcada, o dos o más sondas distintas de biomarcadores marcada que se

unen a diferentes biomarcadores con una composición molecular diferente, donde el número de dichas sondas de biomarcadores marcadas distintas puede ser dos o más, por ejemplo, tres o más, cuatro o más, etc; por ejemplo, cuando el ensayo es un ensayo multiplex para dos o más biomarcadores.

5 A la hora de poner en contacto la muestra inicial con la sonda o sondas de un biomarcador marcada, la muestra se combina con una o más sondas de un biomarcador para producir una mezcla de reacción. Las sondas de un biomarcador marcadas que son de interés incluyen un dominio de unión específico y un dominio de un marcador. El dominio de unión específico comprende un ligando de captura que se une específicamente al biomarcador de interés. Dependiendo del ensayo en particular, el biomarcador de interés puede ser una variedad de diferentes tipos de moléculas, incluyendo pero sin limitarse a: proteínas, polipéptidos, proteoglicanos, glicoproteínas y los respectivos fragmentos de estas moléculas; ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN y ARN, tal como ARNm, etc. El ligando de captura es por lo tanto un ligando que se une a la molécula de un biomarcador de interés, en donde el ligando de captura puede por supuesto variar dependiendo del tipo específico de molécula del biomarcador a ser detectada, por ejemplo, un anticuerpo para un biomarcador proteico, un oligonucleótido para un biomarcador de ARNm. En determinadas realizaciones, la afinidad entre un ligando de captura y la molécula del biomarcador a la que se une específicamente, cuando están unidas de forma específica entre sí en un complejo de unión, está caracterizada por una KD (constante de disociación) de 10^6 M o menos, 10^7 M o menos, 10^8 M o menos, 10^9 M o menos, 10^{10} M o menos, 10^{11} M o menos, 10^{12} M o menos, 10^{13} M o menos, 10^{14} M o menos, incluyendo 10^{15} M o menos.

20 Tal como se indica anteriormente, puede emplearse una variedad de diferentes tipos de agentes de unión específicos como ligandos de captura, en los que el tipo de agente de unión en particular se selecciona en base, al menos en parte, al tipo en particular de molécula del biomarcador de interés. Los agentes de unión específicos de interés incluyen agentes de unión a anticuerpos, proteínas, péptidos, haptenos, ácidos nucleicos, etc. El término "agente de unión a anticuerpos" tal como se utiliza en la presente memoria incluye anticuerpos policlonales o monoclonales o fragmentos que son suficientes para unirse a un analito de interés. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser, por ejemplo, fragmentos Fab monoméricos, fragmentos Fab' monoméricos, o fragmentos F(ab)'2 diméricos. Además dentro del alcance del término "agente de unión a anticuerpos" se encuentran las moléculas producidas por ingeniería de anticuerpos, tales como moléculas de anticuerpos de cadena única (scFv) o anticuerpos humanizados o quiméricos producidos a partir de anticuerpos monoclonales por el reemplazo de regiones constantes de las cadenas pesada y ligera para producir anticuerpos quiméricos, o el reemplazo de ambas regiones constantes y de las partes de la región armazón de las regiones variables para producir anticuerpos humanizados. Los agentes de unión al ácido nucleico que son de interés, son ácidos nucleicos que se unen de forma específica a ácidos nucleicos de biomarcadores en una célula. La longitud de estos ácidos nucleicos puede variar, siempre que sea suficiente para que el oligonucleótido se utilice como un agente de unión específico, y en algunos casos se sitúa en un intervalo de 13 a 100 nt, tal como de 14 a 50 nt, por ejemplo, de 15 a 25 nt. Los oligonucleótidos que constituyen estos agentes de unión al ácido nucleico pueden ser ADN o ARN, o un análogo sintético de los mismos, según se desee.

Además del dominio de unión específico, las sondas de un biomarcador marcadas incluyen además un marcador detectable. Son de interés como marcadores detectables los colorantes fluorescentes. Se pueden seleccionar colorantes fluorescentes (fluoróforos) de entre cualquiera de los diversos colorantes adecuados para su uso en aplicaciones de toma de imágenes (por ejemplo, citometría de flujo). Un gran número de colorantes se encuentran disponibles comercialmente a partir de una variedad de fuentes, tales como, por ejemplo, Molecular Probes (Eugene, OR) y Exciton (Dayton, OH). Entre los ejemplos de fluoróforos de interés se incluyen, pero sin limitarse a, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico; acridina y derivados tales como acridina, naranja de acridina, amarillo de acridina, rojo de acridina, e isotiocianato de acridina; ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS); disulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 (amarillo Lucifer VS); N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; amarillo brillante; cumarina y derivados tales como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120), 7-amino-4-trifluorometilcouluarina (Coumaran 151); cianina y derivados tales como cianosina, Cy3, Cy5, Cy5.5, y Cy7; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5', 5"-dibromopirogalol-sulfoneftaleina (rojo de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina; dietilaminocoumarina; pentaacetato de dietilentriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilben-2,2'-disulfónico; ácido 4,4'-diisotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico; cloruro de 5-[dimetilamino]naftalen-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados tales como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), clorotriazinil fluoresceína, naftofluoresceína, y QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; Proteína verde fluorescente (GFP); Proteína fluorescente de coral (RCFP, del inglés Reef Coral Fluorescent Protein); Lisamina™; Lisamina rodamina, amarillo Lucifer; isotiocianato de verde Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto-cresolftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo del Niño; verde Oregón; Rojo de Fenol; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil-1-pireno; rojo reactivo 4 (Cibacron™ rojo brillante 3B-A); rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), lisamina de 4,7-diclororodamina, cloruro de sulfonilo de rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina, sulforrodamina 101(rojo de Texas), N,N,N',N-tetrametil-6-carboxirhodamina (TAMRA), tetrametilrodamina, y

isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelado de terbio; xanteno; o combinaciones de los mismos. Pueden también utilizarse otros fluoróforos o combinaciones de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo aquellos disponibles a partir de Molecular Probes (Eugene, OR) y Exciton (Dayton, OH).

- 5 Cuando se emplean distintas sondas de un biomarcador marcadas, el marcador de cada sonda distinta puede elegirse para proporcionar una señal distinguible. Por ejemplo, en las realizaciones en las que se emplean una primera y una segunda sonda de un biomarcador marcada distintas, el marcador de la segunda sonda es un marcador fluorescente que produce una señal fluorescente que es distinguible de la primera señal del marcador de la primera sonda. Por consiguiente, la primera y la segunda señal fluorescente producidas ante la excitación del primer y segundo marcador fluorescente son distinguibles entre sí, lo que significa que ambas pueden ser detectadas al mismo tiempo y que la señal de una no modifica o cambia la señal de la otra. Cada marcador distinto puede producir señales que son distinguibles de cualquier otro marcador. Por ejemplo, las células pueden estar coloreadas con un tercer marcador fluorescente que produzca una tercera señal fluorescente que sea distinguible de la primera y la segunda señal fluorescente.
- 10
- 15 En algunos casos, la sonda de un biomarcador marcada que se emplea es una sonda de oligonucleótidos del E6, E7 del VPH marcada con fluorescencia. Tales sondas pueden variar en longitud, oscilando en algunos casos de 13 a 100 nt, tal como de 14 a 50 nt, por ejemplo, de 15 a 25 nt. La secuencia en particular de dichas sondas puede variar. Las secuencias específicas de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellas que se encuentran en el cóctel de sondas del kit de detección de ARNm del E6, E7 OncoTect™ del VPH (incellDx, Menlo Park, CA).
- 20 Entre los ejemplos de secuencias de sonda específicas para el gen E6/E7 (o ARNm) del VPH se incluyen aquellas descritas en Faulkner-Jones et al. (J. Virol Methods 1993 vol. 41 páginas 277-296).

Se proporcionan a continuación las secuencias de la Tabla 1 de Faulkner-Jones et al., la cual muestra dichos ejemplos de secuencias de sonda específicas de E6/E7 del VPH.

Tipo de VPH	Región	Secuencia (5'-3')
6b/11	E6 + E7	TTAGGGTAACATGTCTTCCATGCATGTTGT (SEQ ID NO:01)
	E7	ACGTTGCTGTACATCCACAGCAACAGGTCA (SEQ ID NO:02)
16	E6	TGCAACAAGACATACATCGACCGGTCCACCGAC (SEQ ID NO:03)
	E7	GGTTACAATATTGTAATGGGCTCTCTCCGG (SEQ ID NO:04)
	E6	TTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAG (SEQ ID NO:05)
18	E6 + E7	TCGAGCACGAATGGCACTGGCCTCTATAGTGCCAG (SEQ ID NO:06)
	E7	GGTCAACCGGAATTTTCATTTTGGGCTCTAAATG (SEQ ID NO:07)
33	E6	CTTGGCACAATCATGCAATGTTCTGGTT (SEQ ID NO:08)

- 25 Ejemplos adicionales de secuencias de sondas para E6/E7 del VPH incluyen aquellas descritas en Plummer et al. (Diagnostic Mol. Path. 1998 vol. 7, páginas 76-84).

Se proporcionan a continuación las secuencias de la Tabla 1 en Plummer et al., la cual muestra dichos ejemplos de secuencias de sonda de E6/E7 del VPH.

Tipo de VPH	Región	Secuencia (5'-3')
VPH16	E6	GTCCTGAAACATTGCAGTTCTCTTTTGGTG (SEQ ID NO:09)
	E6	CTGTGCATAACTGTGGTAACTTTCTGGGTC (SEQ ID NO:10)
	E6	TCACACAACGGTTTGTGATTGCTGTTCT (SEQ ID NO:11)
	E6/E7	TGGGTTTCTCTACGTGTTCTTGATGATCTG (SEQ ID NO:12)
	E7	TAACAGGTCTTCCAAAGTACGAATGTCTAC (SEQ ID NO:13)
	E7	TATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGCACACA (SEQ ID NO:14)

(continuación)

Tipo de VPH	Región	Secuencia (5'-3')
VPH18	E6	AGTGTTTCAGTTCCGTGCACAGATCAGGTAG (SEQ ID NO:15)
	E6	CCTCTGTAAGTTCCAATACTGTCTTGCAAT (SEQ ID NO:16)
	E6	CCTCTATAGTGCCAGCTATGTTGTGAAAT (SEQ ID NO:17)
	E6/E7	TTGTGTTTCTCTGCGTCGTTGGAGTCGTTT (SEQ ID NO:18)
	E7	CTGGCTTCACACI7ACAACACATACACAAC (SEQ ID NO:19)
	E7	TGCTCGAAGTCTGCTGCTGAGCTTTCTAC (SEQ ID NO:20)

5 Las secuencias de sondas específicas del VPH adicionales que se utilizan en los métodos y sistemas descritos en la presente memoria pueden ser designadas y sometidas a ensayo utilizando cualquier metodología para el diseño de sondas apropiada.

