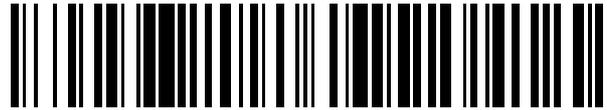


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 640**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2012 PCT/US2012/022856**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12103414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12702157 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2668290**

54 Título: **Ensayo de HPV RNAscope® para determinar el estado del HPV en los cánceres de cabeza y cuello y en lesiones cervicales**

30 Prioridad:

28.01.2011 US 201161437337 P

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

23.10.2017

73 Titular/es:

**ADVANCED CELL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
7707 Gateway Blvd.
Newark, CA 94560 , US**

72 Inventor/es:

**MA, XIAO-JUN;
FLANAGAN, JOHN y
LUO, YULING**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 638 640 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de HPV RNAscope® para determinar el estado del HPV en los cánceres de cabeza y cuello y en lesiones cervicales

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/437.337, presentada el 28 de enero de 2011, titulada "RNAscope™ HPV for determining HPV Status in Head and Neck Cancers".

Campo de la invención

10 En la presente invención se proporcionan métodos y kits para determinar si un cáncer de cabeza y cuello está relacionado con el virus del papiloma humano (HPV, del inglés Human Papillomavirus) basado en la presencia o ausencia del ARNm E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo. También se proporcionan en este documento métodos y kits para diagnosticar si una lesión cervical en un sujeto es benigna en base a la presencia o ausencia de ARNm E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo. Además se proporcionan en este documento métodos para determinar la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) basada en el patrón espacial y el nivel de expresión del ARNm E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo. También se proporcionan en este documento métodos para determinar el riesgo de desarrollar cáncer cervical en un sujeto diagnosticado con lesión cervical basado en la presencia o ausencia de ARNm E6/E7 de ciertos subgrupos de subtipos de HPV de alto riesgo.

Antecedentes de la invención

20 El virus del papiloma humano (HPV) ha demostrado causar un subconjunto de cánceres de cabeza y cuello (HNC), especialmente el carcinoma de células escamosas de la orofaringe (12). El HNC asociado al HPV tiene un perfil clínico distinto al del cáncer orofaríngeo no relacionado con el HPV. Se presenta en una edad más temprana y más probablemente en pacientes masculinos, que tienen menos probabilidad de tener una historia de adicción al tabaco o de abuso del alcohol. En comparación con el HNC no relacionado con el HPV, el HNC asociado al HPV también se asocia con un pronóstico más favorable, probablemente debido a su mayor sensibilidad a la radiación y a las quimioterapias actuales (3). En las últimas décadas, la incidencia del HNC asociado al HPV ha aumentado rápidamente, probablemente atribuible al aumento de comportamientos sexuales de alto riesgo (4). Por lo tanto, para manejar mejor los HNC recién diagnosticados, actualmente se recomienda determinar el estado del HPV en el tumor mediante las directrices de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN).

30 El cáncer de cuello uterino es una de las enfermedades malignas más comunes que afectan a las mujeres en todo el mundo y una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo. Los programas de cribado del cáncer de cuello uterino son eficaces para prevenir el cáncer y reducir la mortalidad (16); sin embargo, hay limitaciones.

35 El cáncer de cuello uterino y las lesiones pre-malignas (neoplasias intraepiteliales cervicales I-III (CIN I, II y III), correspondientes a displasia leve, moderada y grave) son causados por el virus del papiloma humano (17,18). La mayoría de las mujeres que adquieren el HPV desarrollan infecciones transitorias o subclínicas (19, 20); muy pocas mujeres con infecciones por HPV progresarán a neoplasia intraepitelial cervical grado II o III o cáncer (19, 21-22). Las principales limitaciones de los programas de cribado del cáncer de cuello uterino surgen del hecho de que los frotis de Papanicolaou (Pap) e incluso las biopsias no pueden distinguir las infecciones transitorias benignas de HPV de aquellas lesiones del HPV que progresarán (19, 22, 23). Las pautas actuales de manejo para el tratamiento de CIN requieren que todos los pacientes sigan uno de los protocolos recomendados (24). Éstos incluyen la citología, la colposcopia y las combinaciones de citología y colposcopia y la tipificación del ADN del HPV a varios intervalos (24, 25). El diagnóstico de CIN I o la infección por HPV conduce a múltiples visitas al consultorio médico y a varias pruebas de repetición que deben realizarse para asegurarse de que los pacientes no progresan a lesiones de grado superior o cáncer. Es necesario mejorar el diagnóstico de CIN y la gestión de su tratamiento.