10 A la hora de preparar la mezcla de reacción, la muestra puede combinarse con las sondas de biomarcador marcada utilizando cualquier protocolo adecuado. La combinación se puede realizar mediante mezclado, según se desee. El contacto de la muestra con las sondas de biomarcador marcadas se realiza bajo condiciones de incubación que proporcionan la unión de las sondas a sus respectivos marcadores, si se encuentran presentes, en la muestra. En algunos casos, las sondas y los ejemplos se ponen en contacto y se combinan a una temperatura que se encuentra en un intervalo de 15 a 50, tal como por ejemplo de 20 a aproximadamente 40 °C. El contacto puede realizarse con mezclado o agitación, por ejemplo, con vortización etc., para proporcionar una combinación suficiente de los componentes de reacción y la muestra.

15 La mezcla de reacción resultante puede entonces ser mantenida o incubada durante un periodo de tiempo previo al ensayo para obtener datos morfométricos y de biomarcadores, por ejemplo, a través del análisis por citometría de flujo (p. ej., según se describe en mayor detalle más adelante). En algunos casos, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura que se encuentra en un intervalo de 15 a 50, tal como de 20 a aproximadamente 40 °C durante un periodo de tiempo que oscila entre aproximadamente 30 minutos a 72 horas, tal como de 1 hora a 24 horas, incluyendo de 1 hora a 3 horas. A continuación del paso anterior de incubación, la muestra puede someterse a ensayo inmediatamente o almacenarse para su ensayo en un momento posterior. Si se almacena, en algunas realizaciones la muestra se almacena a una temperatura reducida; por ejemplo, en hielo.

20 Cuando se desee, la mezcla de reacción resultante puede ser lavada, por ejemplo, para retirar cualquier sonda no enlazada y otros componentes de la muestra. El lavado puede ser realizado utilizando cualquier protocolo apropiado, por ejemplo, combinando la mezcla de reacción con un tampón de lavado adecuado y separando las células del fluido. Un protocolo de lavado determinado puede incluir uno o más pasos de lavado distintos, según se desee. A continuación de cualquier protocolo de lavado, las células marcadas pueden ser re-suspendidas en un líquido adecuado, por ejemplo, el tampón de lavado u otro tampón, para su posterior análisis, por ejemplo, mediante un análisis de citometría de flujo.

30 En algunas realizaciones, según se describe anteriormente, la muestra de células líquida marcada está marcada (o coloreada) con un colorante celular no específico, ya sea además de o en ausencia de un marcador de biomarcador. Las células pueden ser coloreadas con un colorante no específico utilizando cualquier protocolo apropiado. Son de interés como colorantes celulares no específicos los colorantes específicos de ADN. Los tintes y colorantes que son específicos para el ADN (o que se unen preferentemente a polinucleótidos de doble cadena en contraste con polinucleótidos de cadena única), y por tanto pueden emplearse como colorantes no específicos incluyen, pero no se limitan a: Hoechst 33342 (2'-[4- etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1 H-benzimidazol) y Hoechst 33258 (2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol) y otros de la serie Hoechst; SYTO 40, SYTO 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 22, 23, 24, 25 (verde); SYTO 17, 59 (rojo), DAPI, DRAQ5™ (un colorante de antraquinona con una elevada afinidad para el ADN de doble cadena), YOYO-1, yoduro de propidio, YO-PRO-3, TO-PRO-3, YOYO-3 y TOTO-3, Verde SYTOX, SYTOX, verde de metilo, homodímero de acridina, 7-aminoactinomicina D, 9-amino-6-cloro-2-metoxiactridina. Dependiendo de la tinción y ensayo en particular, la tinción puede utilizarse en la cuantificación del biomarcador, como una indicación del ciclo celular, etc.

45 A continuación de la preparación de la muestra marcada, por ejemplo, según se describe anteriormente, la muestra se somete a ensayo para obtener tanto datos morfométricos como también datos del biomarcador y/o de células no específicas. En algunos casos, el mismo alícuota de la muestra, es decir, la misma cantidad física de la muestra, se somete a ensayo para obtener tanto los datos morfométricos como datos de biomarcadores/ células no específicas. Por consiguiente, estas realizaciones se distinguen de los protocolos en los que un primer alícuota de una muestra se somete a ensayo utilizando un protocolo, por ejemplo, protocolo en base a portaobjetos, para datos morfométricos, y un segundo alícuota de la muestra se somete a ensayo utilizando otro protocolo, por ejemplo, un protocolo de citometría de flujo.

Los datos morfométricos hacen referencia a cualquier tipo de dato del que se pueda obtener información de la morfología de la célula, es decir, información acerca del tamaño, forma y/o estructura de las células. Los datos morfométricos de interés incluyen, pero no se limitan a, datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de dispersión de luz frontal, datos de dispersión de luz lateral, datos de imagen y combinaciones de los mismos. Los parámetros morfológicos de interés incluyen, pero no se limitan a: área nuclear, perímetro, textura o contenidos de frecuencia, posición centroide, forma (es decir, redonda, elíptica, en forma de pesa, etc.), volumen, y relaciones de cualquiera de estos parámetros. Los datos morfométricos obtenidos pueden ser para células como un conjunto o para sub-partes de las mismas, por ejemplo, el citoplasma de células. En algunos casos, los datos morfométricos pueden incluir una designación real de si una célula es normal o anormal, incluyendo el tipo de célula anormal. Por ejemplo, los datos morfométricos pueden, en algunos casos, incluir una designación de que una célula determinada es anormal, por ejemplo que la célula es: una célula escamosa atípica, p. ej., una célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASC-US), células escamosas atípicas sugestivas de lesión de alto grado (ASC-H); lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LGSIL o LSIL); lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HGSIL o HSIL); carcinoma de células escamosas; células glandulares atípicas de significado indeterminado (AGC-NOS); Células endocervicales/glandulares atípicas, con posible AIS o posiblemente neoplásicas (AGC-neoplásicas); y adenocarcinoma in situ (AIS).

Los datos de un biomarcador hacen referencia a cualquier tipo de datos de los que se puede obtener información del biomarcador para la célula. En algunos casos, los datos del biomarcador son datos que incluyen una señal emitida por el marcador de la sonda de un biomarcador marcada que se emplea en el ensayo. Los datos del biomarcador pueden encontrarse en forma de la presencia y la amplitud de la luz emitida, el número de posiciones discretas en una célula u otro objeto a partir del cual se origina(n) la señal o señales de luz, la localización relativa de las fuentes de la señal, y el color (longitud de onda o banda de onda) de la luz emitida en cada posición en la célula. Los datos del biomarcador pueden tomar la forma de datos cualitativos, semi-cualitativos o cuantitativos. Los datos cualitativos son simplemente la presencia o ausencia del biomarcador. Los datos semi-cualitativos son datos que proporcionan alguna indicación de la cantidad, por ejemplo, el número de copias, concentración, etc., del biomarcador en la célula. Por ejemplo, los datos semi-cuantitativos pueden tomar la forma de una indicación de que el número de copias de un biomarcador de interés se encuentra por encima de un determinado número umbral. Los datos cuantitativos proporcionan una indicación de un valor absoluto, por ejemplo, número de copias, cantidad, etc., del biomarcador en la célula. Los datos semi-cuantitativos y cuantitativos pueden denominarse en conjunto como datos de cuantificación de biomarcadores.

En algunos casos, el biomarcador de interés en un ARNm que está presente cuando un sujeto está infectado con una cepa del VPH de alto riesgo. Los ARNm de interés incluyen un ARNm del E6/E7 del VPH. En estas realizaciones, puede determinarse el número de copias absoluto de las especies de ARNm de interés, de tal manera que se obtienen los datos de cuantificación de las especies de ARNm. En algunos casos en los que el biomarcador es el E6, E7 del VPH, se determina la cantidad total de especies de ARNm de E6, E7 por célula. En estos casos, es de interés la identificación de células con 2 o más, tal como 5 o más, incluyendo 10 o más, 50 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más copias de ARNm del E6/E7 del VPH por célula, ya que estas células pueden estar asociadas a la presencia de una lesión CIN en el huésped. En algunos casos, los datos de unos biomarcadores que se obtienen en los métodos de la invención proporcionan información de que hay de 2 a 1000 copias de ARNm de E6, E7 del VPH por célula, por ejemplo, de 5 a 750 copias de ARNm de E6, E7 del VPH por célula, incluyendo de 10 a 500 copias de ARNm de E6, E7 del VPH por célula. En algunos casos, los datos del biomarcador que se obtienen son los datos del número de copias de ARNm de E6, E7 del VPH por célula según se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.524.631, cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia. La determinación del número de copias puede incluir comparar una única copia con un control adecuado, por ejemplo, según se proporciona por un colorante de ADN no específico (tal como se describe a continuación), por un valor de referencia, etc.

En algunos casos, también se obtienen mediciones fotométricas. Las mediciones fotométricas permiten la determinación de la densidad óptica, la densidad óptica del citoplasma, la densidad óptica de fondo, y las relaciones de estos valores.

Los datos de células no específicas son cualquier tipo de datos a partir de los cuales puede obtenerse información de células no específicas (es decir, biomarcadores de no especificidad) para las células en la muestra. En algunos casos, los datos de células no específicas son datos que incluyen una señal emitida por un colorante celular no específico que se emplea en el ensayo. Los datos de células no específicas pueden encontrarse en forma de la presencia y amplitud de la luz emitida, el número de posiciones discretas en una célula u otro objeto a partir del cual se origina(n) la señal o señales de luz, la localización relativa de las fuentes de la señal, y el color (longitud de onda o banda de onda) de la luz emitida en cada posición en la célula. Los datos de células no específicas pueden tomar la forma de datos cualitativos, semi-cuantitativos o cuantitativos. Por ejemplo, los datos de células no específicas cuantitativos o semi-cuantitativos pueden incluir datos sobre el contenido de ADN de una célula, obtenidos utilizando un colorante de ADN (p. ej., según se ha descrito anteriormente). Otros datos cuantitativos incluyen volumen electrónico (EV). Por tanto, los datos de células no específicas pueden proporcionar una indicación de un valor absoluto o relativo, por ejemplo, número de copias, cantidad, etc., del componente celular no específico en la célula. Los datos semi-cuantitativos y cuantitativos pueden denominarse de forma conjunta como datos de cuantificación de células no específicas. Los datos de células no específicas cualitativos pueden proporcionar información con

respecto a la presencia o ausencia de una característica en particular de una célula. Por ejemplo, en células coloreadas con un colorante de ADN, puede determinarse la presencia o ausencia de un núcleo celular (p. ej., el número de células nucleadas en una muestra, también denominado porcentaje de nucleación).