45 Los métodos actuales de cribado del cáncer de cuello uterino tienen varias limitaciones. Por ejemplo, los actuales métodos clínicamente aprobados son incapaces de distinguir entre las infecciones transitorias de HPV y las verdaderas lesiones cervicales premalignas. Los actuales métodos clínicamente aprobados tampoco pueden predecir la probabilidad de que una lesión cervical en un paciente progrese a una lesión de alto grado o cáncer.

50 Claramente, existe una necesidad de mejorar los métodos actuales de laboratorio para mejorar la exactitud y fiabilidad de los diagnósticos de cáncer de cuello uterino. La invención descrita en la presente solicitud proporciona respuestas a esta necesidad.

55 El mejor biomarcador para los tumores asociados al HPV es el ARNm E6/E7 del HPV (5), que codifica las oncoproteínas E6 y E7, responsables principalmente de la oncogénesis inducida por el HPV (6). Las proteínas E6 y E7 inactivan las proteínas supresoras de tumor p53 y pRB, respectivamente, para desregular el control del ciclo celular e inhibir la apoptosis. Por lo tanto, el mejor método para determinar el estado del HPV en el tumor es medir el ARNm de E6/E7 en células tumorales (5). Sin embargo, sigue siendo impracticable en el contexto clínico cuantificar el ARNm de E6/E7 usando PCR a tiempo real de transcripción inversa (RT-PCR) debido a los complicados

procedimientos de extracción de ARN del tejido fijado con formalina fijado en parafina y de RT-PCR. Además, la RT-PCR no registra la expresión en células tumorales individuales, lo cual es importante para determinar el estado del HPV dentro del tumor.

5 Por lo tanto, un método de detección in situ práctico es necesario para detectar el ARNm E6/E7 con una sola resolución celular.

10 Sin embargo, los actuales métodos de hibridación de ARN in situ (ISH) carecen de suficiente sensibilidad y especificidad para la detección de mRNA E6/E7 de HPV en los tejidos FFPE. Como resultado, se están utilizando dos biomarcadores alternativos en la clínica, ya que pueden detectarse in situ con los métodos existentes, uno que mide el ADN del HPV por el ISH del ADN y otro que mide por inmunohistoquímica (IHC), un biomarcador de proteína sustituto p167, que es inducido por la inactivación de pRB mediada por E7. Sin embargo, el ISH del ADN tiene baja sensibilidad y la expresión de p16 puede ser inespecífica al HPV, lo que lleva a algunos trabajadores a proponer un algoritmo combinado (8, 9).

15 En este documento, los inventores describen un método de ARN ISH para la detección de mRNA E6/E7 de HPV en HNC y cáncer de cuello uterino, que utiliza una nueva técnica de ARN ISH ultra-sensible y específica llamada RNAscope®. El RNAscope es el objeto de las siguientes patentes expedidas y solicitudes de patentes: patente de EE.UU. 7.709.198; patente de EE.UU. 11/471.278; patente de EE.UU. 60/994.415; patente de EE.UU. 12/284.163; patente de EE.UU. 12/660.516; patente de EE.UU. 12/660.524; patente de EE.UU. 61/277.563; patente de EE.UU. 61/279.769; patente de EE.UU. 61/283.503; patente de EE.UU. 61/336.944; patente de EE.UU. 61/336.947; patente de EE.UU. 61/336.948; patente de EE.UU. 61/310.021; patente de EE.UU. 61/355.244; patente de EE.UU. 61/355.246.

Aunque el ensayo RNAscope® está diseñado para detectar el ARNm in situ, la aplicación de esta plataforma tecnológica para detectar subtipos de HPV en cánceres tales como el HNC y el cáncer de cuello uterino sigue siendo difícil en varios aspectos.

25 En primer lugar, el HPV es una familia de virus con más de 100 subtipos. Las secuencias diana son altamente homogéneas entre los miembros de la familia. Por lo tanto, el ensayo de ARN ISH para detectar diferentes subtipos de HPV debe ser capaz de diferenciar cada subtipo con una especificidad muy alta. Por ejemplo, sólo un pequeño subgrupo de tipos de "alto riesgo" en la familia se considera oncogénico y por lo tanto, necesitan ser separados del resto de los subtipos de HPV en la familia.

30 En segundo lugar, las múltiples sondas objetivo oligo necesarias para detectar subtipos de alto riesgo de HPV hacen difícil diseñar un ensayo de RNAscope®. El HPV oncogénico de alto riesgo comprende un grupo de subtipos. Los miembros de los subtipos de alto riesgo del HPV en este grupo son diferentes entre las diferentes indicaciones de la enfermedad. Por ejemplo, el cáncer de cabeza y cuello involucra a al menos 7 subtipos de alto riesgo, mientras que el cáncer de cuello uterino involucra a al menos 15. Además, con el fin de detectar cánceres relacionados con el HPV, es altamente deseable "agrupar" los subtipos individuales en un grupo de modo que el ensayo ARN ISH pueda detectar "cualquiera" de los subtipos dentro del grupo en una prueba. Sin embargo, en el ensayo de RNAscope®, cada sonda diana para un objetivo específico debe comprender 10 - 20 oligos y cada conjunto de sonda diana requiere dos o más de tales sondas. Para un conjunto de sondas objetivo que está diseñado para detectar 15 ácidos nucleicos diana, se requieren cientos de oligos diferentes. El comportamiento de dicho gran número de oligos en un único experimento de hibridación in situ nunca ha sido probado y su efecto es difícil de predecir. Antes de la invención, no estaba claro si el ensayo RNAscope® existente podía adaptarse para detectar múltiples subtipos de HPV de alta homología simultáneamente mientras se mantenía la característica de alta especificidad de dicho ensayo.

Sumario de la invención

45 Por lo tanto, un propósito de la presente invención es proporcionar un método ISN de ARN para detectar la presencia de subtipos de HPV de alto riesgo en diversos cánceres, en particular cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cuello uterino.

50 Este objetivo se logra mediante la selección de subtipos de HPV de alto riesgo específicos que se utilizarán en los ensayos de HPV RNAscope®. Las sondas diana de los ensayos de HPV RNAscope® están diseñadas para reconocer específicamente los subtipos de HPV de alto riesgo seleccionados, pero no otros subtipos de HPV de la familia de HPV. Las múltiples sondas diana de los ensayos de HPV RNAscope® también están diseñadas para no interferir entre sí.

55 De acuerdo con un aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un cáncer de cabeza y cuello en un humano está relacionado con HPV, que comprende: (a) obtener una muestra de dicho humano en la que dicha muestra está en una sección de tejido; y (b) llevar a cabo un ensayo de hibridación de ARN in situ usando (i) uno o más conjuntos de sondas diana que se designan para hibridarse individualmente a ARNm E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo, y (ii) un sistema de amplificación de señal universal, en el que la presencia de E6/E7 ARNm de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo indica que el cáncer de cabeza y cuello en dicho humano está relacionado con el HPV.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la progresión del cáncer de cabeza y cuello en un ser humano, que comprende: (a) obtener una muestra de dicho humano en donde dicha muestra está en una sección de tejido; y (b) realizar un ensayo de ARN ISH usando (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo, y (ii) un sistema de amplificación de señal universal; y (c) medir los niveles de ARNm E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo detectados en la etapa (b); determinando de este modo la progresión de dicho cáncer de cabeza y cuello basándose en los niveles de ARNm E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar si un cáncer de cabeza y cuello en un ser humano está relacionado con HPV, que comprende, en un recipiente adecuado, agentes para llevar a cabo un ensayo de ARN ISH incluyendo (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñados para hibridarse individualmente con ARNm E6/E7 de uno o más subtipos de alto riesgo de HPV y (ii) un sistema de amplificación de señal universal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si una lesión cervical en un ser humano es una lesión benigna o una lesión CIN, que comprende: (a) obtener una muestra de dicho humano en la que dicha muestra está en una sección de tejido; (b) llevar a cabo un ensayo de ARN ISH usando: (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñados para hibridar individualmente a ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo, (ii) un sistema de amplificación de señal universal; en el que la ausencia de ARNm de E6/E7 de todos los subtipos de HPV de alto riesgo indica una lesión benigna y la presencia de ARNm de E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo indica una lesión de CIN.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) en un ser humano, que comprende: (a) obtener una muestra de dicho humano en la que dicha muestra está en una sección de tejido; (b) llevar a cabo un ensayo de ARN ISH usando (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñados para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo; y (ii) un sistema de amplificación de señal universal; y (c) analizar el patrón espacial y medir los niveles del ARNm de E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo detectados en la etapa (b); determinando de este modo la progresión de CIN basándose en el patrón espacial y los niveles del ARNm de E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit para determinar si una lesión cervical en un ser humano es una lesión benigna o una lesión CIN, que comprende, en un recipiente adecuado, agentes para llevar a cabo un ensayo de ARN ISH incluyendo (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñados para hibridarse individualmente con el ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo y (ii) un sistema de amplificación de señal universal.