Se observa que cuando múltiples marcadores distintos han de ser detectados en una única muestra líquida de células marcada, por ejemplo, marcadores de sondas de biomarcadores y colorantes celulares no específicos en una única muestra, los marcadores y colorantes empleados pueden elegirse para proporcionar una señal distinguible (según se describe anteriormente para utilizar múltiples sondas de biomarcadores en una única muestra). Por ejemplo, en realizaciones en las que se emplean una sonda de un biomarcador marcada y un colorante de ADN, el marcador para la sonda de un biomarcador es un marcador fluorescente que produce una señal fluorescente que es distinguible de la señal fluorescente del colorante de ADN. Por consiguiente, las señales fluorescentes producidas ante la excitación de la sonda del biomarcador y del colorante de ADN son distinguibles unas de otras, lo que significa que ambas pueden ser detectadas al mismo tiempo y que la señal de una no modifica o cambia la señal de la otra. Cada marcador distinto puede producir señales que son distinguibles de cualquier otro marcador. Por ejemplo, las células pueden ser coloreadas con tres marcadores fluorescentes que producen tres señales fluorescentes distintas que son distinguibles entre sí tras su excitación.

Los anteriores tipos de datos, por ejemplo, los datos morfométricos, de biomarcadores, y datos de células no específicas, pueden obtenerse a partir del mismo alícuota de la muestra utilizando cualquier protocolo apropiado. En algunos casos, se emplea un protocolo de citometría de flujo que recopila cada tipo de datos. La citometría de flujo es una metodología bien conocida que utiliza datos multi-paramétricos para identificar y distinguir entre diferentes tipos de partículas (p. ej., células), es decir, partículas que varían de una a otra en términos de marcadores (longitud de onda, intensidad), tamaño, etc., en un medio fluido. A la hora de analizar por citometría de flujo la muestra preparada según se ha descrito anteriormente, un alícuota de la muestra se introduce en primer lugar en el conducto de flujo del citómetro de flujo. Cuando se encuentran en el conducto del flujo, las células en la muestra se hacen pasar sustancialmente una cada vez a través de una o más regiones de detección, en las que cada una de las células es expuesta por separado individualmente a una fuente de luz en una única longitud de onda (o en algunos casos dos o más fuentes de luz distintas) y se registran por separado para cada célula las medidas de los parámetros morfométricos, por ejemplo, los parámetros de dispersión de la luz, y/o los parámetros de los biomarcadores, por ejemplo, emisiones fluorescentes, según se desee. Los datos registrados para cada célula se analizan en tiempo real o se almacenan en un medio de almacenamiento y análisis de datos, tal como un ordenador, para su posterior análisis, según se desee.

De forma más específica, en un citómetro de flujo, las células se hacen pasar, en suspensión, sustancialmente una a la vez en un conducto de flujo a través de una o más regiones de detección, donde en cada región cada célula es iluminada por una fuente de energía. La fuente de energía puede incluir un iluminador que emite luz de una única longitud de onda, tal como la proporcionada por un láser (por ejemplo, He/Ne o argón) o una lámpara de arco de mercurio con unos filtros apropiados. Por ejemplo, puede utilizarse luz a 488 nm como una longitud de onda de emisión en un citómetro de flujo con una única región de detección. Para citómetros de flujo que emiten luz en dos longitudes de onda distintas, pueden emplearse longitudes de onda de emisión de luz adicionales, en las que las longitudes de onda específicas de interés incluyen, pero no se limitan a: 535 nm, 635 nm, y similares.

En series con una región de detección, se utilizan detectores, por ejemplo, colectores de luz, tales como tubos fotomultiplicadores (o "PMT"), colectores de imágenes (p. ej., en forma de dispositivos de carga acoplada (CCDs)), etc., para registrar la luz que pasa a través de cada célula (denominada en general dispersión de luz frontal), la luz que se refleja ortogonal a la dirección del flujo de las células a través de la región de detección (generalmente denominada dispersión de luz ortogonal o lateral), y la luz fluorescente emitida de las células, si están marcadas con un marcador o marcadores fluorescentes, a medida que las células atraviesan la región de detección y son iluminadas por la fuente de energía. Cada tipo de dato que se obtiene, por ejemplo, dispersión de luz frontal (o FSC), dispersión de luz ortogonal (SSC), y emisiones fluorescentes (FL1, FL2, etc.) e imagen, etc., comprende un parámetro individual para cada célula (o cada "evento").

Los citómetros de flujo además incluyen medios de adquisición de datos, análisis y registro, tales como un ordenador, en donde múltiples canales de datos registran datos de cada detector para los datos morfométricos y de biomarcadores emitidos por cada célula a medida que pasa a través de la región de detección. El propósito del sistema de análisis es clasificar y realizar un conteo de las células, en donde cada célula se presenta a sí misma como un conjunto de valores paramétricos digitalizados. A lo hora de someter a las células a ensayo por citometría de flujo, el citómetro de flujo puede estar ajustado para activarse en un parámetro seleccionado para distinguir las células de interés del ruido de fondo. "Activarse" hace referencia a un umbral preestablecido para la detección de un parámetro. Se utiliza habitualmente como un medio para detectar el paso de la célula a través del haz láser. La detección de un evento que excede el umbral para el parámetro seleccionado activa la adquisición de datos de la dispersión de luz y de la fluorescencia para la célula. Los datos no se adquieren para células u otros componentes en el medio que se está sometiendo a ensayo que cause una respuesta por debajo del umbral. El parámetro de activación puede ser la detección de luz dispersa frontal causada por el paso de una célula a través del haz de luz. El citómetro de flujo entonces detecta y recoge los datos de la dispersión de luz y la fluorescencia para la célula.

Una subpoblación de interés en particular se analiza entonces mediante acotamiento de subpoblaciones de interés

5 (“gating) en base a los datos recogidos para la población total. Para seleccionar un acotamiento apropiado, los datos se representan gráficamente para obtener la mejor separación de subpoblaciones posible. Este procedimiento se realiza habitualmente representando la dispersión de luz frontal (FSC) vs. la dispersión de luz lateral (es decir, ortogonal) (SSC) en un gráfico de puntos bidimensional. El operador del citómetro de flujo selecciona entonces la subpoblación de células deseada (es decir, aquellas células dentro del acotamiento) y excluye las células que no se encuentran dentro del acotamiento. Cuando se desee, el operador puede seleccionar el acotamiento dibujando una línea alrededor de la subpoblación deseada utilizando un cursor en una pantalla del ordenador. Únicamente aquellas células dentro del acotamiento se analizan entonces en más detalle, representando gráficamente los demás parámetros para estas células, tales como la fluorescencia.

10 Puede emplearse cualquier citómetro de flujo que sea capaz de obtener tanto datos morfométricos como datos de biomarcadores/células no específicas, por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, a partir del mismo alícuota de una muestra líquida. Son de interés los sistemas de citómetro de flujo descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6211955, 6249341, 6256096, 6473176, 6507391, 6532061, 6563583, 6580504, 6583865, 6608680, 6608682, 6618140, 6671044, 6707551, 6763149, 6778263, 6875973, 6906792, 6934408, 6947128, 6947136, 6975400, 7006710, 7009651, 7057732, 7079708, 7087877, 7190832, 7221457, 7286719, 7315357, 7450229, 7522758, 7567695, 7610942, 7634125, 7634126, 7719598.

20 Los datos morfométricos y de biomarcadores/células no específicas obtenidas del mismo alícuota de la muestra de células cervicales, por ejemplo, tal como se describe anteriormente, se emplean para saber si el sujeto tiene una lesión CIN, tal como se ha descrito anteriormente. Pueden emplearse diversas combinaciones de datos morfométricos, de biomarcadores, y de células no específicas a la hora de realizar una predicción de si un sujeto tiene una lesión CIN. Las combinaciones de interés incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: a) análisis de la relación núcleo - citoplasma (N/C) (por ejemplo, para identificar células anormales) combinado con cuantificación del ARNm de E6, E7; b) análisis de la relación N/C combinada con un análisis del ciclo celular, según se determina por tinción con DAPI y fluorescencia verde de la señal de hibridación del ARNm del E6, E7; c) análisis de la relación N/C combinada con el análisis del ciclo celular según se determina por tinción de p16 y fluorescencia verde de la señal de hibridación del ARNm del E6, E7; d) análisis de la relación N/C combinado con un análisis del ciclo celular según se determina por tinción con DAPI (u otro colorante de ADN), etc.

Las relaciones N/C aumentadas o elevadas incluyen relaciones N/C que son de 0,25 o mayor, de 0,30 o mayor, 0,4 o mayor, 0,5 o mayor, 0,6 o mayor, 0,7 o mayor, 0,8 o mayor, 0,9 o mayor, 0,95 o mayor, etc.

30 Además de la relación N/C, puede utilizarse la evaluación del área nuclear (NA) como dato morfométrico. Las células en una muestra de células cervicales con un aumento del área nuclear, por ejemplo, en comparación con núcleos en células escamosas normales intermedias, pueden identificarse como células anormales. Las células anormales pueden tener una relación de área nuclear con respecto a área nuclear (área nuclear de la célula de interés/ área nuclear de célula escamosa intermedia normal) de 1,25 o más, 1,75 o más, 2,0 o más, 2,25 o más, 2,75 o más, 3,0 o más, 3,25 o más, 3,5 o más, etc. Se observa aquí que utilizando observaciones por microscopía estándar, la precisión de la estimación del área nuclear es baja (ver, p. ej., Schmidt et al., 2008, "Visual estimates of nucleus-to-nucleus ratios: can we trust our eyes to use the Bethesda ASCUS and LSIL size criteria?" *Cáncer* 114(5):287-93. Aspectos de la presente invención proporcionan una evaluación más precisa y reproducible del área nuclear.

40 Pueden también emplearse parámetros de datos adicionales a la hora de analizar las células en la muestra de células cervicales, incluyendo dispersión de luz lateral (ortogonal), dispersión frontal, y volumen electrónico (EV; una medida del tamaño de la célula; en base al principio de Coulter). Dichos parámetros se utilizan a la hora de identificar poblaciones o sub-poblaciones de células en la muestra que van a ser analizadas para determinar la presencia de células anormales (ver, p.ej., la FIG. 6 y su descripción en la presente patente). Por ejemplo, el análisis del contenido de ADN (por ejemplo, utilizando DAPI) permite la diferenciación de células escamosas enucleadas de las nucleadas.

50 En algunos casos, los métodos incluyen determinar que la muestra celular sometida a ensayo incluye células cancerosas. En estas realizaciones, los métodos incluyen identificar la presencia de una o más células cancerosas en la muestra, en las que la identificación se realiza en base a datos morfométricos y de biomarcadores, por ejemplo, según se describe anteriormente. Dichas realizaciones pueden o no incluir la predicción de la presencia de CIN en un sujeto, ya que los métodos de estas realizaciones identifican la presencia de células cancerosas reales en la muestra.

55 En algunos casos, la predicción de la presencia de una lesión CIN se realiza dentro de un corto periodo de tiempo a continuación de la introducción de la muestra en el citómetro. Por consiguiente, pueden proporcionarse resultados a un usuario en un periodo de 6 horas o menos, tal como 3 horas o menos, por ejemplo, 2 horas o menos, incluyendo 1 hora o menos. Cuando se desee, el tiempo de ensayo total que va desde la obtención de la muestra del sujeto hasta la entrega del resultado al sujeto es de 6 horas o menos, tal como 5 horas o menos, por ejemplo, 4 horas o menos, incluyendo 3 horas o menos, por ejemplo, 2 horas o menos.