En una realización, los uno o más subtipos de HPV de alto riesgo mencionados anteriormente se seleccionan de un grupo de 18 subtipos de HPV que consisten en: HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-73 y HPV-82 o cualquier combinación de los mismos. En una realización, todos los 18 subtipos de HPV anteriores se usan en el ensayo de HPV RNAscope®. En otra realización, se usa un conjunto de 15 subtipos de HPV de los 18 subtipos de HPV anteriores en el ensayo de HPV RNAscope®, incluyendo: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73 y HPV-82. En otra realización, se utiliza un conjunto de 7 subtipos de HPV de los 18 subtipos de HPV anteriores en el ensayo de RNAscope®, que incluye: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52, y HPV-58. En otra realización más, sólo se utiliza uno de los 18 subtipos anteriores, es decir, HPV-16.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar cáncer cervical en un ser humano diagnosticado con CIN, que comprende: (a) obtener una muestra de dicho humano en la que dicha muestra está en una sección de tejido; (b) llevar a cabo un ensayo de ARN ISH usando (i) uno o más conjuntos de sondas diana que están diseñados para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo, y (ii) un sistema de amplificación de señal universal; en el que dichos uno o más subtipos de HPV de alto riesgo están organizados en tres grupos de subtipos de HPV cada uno con un nivel diferente de riesgo de transformar CIN en cáncer cervical; en el que la presencia de ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV del grupo (1) indica el mayor riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, la presencia de ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV del grupo (2) indica un menor riesgo de desarrollar cáncer cervical y la presencia de los subtipos de HPV de ARNm E6/E7 del grupo (3) indica el menor riesgo de desarrollar cáncer cervical.

En una realización, dichos subtipos de HPV del grupo (1) incluyen HPV-16; dichos subtipos de HPV del grupo (2) incluyen HPV-18, HPV-31 y HPV-33; y dichos subtipos de HPV del grupo (3) incluyen HPV-26, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV -66, HPV-68, HPV-73 y HPV-82.

En una realización preferida, el ensayo de ISH antes mencionado es un ensayo de RNAscope®.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra el principio del ensayo RNAscope®. Etapa 1: Las células o tejidos se fijan y se permeabilizan para permitir el acceso de la sonda diana. Etapa 2: Las sondas diana de oligonucleótidos específicos de ARN diana se

hibridan con mARNs múltiples. Etapa 3: Se hibridan moléculas de amplificación de señal múltiple que cada una reconoce a una sonda diana específica. Cada sonda marcadora única se conjuga con un fluoróforo o enzima diferente, se conjuga una sonda marcadora universal con un fluoróforo o enzima idénticos. Paso 4: Se detectan las señales usando un microscopio estándar de campo brillante o epifluorescente.

5 La Fig. 2 ilustra el resultado de la prueba de viabilidad de un ensayo de HPV RNAscope®. El ensayo de HPV RNAscope® fue diseñado para detectar y diferenciar tres subtipos de HPV. Los conjuntos de sondas objetivo diseñados para hibridarse específicos de ARNm de E6/E7 de HPV-16, HPV-18 o HPV-45 se ensayan en varias líneas celulares que contienen HPV. La figura muestra que el conjunto de sondas HPV-16 produce una señal positiva en células SiHa que se sabe que alberga el subtipo HPV-16, el conjunto de sondas HPV-18 produce una
10 señal positiva en células Hela que se sabe que aloja el HPV-18, y el conjunto de sondas HPV-45 produce una señal positiva en células MS751 que se sabe que albergan el subtipo HPV-45. Cada una de las líneas celulares anteriores no produce señales positivas cuando se prueban los subtipos de HPV que estas líneas celulares no tienen.

La Fig. 3 ilustra la detección de ARNm E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo en muestras de tejido FFPE derivadas de pacientes con HNC. Los conjuntos de sondas objetivo diseñados para hibridarse con conjuntos de
15 sondas HPV-16 (conjunto de sondas HPV-16) y sondas diana que están diseñados para hibridarse con HPV-18, -31, -33, -35, -52 y -58 (conjunto de sondas HR-HPV) se prueban en pacientes infectados por el HPV. El paciente 1 es un paciente con HNC que se sabe que ha sido infectado con uno o más de los subtipos HPV-18, -31, -33, -35, -52 y -58. El paciente 2 es un paciente con HNC que se sabe que ha sido infectado con el subtipo HPV-16. La figura muestra que los conjuntos de sondas diseñados en la presente invención son capaces de detectar a ambos pacientes con
20 HNC. Además, los conjuntos de sondas son capaces de distinguir a los pacientes infectados por el HPV-16 (imagen inferior izquierda) de aquellos pacientes con HNC que albergan otros subtipos de alto riesgo del HPV (imagen superior derecha).

La Fig. 4 ilustra la detección de ARNm E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo en muestras de tejido FFPE derivadas de pacientes que han sido diagnosticados con lesiones cervicales. El grupo de conjuntos de sondas
25 objetivo en este experimento fue diseñado para hibridarse con los subtipos de HPV HPV-16, -18, -26, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -53, -56, -58, -59, -66, -68, -73 y -82. El ensayo de RNAscope® con el grupo de conjuntos de sondas diana anteriores se lleva a cabo en una muestra de tejido cervical de pacientes que han sido diagnosticados con lesiones cervicales. La figura muestra que los subtipos de HPV de alto riesgo identificados anteriormente fueron detectados en pacientes diagnosticados con CIN1, CIN2, CIN3 y carcinoma maligno. La figura también muestra la
30 diferencia en el patrón espacial y los niveles de mARN de E6/E7 de los subtipos de HPV de alto riesgo en CIN1, CIN2, CIN3 y carcinoma maligno.