En algunos casos, los métodos además incluyen realizar análisis adicionales de un sujeto si los métodos tienen

como resultado la predicción de una lesión CIN en el sujeto. Por ejemplo, cuando los métodos de la invención tienen como resultado la predicción de una lesión CN2+ en un sujeto, los métodos pueden entonces incluir además proporcionar una recomendación a un sujeto de que se tomen acciones adicionales, por ejemplo, en forma de más procedimientos diagnósticos, tales como biopsia. En algunos casos, los métodos incluyen tomar acciones diagnósticas adicionales. La acción diagnóstica adicional puede incluir una colposcopia, en la que se realiza una inspección visual aumentada para identificar células anormales en la superficie del cérvix. Si la biopsia indica que puede haber cáncer o lesiones pre-cancerosas presentes, se pueden tomar procedimientos de diagnóstico y tratamiento adicionales, tales como un procedimiento de extirpación electroquirúrgica (LEEP, por sus siglas en inglés) y conización, en el que se extrae la capa interior del cérvix para ser examinada patológicamente.

- 10 Aunque los métodos son adecuados para su uso con una variedad de diferentes sujetos mamíferos hembra, son de interés el uso de los métodos con sujetos femeninos humanos, tales como sujetos femeninos humanos de 10 años de edad o mayores, por ejemplo, 15 años de edad, incluyendo 20 años de edad o mayores.

Dispositivos y sistemas

- 15 Entre los aspectos de la invención se incluyen además sistemas para su uso en la práctica de los métodos objeto de la misma. Los sistemas de interés incluyen un citómetro de flujo configurado para el ensayo de una muestra líquida para datos tanto morfométricos como de biomarcadores, por ejemplo, tal como se describe anteriormente. Los citómetros de flujo de interés incluyen, pero no se limitan a, aquellos dispositivos descritos en la Patente de Estados Unidos Nos.: 4.704.891; 4.727.029; 4.745.285; 4.867.908; 5.342.790; 5.620.842; 5.627.037; 5.701.012; 5.895.922; y 6.287.791 los cuales, si fuera necesario, se modifican para incluir la habilidad para obtener los datos de imagen según se describe anteriormente, además de aquellos citómetros descritos en las Patentes de Estados Unidos Nos. 20 6211955, 6249341, 6256096, 6473176, 6507391, 6532061, 6563583, 6580504, 6583865, 6608680, 6608682, 6618140, 6671044, 6707551, 6763149, 6778263, 6875973, 6906792, 6934408, 6947128, 6947136, 6975400, 7006710, 7009651, 7057732, 7079708, 7087877, 7190832, 7221457, 7286719, 7315357, 7450229, 7522758, 7567695, 7610942, 7634125, 7634126, 7719598.

- 25 En algunos casos, el citómetro de flujo incluye: un canal de flujo; al menos una primera fuente de luz configurada para dirigir la luz a una región de ensayo del canal de flujo (en la que en algunos casos el citómetro incluye dos o más fuentes de luz); un primer detector configurado para recibir luz de una primera longitud de onda de la región del canal de flujo; y un segundo detector configurado para recibir luz de una segunda longitud de onda de la región de ensayo del canal de flujo; y un detector de imágenes configurada para obtener datos de células. Dicho citómetro de 30 flujo tendría al menos dos canales de detección además del detector de imágenes. En algunos casos, el dispositivo puede incluir más de dos canales de detección, por ejemplo, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 10 o más, etc.

- Los aspectos de la invención además incluyen un módulo de procesamiento de señal configurado para recibir los datos morfométricos y los datos de biomarcadores del primer y segundo detector y generar un resultado de una predicción de si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) en base tanto a los datos 35 morfométricos como a los datos de biomarcadores. El módulo de procesamiento de señal puede estar integrado en el citómetro como un único dispositivo, o distribuido desde el citómetro cuando el módulo de procesamiento de señal y el citómetro están en comunicación entre sí, por ejemplo, mediante un protocolo de comunicaciones por cable o inalámbrico.

- Por consiguiente, los aspectos la invención además incluyen sistemas, por ejemplo, sistemas basados en 40 ordenador, que están configurados para predecir la presencia de una lesión CIN en un sujeto, por ejemplo, según se describe anteriormente. Un "sistema basado en ordenador" hace referencia a medios de hardware, medios de software, y medios de almacenamiento de datos utilizados para analizar la información de la presente invención. El hardware mínimo de los sistemas basados en ordenador de la presente invención comprende una unidad de procesamiento central (CPU), medios de entrada de datos, medios de salida de datos, y medios de almacenamiento 45 de datos. Un experto en el arte puede apreciar fácilmente que cualquiera de los sistemas basados en ordenador actualmente disponibles son adecuados para su uso en la presente invención. Los medios de almacenamiento de datos puede comprender cualquier producto que comprenda un registro de la presente información según se describe anteriormente, o un medio de acceso a memoria que puedan acceder a dicho producto.

- "Registrar" los datos, la programación u otra información en un medio legible por ordenador hace referencia a un 50 proceso para almacenar información, utilizando dichos métodos tal como se conocen en la técnica. Puede elegirse cualquier estructura de almacenamiento de datos apropiada, en base a los medios utilizados para acceder a la información almacenada. Puede utilizarse una variedad de programas procesadores de datos y formatos pueden ser utilizados para el almacenamiento, por ejemplo, un archivo de procesamiento de texto, un formato de base de datos, etc. Pueden utilizarse una variedad de programas y formatos procesadores de datos para el almacenamiento, por 55 ejemplo un archivo de procesamiento de texto, formato de base de datos, etc.

Un "procesador" referencia cualquier combinación de hardware y/o software que realizará las funciones requeridas del mismo. Por ejemplo, cualquier procesador en la presente patente puede ser un microprocesador digital programable tal como los disponibles en la forma de un controlador electrónico, procesador central, servidor u ordenador personal (de sobremesa o portátil). Cuando el procesador es programable, puede comunicarse una

programación adecuada desde una localización remota al procesador, o guardarse previamente en un producto de programa de ordenador (tal como un medio de almacenamiento legible por ordenador fijo o portátil, ya sea un dispositivo basado en un estado magnético, óptico o sólido). Por ejemplo, un medio magnético o disco óptico puede portar la programación, y puede ser leído por un lector adecuado que se comunica con cada procesador en su correspondiente estación.

Las realizaciones de los sistemas objeto de la invención incluyen los siguientes componentes: (a) un módulo de comunicaciones para facilitar la transferencia de información entre el sistema y uno o más usuarios, por ejemplo, mediante un ordenador de usuario, según se describe más adelante; y (b) un módulo de procesamiento para realizar una o más tareas implicadas en los métodos de análisis cuantitativos de la invención.

En determinadas realizaciones, se describe un producto de programa de ordenador que comprende un medio usable por ordenador con una lógica de control (un programa de software informático, que incluye un código de programa) almacenada en el mismo. La lógica de control, cuando se ejecuta por el procesador del ordenador, causa que dicho procesador realice las funciones descritas en la misma. En otras realizaciones, algunas funciones son implementadas principalmente en la utilización del hardware, por ejemplo, una máquina de estados con hardware. La implementación de la máquina de estados con hardware para realizar las funciones descritas en la presente patente puede lograrse utilizando cualquier método u técnicas apropiadas.

Además del dispositivo sensor y del módulo de procesamiento de señal, por ejemplo, según se describe anteriormente, los sistemas de la invención pueden incluir una cantidad de componentes adicionales, tales como dispositivos de salida de datos, por ejemplo, monitores y/o altavoces, dispositivos para la entrada de datos, por ejemplo puertos de interfaz, teclados, etc., componentes de manipulación de fluidos, fuentes de alimentación, etc.

En algunos casos, los sistemas pueden además incluir una mezcla de reacción obtenida de los mismos (por ejemplo, células lavadas producidas a partir de los mismos), donde la mezcla de reacción se prepara tal como se describe anteriormente, por ejemplo, combinando una muestra, una o más sondas de un biomarcador marcada y, un colorante no específico opcional.

Utilidad

Los métodos y sistemas objeto se utilizan en una variedad de diferentes aplicaciones en las que se desea la predicción de detección de una lesión CIN en un sujeto. Dichas aplicaciones incluyen tanto aplicaciones de investigación como de diagnóstico, por ejemplo, aplicaciones en las que se diagnostica a un sujeto con respecto a la presencia de o a la tendencia a desarrollar un cáncer cervical, por ejemplo, tal como se describe anteriormente. La utilidad clínica de los métodos y sistemas descritos en la presente memoria proporcionan herramientas potentes para detectar y cribar patogénesis relacionadas con el VPH y el desarrollo del cáncer cervical tanto en estados tempranos como tardíos, permitiendo de este modo la intervención terapéutica para evitar la progresión de la enfermedad además de una oportunidad para proporcionar un tratamiento precoz. Además, los métodos y sistemas objeto se utilizan en la evaluación del pronóstico o el riesgo de una enfermedad o condición relacionada con el VPH, para monitorizar la evolución de una enfermedad o condición relacionada con el VPH, y para monitorizar la eficacia de un tratamiento o fármaco anti-VPH, tal como por ejemplo, una vacuna anti-VPH o un candidato a vacuna anti-VPH.

Realizaciones relacionadas con ordenadores

Los aspectos de la invención además incluyen una variedad de realizaciones relacionadas con ordenador. Específicamente, los métodos de análisis de datos descritos en las secciones previas pueden ser realizados utilizando un ordenador. Por consiguiente, la invención proporciona un sistema basado en ordenador para analizar los datos que utilizan los métodos anteriores para detectar o predecir una lesión CIN.

En determinadas realizaciones, los métodos están codificados sobre un medio físico legible por ordenador en forma de "programación", donde el término "medio legible por ordenador" tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a cualquier medio de almacenamiento o transmisión que participa a la hora de proporcionar instrucciones y/o datos a un ordenador para la ejecución y/o el procesamiento. Entre los ejemplos de medios de almacenamiento se incluyen discos flexibles, cinta magnética, CD-ROM, una unidad de disco duro, un ROM o circuito integrado, un disco magnetoóptico, o una tarjeta legible por ordenador tal como una tarjeta PCMCIA y similares, ya sean dichos dispositivos internos o externos al ordenador. Un archivo que contiene información puede ser "almacenado" en un medio legible por ordenador, donde "almacenar" significa registrar información de tal manera que sea accesible y recuperable en una fecha posterior por un ordenador. Son de interés medios no transitorios, es decir, medios físicos en los que la programación está asociada con, tal como registrada en, una estructura física. Los medios no transitorios no incluyen señales electrónicas en tránsito mediante un protocolo inalámbrico.

Con respecto a los medios legibles por ordenador, "memoria permanente" hace referencia a una memoria que es permanente. La memoria permanente no se borra por la interrupción del suministro a un ordenador o procesador. Una unidad de disco duro del ordenador, CD-ROM, disco flexible y DVD son todos ejemplos de memoria permanente. Una memoria de acceso aleatorio (RAM) es un ejemplo de memoria no permanente. Un archivo en la memoria permanente puede ser editable y re-escribible.

Kits

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona kits para practicar los métodos objeto, por ejemplo, según se describe anteriormente. Los kits objeto pueden incluir sondas de biomarcadores marcadas, por ejemplo, según se describe anteriormente.

5 Además, el kit puede incluir una o más composiciones adicionales que se emplean, incluyendo pero sin limitarse a: tampones, diluyentes, reactivos de fijación, reactivos de permeabilización, etc., que pueden emplearse en un ensayo determinado. Los kits pueden además comprender dispositivos de obtención de muestras, por ejemplo, cepillos cervicales, según se ha descrito anteriormente. Los componentes anteriores pueden estar presentes en envases independientes o uno o más componentes pueden estar combinados en un único envase, por ejemplo, un vial de cristal o plástico.

10 Además de los anteriores componentes, los kits objeto de la invención incluirán además instrucciones para la práctica de dichos métodos objeto. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits objetos en una variedad de formas, una o más de las cuales puede estar presente en el kit. Una forma en la que estas instrucciones pueden estar presentes es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, por ejemplo, una pieza o piezas de papel sobre la cual la información se imprime, en el empaquetado del kit, en un prospecto, etc. Incluso otro medio sería un medio legible por ordenador, por ejemplo, diskette, CD, etc., en el que la información se ha registrado. Incluso otro medio que puede estar presente es una dirección de un sitio web que puede ser utilizada mediante Internet para acceder a la información en un sitio apartado. Cualquier medio apropiado puede estar presente en los kits.

20 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y a modo de limitación.

Experimentos

Se obtuvo un alícuota de 1 ml de una muestra, de la muestra de una citología cervical en base líquida (LBC) y se centrifugó a 1000xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular resultante se lavó dos veces en una solución tampón de fosfatos (PBS), a un pH 7,4 y las células se fijaron y permeabilizaron durante 1 h a temperatura ambiente utilizando IncellFP (IncellDx, Menlo Park, CA). Las células fijas y permeabilizadas resultantes se lavaron dos veces utilizando dos tampones (PBS y 2XSSC) de pre-hibridación diferentes, y se preparó un cóctel de hibridación mezclando un tampón de hibridación (5XSSC, 30% de formamida) con un cóctel de sonda de ARNm del E6, E7 del VPH, para todos los tipos de VPH de alto riesgo conocidos (el cóctel de sonda era de los que se encuentran en el cóctel de sondas del kit OncoTect™ de detección de ARNm del E6, E7 del VPH (IncellDx, Menlo Park, CA). La reacción de hibridación se realizó en un baño de agua precalentada a 43±1 °C durante 30 minutos y fue seguido de un lavado a fondo de las células con dos tampones post-hibridación (2XSSC, Triton X-100 y 0,1 X SSC, Triton X-100) para retirar la sonda no enlazada. Las células se lavaron en 1 ml de PBS que contiene 2% de suero bovino fetal y son re-suspendidas en 60ml de PBS, 0,05% Triton X-100, y 1mg/ml DAPI. Previamente a la ejecución en el instrumento, se añadió 200ml de EDTA10mM en PBS. Las muestras se homogeneizaron con una jeringuilla y se ejecutaron en un instrumento ImageStream (de Amnis Inc, Seattle, WA). El instrumento se ajustó para distinguir las células únicas intactas utilizando una relación de aspecto contra un gráfico de puntos de un área, por ejemplo, tal como se muestra en la FIG. 1. Este ajuste permitió: (1) la identificación de células anormales por el análisis de la relación N/C (núcleo - citoplasma) (ver, por ejemplo, la FIG. 2); y (2) cuantificaciones del ARNm del E6, E7 según se determina por tinción con DAPI y fluorescencia verde de la señal de hibridación del ARNm del E6, E7 (ver las FIGS. 3A y 3B).

De forma alternativa, el análisis del ciclo celular según se determina por un reactivo de tinción del ADN (por ejemplo, tinción con DAPI o DRAQ5 de las células) y puede utilizarse fluorescencia verde de la señal de hibridación del ARNm del E6, E7 para detectar células anormales. Por ejemplo, como puede verse en el histograma de la FIG. 4, la sobreexpresión del ARNm del E6/E7 (eje Y) se observa en células con un incremento en el contenido de ADN (eje X; el colorante de ADN es DRAQ5).

El uso combinado de mediciones morfométricas conforme con los criterios aceptados basados en portaobjetos en la Tabla 1 y la sobreexpresión del ARNm del E6, E7, en base a célula-por-célula, todo realizado en las células en suspensión, aumentó la sensibilidad y especificidad para la detección del CIN 2+ hasta >95% y >90% respectivamente. Este rendimiento en un único ensayo excede enormemente el rendimiento de la prueba del frotis de PAP y el ADN del VPH combinado para la detección de lesiones CIN 2+.

Este enfoque puede ser utilizado sustituyendo un anticuerpo de p16 para la detección de ARNm del E6, E7, o sustituyendo las sondas de ARNm del E6, E7 con sondas dirigidas a microARN específicos o alteraciones del cromosoma 3q- asociadas con el cáncer cervical, o sustituyendo los anticuerpos dirigidos a E6, E7 por las sondas de ARNm del E6, E7.

55 Como una alternativa adicional, puede utilizarse un análisis del ciclo celular según se determina por un reactivo de tinción del ADN combinado con mediciones morfométricas, por ejemplo la relación núcleo/citoplasma de las células, para detectar células anormales. Por ejemplo, la FIG. 5A y 5B muestra histogramas de relaciones N/C (eje Y) versus contenido de ADN de células cervicales normales (FIG. 5A, panel superior), células cervicales de LSIL (FIG. 5A,

panel inferior), y células cervicales HSIL (FIG. 5B, ambos paneles). Esta alternativa utiliza únicamente 1 reactivo de tinción, es decir, el reactivo de tinción de ADN no específico.

Además, tal como se muestra en la Tabla 2 a continuación, hemos observado que el grado de nucleación de células escamosas en la muestra, según se determina utilizando un reactivo de tinción de ADN, corresponde con la gravedad de la anormalidad citológica. Específicamente, un aumento en el porcentaje de nucleación de las células escamosas en la muestra corresponde a un aumento de la gravedad de la anormalidad citológica. En la Tabla 2, las células escamosas en la muestra corresponden a un aumento en la gravedad de la anormalidad citológica. En la Tabla 2, las células escamosas normales presentaron un % de nucleación de aproximadamente un 50%, las células escamosas LSIL presentaron un % de nucleación de aproximadamente 80%, y las células escamosas HSIL tenían un % de nucleación por encima del 90%. Como tal, un porcentaje de nucleación para células escamosas en una muestra de un sujeto de aproximadamente un 80% o más, indica que el sujeto tiene una lesión de neoplasia de intraepitelial cervical (CIN), (p. ej., LSIL o HSIL), donde un porcentaje de nucleación de aproximadamente el 90% o más en la muestra indica que el sujeto tiene una lesión epitelial escamosa de alto grado (HSIL).

Tabla 2: Nucleación de la población de células escamosas según se determina por un diagnóstico de frotis de PAP anormal

Grupo de muestra	Citología	% nucleado
1	Normal	47,33
2	LSIL	82,66
3	HSIL	94,38
4	HSIL	93,41

LSIL - lesión epitelial de células escamosas de bajo grado

HSIL - lesión epitelial de células escamosas de alto grado

Las muestras de células cervicales pueden incluir tipos de células (y otros detritus) que no son relevantes para los ensayos de cribado descritos en la presente memoria, y como tal sería ventajoso excluirlas de los análisis. La FIG. 6 muestra un gráfico de puntos de dispersión de luz lateral (ortogonal) combinada (eje Y) y volumen electrónico (eje X) de células en una muestra de citología cervical. Este gráfico muestra que diferentes células (y otros componentes) en la muestra pueden ser delineados utilizando estos parámetros morfométricos. Los cuatro diferentes acotamientos identifican detritus, células ectocervicales, células endocervicales, y leucocitos polimorfonucleares (PMNS). Puede emplearse el acotamiento de subpoblaciones de interés (gating) para identificar células de interés para el cribado de acuerdo a aspectos de la presente invención (p. ej., células endocervicales y/o ectocervicales).

Listado de secuencias

- <110> INCELLDX
- <120> Métodos y sistemas para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) a partir de una muestra de células cervicales
- <130> 4/2OF27/1
- <140> EP11839907.0
- <141> 2011-11-10
- <150> US61/484,142
- <151> 2011-05-09
- <150> US61/413,302
- <151> 2010-11-12
- <160> 20
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <221> fuente

<222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

5 <400> 1
 ttaggtaac atgtctcca tgcatgtgt 30

<210> 2
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..31
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 2
 acgttgctgt cacatccaca gcaacaggtc a 31

<210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado" /nota="Sonda sintética" /organismo="Secuencia artificial"

25

<400> 3
 tgcaacaaga catacatcga ccggtccacc gac 33

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

35

<400> 4
 ggttacaata ttgtaatggg ctctctccgg 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

45

<400> 5
 tttcaggacc cacaggagcg acccagaaag 30

<210> 6
 <211> 36

50

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..36
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 6
 10 tcgagcacga atggcactgg cctctatagt gccag 36

 <210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 20 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 7
 gtcaaccgg aatttcattt tgggctcta aatg 34

 <210> 8
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 30 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 8
 ctggcacia atcatgcaat gttcgtggtt 30

 35 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"

 45 <400> 9
 gtctgaaac attgcagttc tctttggtg 30

 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 55 /nota="Sonda sintética"

/organismo="Secuencia artificial"
 <400> 10
 ctgtgcataa ctgtggaac ttctgggtc 30
 5 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 11
 15 tcacacaacg gttgttgta ttgctgtct 30
 <210> 12
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 25 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 12
 tgggtttctc tacgtgtct tgatgatctg 30
 <210> 13
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 35 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 13
 taacaggtct tcaaagtac gaatgtctac 30
 40 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 45 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 50 <400> 14
 tatggttct gagaacagat ggggcacaca 30
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 5 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 15
 agtggtcagt tccgtgcaca gatcaggtag 30
 10 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 20 <400> 16
 cctctgtaag ttccaatact gtcttgcaat 30
 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 30 <400> 17
 cctctatagt gccagctat gttgtgaaat 30
 <210> 18
 35 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 40 <222> 1..30
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 18
 45 ttgtgttct ctgctcgtt ggagtcgttc 30
 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"
 /nota="Sonda sintética"
 55 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 19
ctggcttcac acacaacaca tacacaac 28

<210> 20

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..30

10 <223> /tipo_mol="ADN no asignado"

/nota="Sonda sintética"

/organismo="Secuencia artificial"