Descripción detallada

La presente invención se refiere al uso del ensayo de RNAscope® para detectar el ARNm de E6/E7 de uno o más
35 subtipos de HPV de alto riesgo que son conocidos por relacionarse con el cáncer. Los inventores desarrollaron este ensayo de hibridación in situ de ARNm (ISH) basado en el hecho bien conocido de que algunos subtipos de HPV están relacionados con el cáncer de cabeza y cuello y algunos subtipos de HPV están relacionados con el carcinoma cervical y las lesiones cervicales precursoras. En un paciente con HNC infectado con HPV, es más probable encontrar el ARNm de E6/E7 de uno o más de los siete subtipos de HPV siguientes: HPV-16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58 (definidos en este documento como "el subgrupo de HPV de 7"). La detección de cualquiera de los siete
40 subtipos de HPV mencionados anteriormente ayuda a determinar que un HNC está relacionado con el HPV. Esta determinación, a su vez, ayuda a determinar la progresión del cáncer y a diseñar el tratamiento adecuado. Un grupo de dieciocho subtipos de HPV incluyendo HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 (denominados en este documento como "el subgrupo de HPV de 18") o un grupo de 15 subtipos de HPV incluyendo HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 (denominado en este documento como "el subgrupo de HPV de 15") también puede usarse en la prueba anterior. El subtipo de HPV individual en el subgrupo de 18 del HPV, o una combinación de los 18 subtipos, distintos de los identificados anteriormente, también tienen poder de
45 pronóstico en diversos grados.

En un paciente al que se le diagnostica una lesión cervical, la determinación del ARNm de E6/E7 presente de uno o más de los siguientes subgrupos de HPV de 18 ayudará a determinar si las lesiones cervicales son benignas o están
50 relacionadas con CIN. Los dieciocho subtipos de HPV de alto riesgo incluyen HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. Un grupo de quince subtipos de HPV incluyendo HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 también puede usarse en la prueba de lesión cervical. El subtipo individual de HPV en el subgrupo de 18 del HPV, o una combinación de los 18 subtipos, distintos de los identificados anteriormente, también tienen poder pronóstico sobre la naturaleza de la lesión cervical en diversos grados. La presencia de ARNm de
55 E6/E7 de los subtipos de HPV de alto riesgo mencionados anteriormente en una lesión cervical indica una lesión CIN o cáncer cervical (15).

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece la invención. Las

siguientes definiciones complementan a las de la técnica y se dirigen a la solicitud actual y no deben imputarse a ningún caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a ninguna patente o aplicación común. Aunque en la práctica para ensayar la presente invención pueden utilizarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención, se describen los materiales y procedimientos preferidos. Por consiguiente, la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa.

El término "polinucleótido" (y la expresión equivalente "ácido nucleico") abarca cualquier cadena física de unidades de monómeros que puede corresponder a una cadena de nucleótidos, incluyendo un polímero de nucleótidos (por ejemplo, un polímero típico de ADN o ARN), ácidos nucleicos de péptido (PNA), oligonucleótidos modificados (por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden nucleótidos que no son típicos de ARN o ADN biológico, tales como oligonucleótidos 2'-O-metilados) y similares. Los nucleótidos del polinucleótido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos, pueden ser naturales o no naturales, y pueden estar no sustituidos, no modificados, sustituidos o modificados. Los nucleótidos pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster, o por enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato, enlaces borano-fosfato, o similares. El polinucleótido puede comprender adicionalmente elementos no nucleotídicos tales como marcadores, inactivadores, grupos de bloqueo, o similares. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, monocatenario o bicatenario.

Una "diana de ácido nucleico" o "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico, u opcionalmente a una región del mismo, que ha de ser detectada.

Una "secuencia polinucleotídica" o "secuencia nucleotídica" es un polímero de nucleótidos (un oligonucleótido, un ADN, un ácido nucleico, etc.) o una cadena de caracteres que representa un polímero nucleotídico, dependiendo del contexto. A partir de cualquier secuencia polinucleotídica especificada, se puede determinar el ácido nucleico dado o la secuencia polinucleotídica complementaria (por ejemplo, el ácido nucleico complementario).