<400> 20

tgctcgaagg tcgtctgctg agctttctac 30

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN), cuyo método comprende:
 - 5 - obtener datos de una muestra líquida marcada de células cervicales en suspensión del sujeto, en donde los datos se obtienen analizando la muestra líquida con un dispositivo de citometría de flujo, y comprenden datos morfológicos y datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de biomarcadores de un cáncer cervical, datos del contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, y combinaciones de los mismos; y
 - 10 - predecir, a partir de los datos morfológicos y los datos seleccionados del grupo que consiste en: datos de biomarcadores del cáncer cervical, datos del contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, y combinaciones de los mismos, si el sujeto tiene una lesión CIN.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la CIN es una lesión CIN2+.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el pronóstico está caracterizado por una sensibilidad de 85% o mayor y/o una especificidad de 85% o mayor.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los datos morfológicos comprenden datos de imagen.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra líquida marcada es una muestra líquida marcada con un biomarcador, en donde los datos comprenden datos de biomarcadores del cáncer cervical, y en donde los datos de biomarcadores del cáncer cervical comprenden datos de cuantificación de biomarcadores del cáncer cervical por célula.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método además comprende preparar la muestra líquida marcada de un biomarcador de células cervicales.
7. El método según la reivindicación 6, en donde la preparación comprende: combinar una muestra inicial de células cervicales con reactivos de fijación y permeabilización para fijar y permeabilizar las células; y poner en contacto las células fijadas y permeabilizadas con una sonda de un biomarcador del cáncer cervical marcada con fluorescencia que se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el biomarcador del cáncer cervical es un ácido nucleico o una proteína.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método comprende poner en contacto la muestra inicial de células cervicales con dos o más sondas diferentes de biomarcadores marcadas con fluorescencia, cada una de las cuales se une específicamente a un biomarcador del cáncer cervical diferente.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método además comprende recomendar una biopsia cervical si determina que el sujeto tiene una lesión CIN.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra líquida marcada es una muestra líquida con ADN marcado, en donde los datos comprenden datos del contenido de ADN, datos del porcentaje de nucleación, o ambos.
12. Un sistema que comprende:
 - un canal de flujo;
 - una fuente de luz configurada para dirigir luz a una región de ensayo del canal de flujo;
 - 40 - un primer detector configurado para recibir luz de la región de ensayo del canal de flujo y producir datos morfológicos que comprenden datos del área nuclear;
 - un segundo detector configurado para recibir luz de la región de ensayo del canal de flujo y producir datos adicionales; y
 - 45 - un módulo de procesamiento de señal configurado para recibir los datos morfológicos y datos adicionales del primer y segundo detector y generar un resultado de una predicción de si un sujeto tiene una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) en base tanto a los datos morfológicos como a los datos adicionales,
 en donde el sistema está configurado para realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la muestra líquida marcada de células cervicales en suspensión de un sujeto comprende células endocervicales y células ectocervicales.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13, en donde los datos seleccionados del grupo son datos de biomarcadores del cáncer cervical que comprenden datos de expresión de uno o más productos de expresión de genes del VPH.