El término "gen" se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Los genes típicamente incluyen secuencias de codificación y/o secuencias reguladoras requeridas para la expresión de tales secuencias de codificación. El término gen puede aplicarse a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

Los términos "biomarcador" y "marcador", tal como se usan indistintamente en la presente memoria, se refieren tanto a la proteína/producto génico en cuestión como al gen que codifica este producto.

Las expresiones "muestra biológica" o "muestra de tejido", tal como se usan en este documento, se refieren a una muestra obtenida de un sujeto biológico, incluyendo una muestra de tejido biológico o de origen fluido, obtenida, alcanzada o recogida in vivo o in situ. Una muestra biológica también incluye muestras de una región de un sujeto biológico que contiene células o tejidos precancerosos o cancerosos. Tales muestras pueden ser, pero no se limitan a, órganos, tejidos, fracciones y células aisladas de un mamífero. Las muestras biológicas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, lisado celular, un cultivo celular, una línea celular, un tejido, un órgano, un orgánulo, un fluido biológico y similares. Las muestras biológicas preferidas incluyen, pero no se limitan a, una muestra de piel, biopsias de tejido, y similares.

Un "marcador" es un resto que facilita la detección de una molécula. Los marcadores comunes en el contexto de la presente invención incluyen marcadores fluorescentes, luminiscentes, dispersantes de luz y/o colorimétricos. Los marcadores adecuados incluyen enzimas y restos fluorescentes, así como radionucleídos, sustratos, cofactores, inhibidores, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las Pat. de EE.UU. N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4,275,149; y 4.366.241. Muchos marcadores están comercialmente disponibles y se pueden usar en el contexto de la invención.

Una "sonda diana" es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana y de capturar una sonda marcadora a ese ácido nucleico diana. La sonda diana puede hibridarse directamente con la sonda marcadora, o puede hibridarse con uno o más ácidos nucleicos que a su vez se hibridan con la sonda marcadora; por ejemplo, la sonda diana puede hibridarse con un amplificador o un preamplificador. La sonda diana incluye así una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico diana y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica de la sonda marcadora, amplificadora, preamplificadora o similar. La sonda diana es preferiblemente monocatenaria. La sonda diana también se denomina "sonda de captura" en la Solicitud de EE.UU. No. 11/471.278 y "extensor de marcador" en la Patente de Estados Unidos N° 7.709.198. Los tres términos se utilizan indistintamente en esta solicitud.

Un "amplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que es capaz de hibridarse con múltiples sondas de marcaje. Típicamente, el amplificador se hibrida con múltiples sondas marcadoras idénticas. El amplificador también se hibrida con al menos una sonda diana o ácido nucleico unido a una sonda diana. Por ejemplo, el amplificador puede hibridarse con al menos una sonda diana y con una pluralidad de sondas marcadoras, o con un preamplificador y una pluralidad de sondas de marcaje. El amplificador puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico lineal, bifurcado, de tipo peine o ramificado. Como se ha observado para todos los polinucleótidos, el amplificador

puede incluir nucleótidos modificados y/o enlaces internucleótidos no estándar así como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o enlaces fosfodiéster estándar. Los amplificadores adecuados se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.635.352, patente de EE.UU. N° 5.124.246, patente de EE.UU. N° 5.710.264 y patente de EE.UU. N° 5.849.481.

- 5 Un "preamplificador" es una molécula, típicamente un polinucleótido, que sirve como intermedio entre una o más sondas diana y amplificadores. Típicamente, el preamplificador se hibrida simultáneamente con una o más sondas diana y con una pluralidad de amplificadores. Ejemplos de preamplificadores se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.635.352 y la patente de EE.UU. N° 5.681.697.

Aplicaciones en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello

- 10 Un aspecto de la presente invención se conceptualizó en la idea de que la detección de los biomarcadores de HPV asociados con el cáncer de cabeza y cuello ayudaría a determinar si el cáncer de cabeza y cuello probado está relacionado con el HPV. Se propone si se presentan subtipos de HPV, tales como HPV-16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58, que se sabe que son de alto riesgo para causar el cáncer de cabeza y cuello en el tejido de muestra de un paciente. El paciente, que se sabe que tiene cáncer de cabeza y cuello, es probable que tenga el tipo de cáncer de cabeza y
 15 cuello que está relacionado con el HPV. En una realización de la invención, el ensayo de HPV RNAscope® está diseñado para la detección in situ del ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV de alto riesgo en una sección de tejido. La muestra de tejido se obtiene primero de un paciente que ha sido diagnosticado con cáncer de cabeza y cuello. La muestra de tejido puede estar en una sección de tejido fijada con formalina, embebida en parafina (FFPE), o ser capturada sobre una superficie sólida por otros medios, o suspendida en una solución. Cuando la muestra está
 20 en una sección de tejido de FFPE, el tejido puede tratarse con un agente de pretratamiento de tejido, tal como calentando en un tampón de citrato seguido de digestión con una proteasa. El propósito del pretratamiento es permitir el acceso de ARN por las sondas diana a través de la interrupción de la reticulación de formaldehído creada en el procedimiento de preparación de la muestra. Una "sonda diana" es un polinucleótido que es capaz de hibridarse con un ácido nucleico diana y de capturar una sonda marcadora a ese ácido nucleico diana. La sonda
 25 diana incluye así una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del ácido nucleico diana y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal. En una realización preferida, dos sondas diana se hibridan contiguamente sobre un ácido nucleico diana. Las dos sondas diana que se hibridan sobre un ácido nucleico diana se denominan conjunto de sondas diana. Después del pretratamiento opcional, se realiza el ensayo de RNAscope®
 30 en la muestra de tejido.

- En el ensayo RNAscope®, una pluralidad de conjuntos de sondas diana están diseñados para hibridarse con una pluralidad de ácidos nucleicos diana, es decir, ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV. Cada uno de los conjuntos de sondas diana está diseñado para hibridarse específicamente a un ácido nucleico diana. En una realización preferida, la pluralidad de ácidos nucleicos diana incluyen ARNm de E6/E7 de HPV-16, 18, 31, 33, 35, 52 y 58. En
 35 otra realización, solo el ARNm de E6/E7 de HPV-16 es el ácido nucleico diana. El HPV-16 está asociado con el cáncer de cabeza y cuello en la mayoría de los casos. En otra realización, el resto de los subtipos de HPV en el subgrupo de HPV de 7 se usan como un grupo de ácidos nucleicos diana, es decir, HPV-18, 31, 33, 35, 52 y 58. En otra realización, la pluralidad de los ácidos nucleicos diana incluye el ARNm de E6/E7 de HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la pluralidad de ácidos nucleicos diana incluye el ARNm de E6/E7 de HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,
 40 68, 73 y 82. Puesto que cada conjunto de sondas diana reconoce un subtipo de HPV, los conjuntos de sondas diana pueden usarse individualmente o en agrupaciones dependiendo de los subtipos de HPV que se pretende detectar en un ensayo dado. Por ejemplo, si sólo se desea detectar el subtipo de HPV HPV-16, sólo se utiliza el conjunto de la sonda diana para HPV-16. En otro caso, si sólo se pretenden detectar los subtipos de HPV HPV-16 y HPV-18, sólo se utilizan los conjuntos de sondas de diana para HPV-16 y HPV-18.
 45

- En una realización preferida, cada conjunto de sondas diana contiene la misma secuencia de reconocimiento para un sistema de amplificación de señal. Dicho sistema de amplificación de señal se denomina sistema de amplificación de señal universal porque permite que los subtipos de HPV sean "agrupados" y detectados por un único sistema de amplificación de señal. El beneficio de utilizar el sistema universal de amplificación de señal se basa en su
 50 simplicidad y escalabilidad. Permite la adición sin problemas de nuevos subtipos de HPV sin rediseñar el sistema de amplificación de señal. Si se identifica un nuevo subtipo de HPV de alto riesgo en el futuro, puede agregarse rápidamente al ensayo de HPV RNAscope® sin mucho cambio del sistema de ensayo.

- El sistema de amplificación de señal contiene o bien un marcador de peroxidasa de rábano picante (HRP) o de fosfatasa alcalina (AP), que puede detectarse mediante la formación de un precipitado después de la incubación con
 55 sustratos DAB o Fast Red, respectivamente. Opcionalmente, el sistema de amplificación de señal contiene amplificadores y preamplificadores que están diseñados para ayudar a amplificar las señales del ácido nucleico diana.

- En otra realización, se diseña un sistema de amplificación de señal distinto para cada ácido nucleico diana en el conjunto de ácidos nucleicos diana. En este caso, cada conjunto de sondas diana está diseñado para contener una
 60 secuencia de reconocimiento específica para cada sistema de amplificación de señal diferente. Esto permite la

diferenciación de ácidos nucleicos diana basándose en las distintas señales emitidas desde los sistemas de amplificación de señal a los que cada uno corresponde. Aunque este diseño pierde la simplificación y la escalabilidad descritas anteriormente, permite la diferenciación de los ácidos nucleicos diana cuando tal requisito es necesario.

5 En otra realización, el resultado de la detección in situ de ARNm de E6/E7 de HPV puede usarse para guiar el plan de tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. Por ejemplo, si se determina que el cáncer de cabeza y cuello está relacionado con el HPV, el plan de tratamiento puede establecerse para dirigirse al HPV y, más específicamente, a los subtipos de HPV que se identifican mediante el ensayo de HPV RNAscope®.