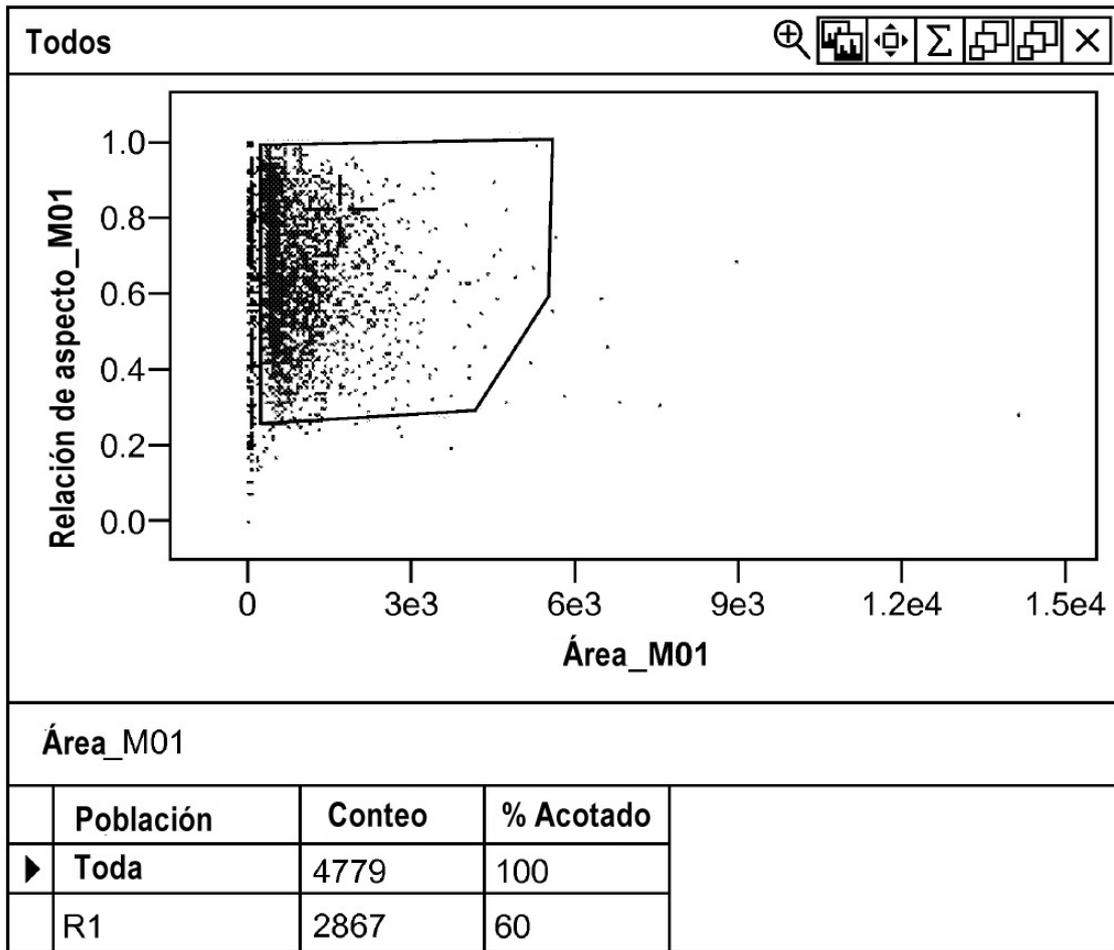


FIG. 1

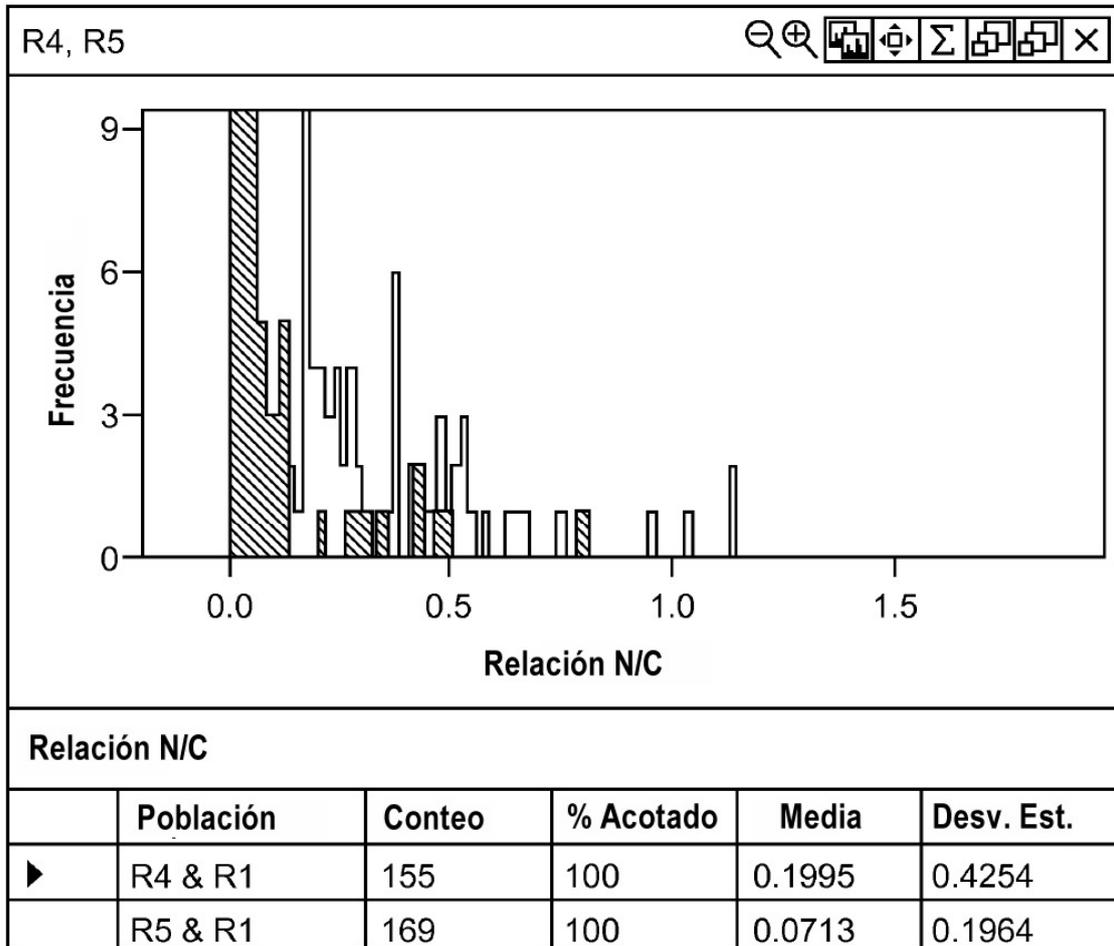


FIG. 2

Células +E6, E7, relación N/C elevada, núcleos pleomórficos

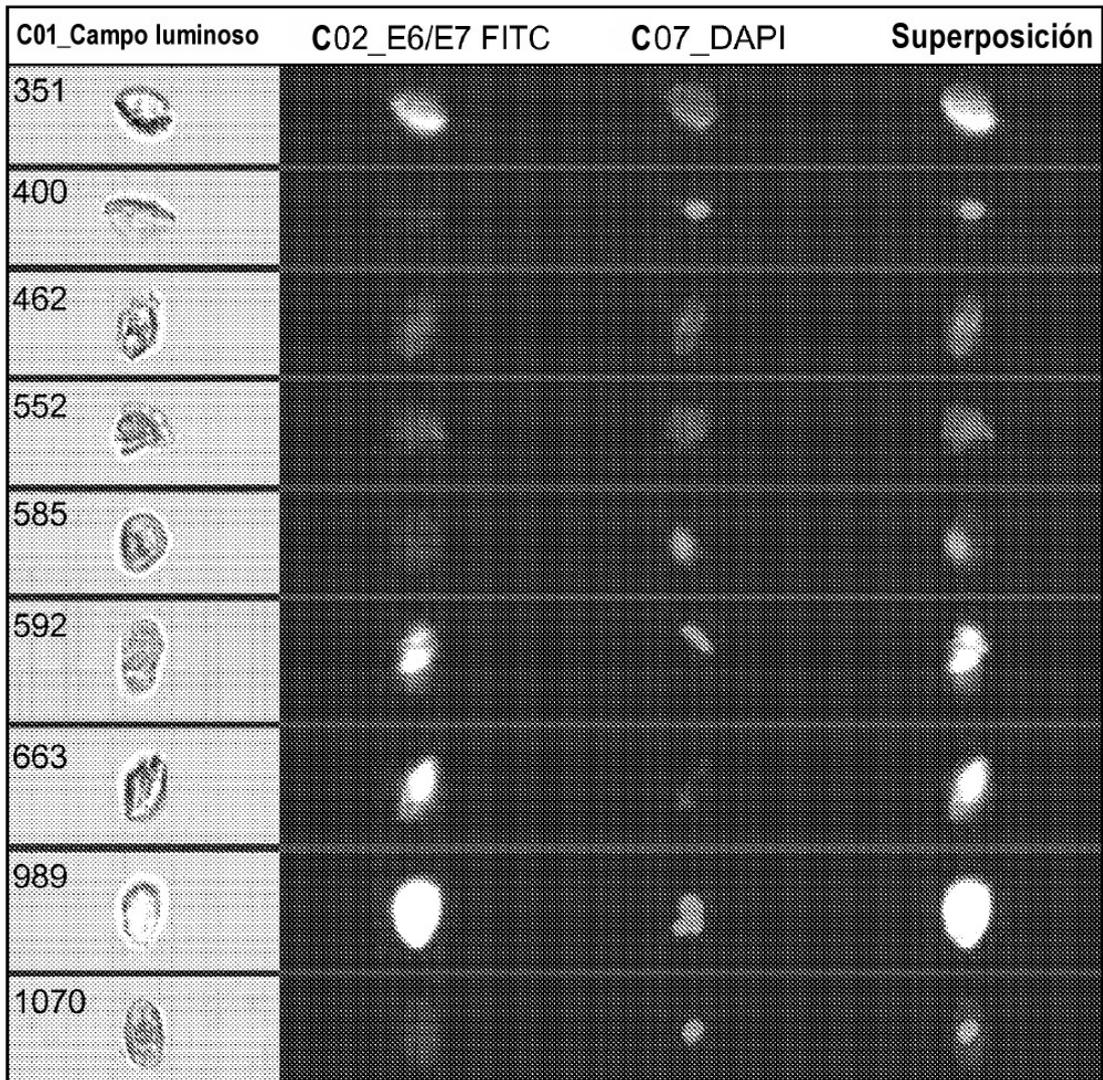


FIG. 3A

Células E6, E7, relación N/C baja, núcleos redondeados/regulares

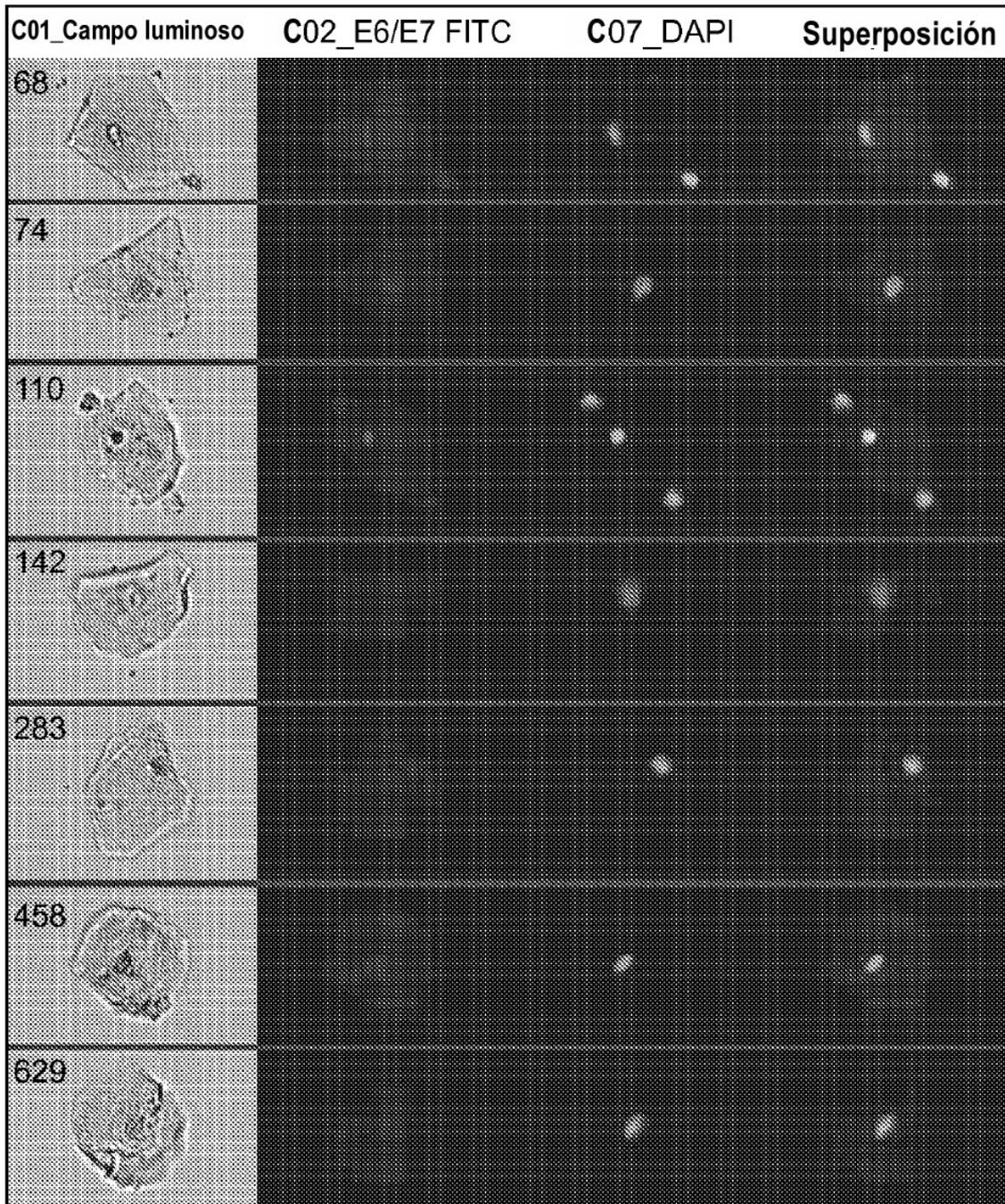


FIG. 3B

ARNm del E6, E7 y Ploidia de ADN combinados

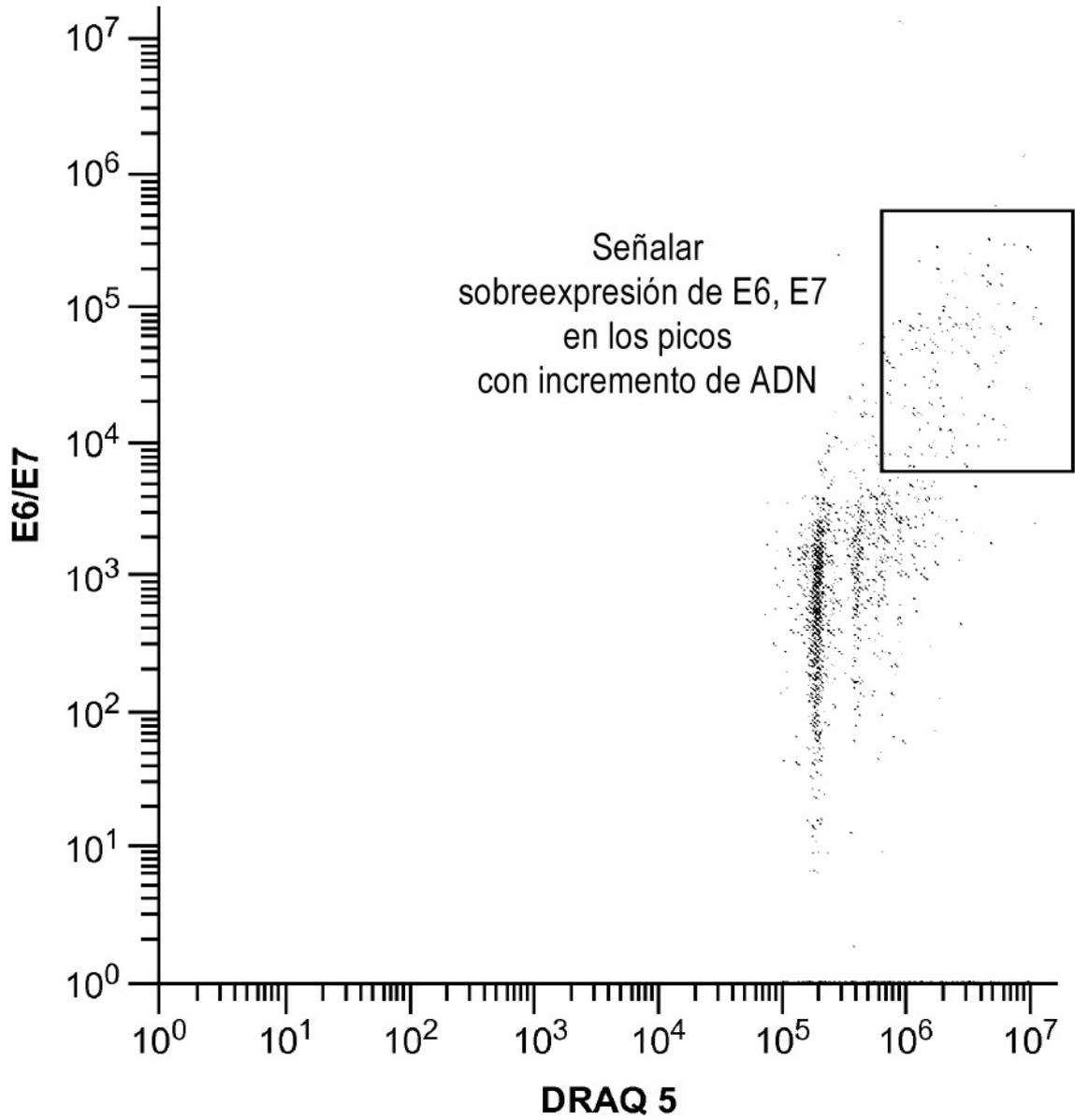


FIG. 4

Combinación de datos morfométricos y ARNm de E6, E7

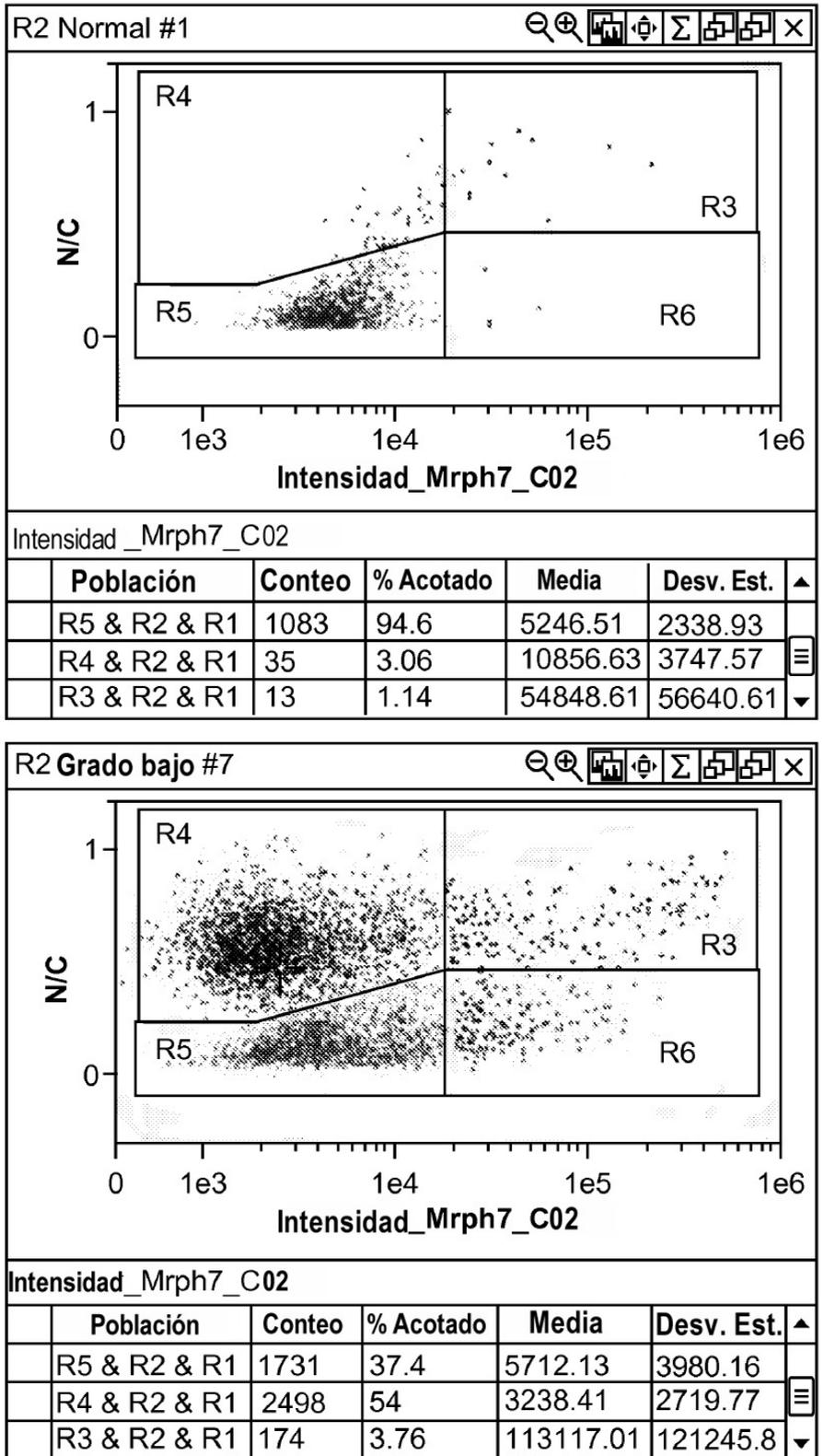


FIG. 5A

Combinación de datos morfométricos y ARNm de E6, E7

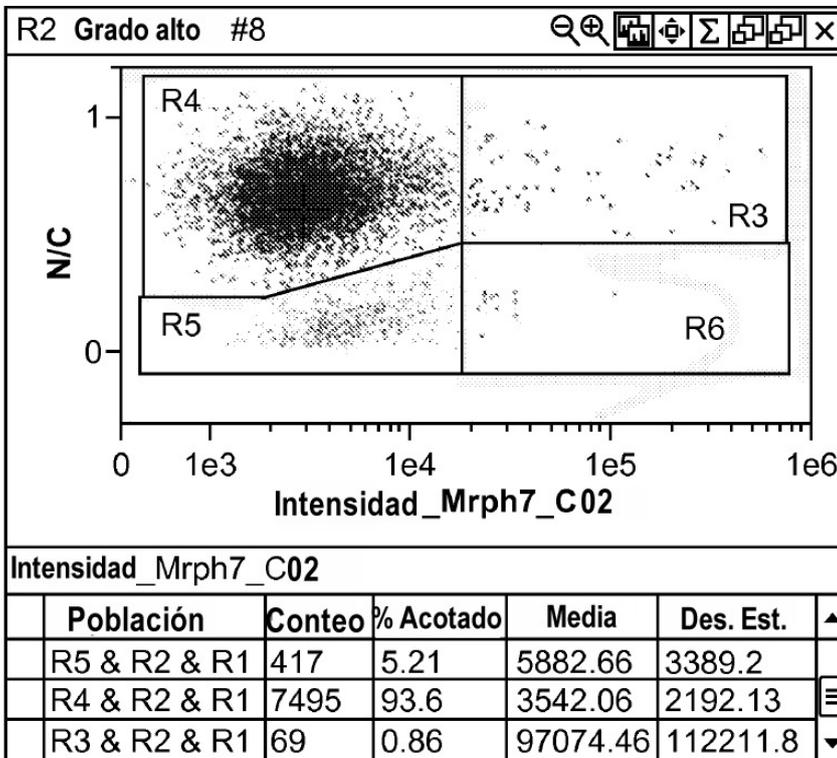
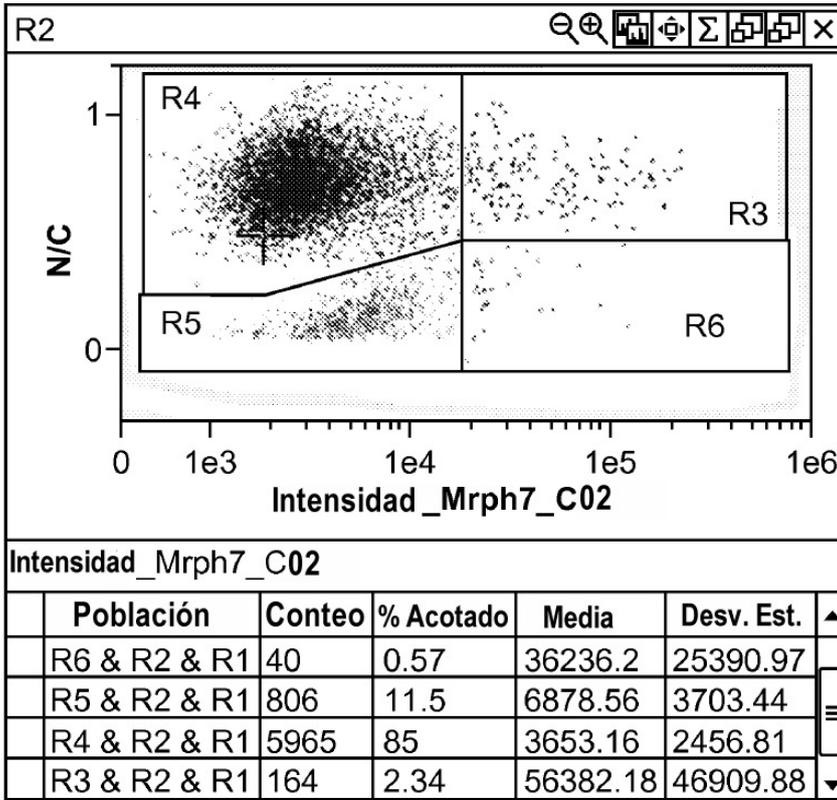


FIG. 5B

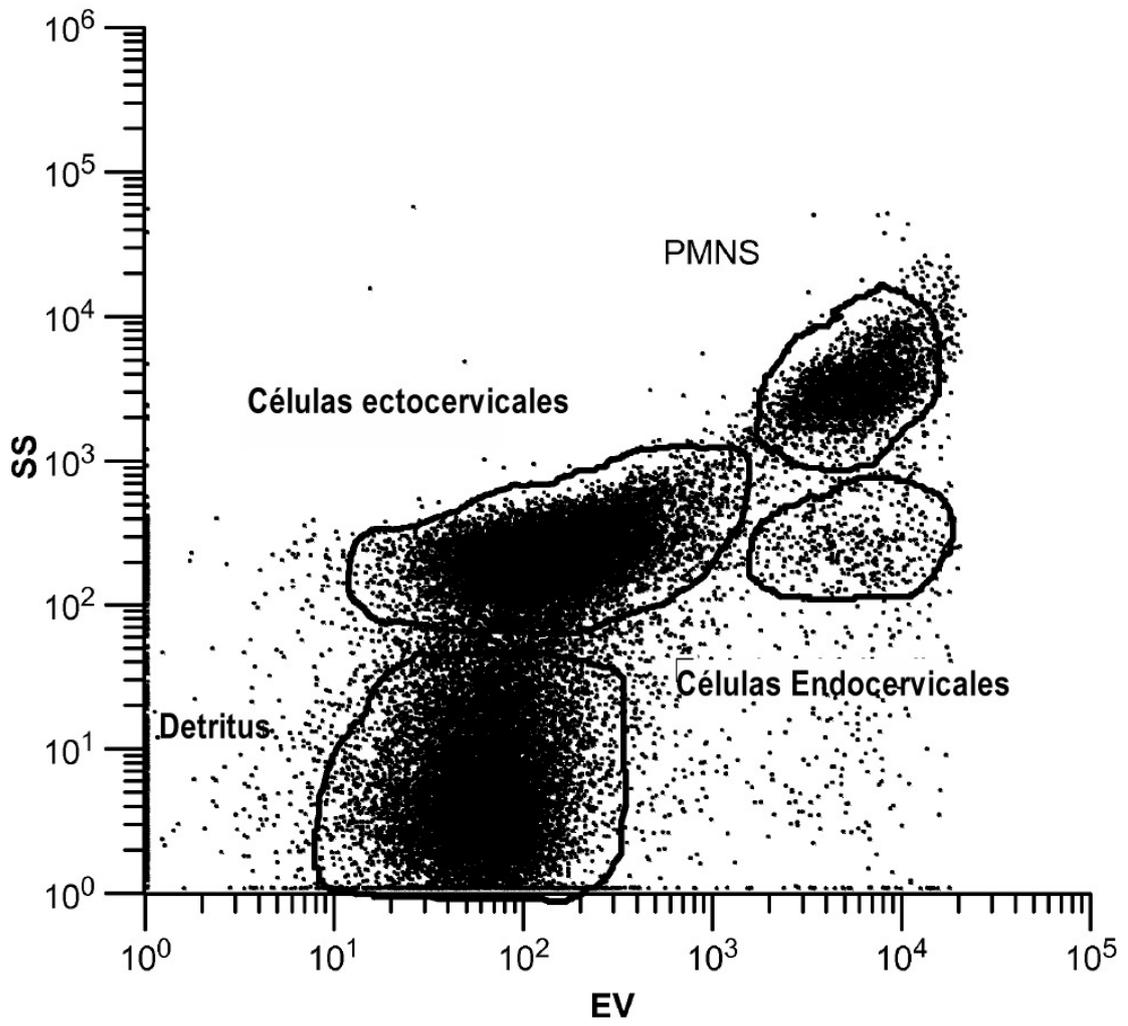


FIG. 6