10 En otra realización, la presente invención proporciona un método para determinar la progresión del cáncer de cabeza y cuello en un paciente. Por ejemplo, el ensayo de HPV RNAscope® específico de HNC descrito anteriormente se utiliza para cuantificar los niveles de mARNs de E6/E7 de los subtipos HPB de alto riesgo en el paciente. Basándose en los niveles de los ARNm de E6/E7, se determina entonces el estado del HNC. Si dicha prueba se realiza repetidamente, el estado del HNC puede ser seguido durante un período de tiempo y posteriormente ser utilizado para el pronóstico del cáncer y guiar su tratamiento.

15 En otra realización, la presente invención proporciona también un kit que comprende reactivos e instrucciones para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria.

20 La presente invención presenta un nuevo concepto de usar el ensayo de RNAscope® para detectar ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo que se sabe están relacionados con un cáncer, por ejemplo, un cáncer de cabeza y cuello o un cáncer cervical. El ensayo detecta un pequeño número de subtipos de HPV entre más de 100 subtipos en la familia de HPV. Los subtipos de HPV son altamente homólogos dentro de la familia y por lo tanto hacen muy difícil para un ensayo ISH diferenciar cada subtipo con una especificidad muy alta. Este problema se ve agravado por el requisito de agrupar las sondas diana de diferentes subtipos de HPV en un ensayo, lo que requiere que se incluyan cientos de oligos en una única reacción pero siendo todavía posible unirse a sus propios ácidos nucleicos diana pero sin interferir con la unión de otros oligos a sus dianas. Es sorprendente que las sondas diana agrupadas diseñadas en esta invención no interfirieran entre sí y que el diseño final de las sondas diana sea efectivamente capaz de diferenciar subtipos de HPV diana de subtipos de HPV no diana con alta especificidad.

Aplicaciones en el tratamiento del cáncer de cuello uterino

30 Un aspecto de la presente invención se basó en la idea de que detectar biomarcadores de HPV asociados con el cáncer de cuello uterino ayudaría a determinar si una lesión cervical observada en un paciente es una lesión benigna o una lesión CIN. Tradicionalmente, la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) se clasifica según la histología. La muestra de biopsia de los tejidos cervicales es observada por los médicos que luego clasifican el CIN por su morfología. Cuando se diagnostica el grado CIN, la fiabilidad del diagnóstico es problemática, ya que el diagnóstico histológico de CIN se basa en la interpretación subjetiva de los hallazgos celulares y la morfología. Una mala precisión diagnóstica y reproducibilidad pueden complicar y afectar la atención del paciente. La clasificación incorrecta del grado CIN en la biopsia puede conducir a un seguimiento o tratamiento inapropiado de los pacientes. Los profesionales clínicos corren el riesgo de sobre-tratar lesiones benignas o de manejar mal las lesiones precancerosas. La presente invención proporciona un método para ayudar en la evaluación y el diagnóstico de especímenes de biopsia cervical basados en la presencia de subtipos de alto riesgo de HPV.

40 Actualmente, los frotis de Papanicolaou obtenidos durante el cribado del cáncer cervical padecen las mismas limitaciones que el procesamiento de la biopsia cervical en la histología. La morfología de las células cervicales en la citología no puede concluir sobre la causa de la infección por HPV. Los cambios morfológicos debidos a infecciones benignas por HPV no pueden distinguirse de las lesiones malignas precancerosas del HPV. Una ventaja del método descrito en este documento es que puede probar la naturaleza de la lesión cervical a nivel molecular y determinar así si la lesión cervical es una lesión benigna o una lesión CIN. Se propone que si alguno de los ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV de HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, y 82 se detecta en los tejidos cervicales de un paciente, la lesión cervical se puede descartar como una lesión CIN. Si no se detecta ninguno de los subtipos de HPV de alto riesgo antes mencionados, la lesión cervical se determinará como lesión benigna. En otras realizaciones, los subtipos de HPV de HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, tanto solos como en diversas combinaciones, pueden utilizarse como biomarcador(es) para evaluar la lesión cervical.

55 En una realización de la invención, el ensayo de HPV RNAscope® está diseñado para la detección in situ de ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo en una sección de tejido derivada del cuello uterino de pacientes. La muestra de tejido se obtiene primero de un paciente que ha sido diagnosticado con una lesión de HPV. La muestra puede ser capturada en una sección fijada con formalina, embebida en parafina, o capturada en una superficie sólida por otros medios, o suspendida en una solución. Cuando se usa una sección de tejido FFPE, el tejido se trata después con un agente de pretratamiento de tejido, tal como con calentamiento en un tampón de citrato seguido de digestión con una proteasa. Después de preparar la muestra, se lleva a cabo el ensayo RNAscope® para detectar los subtipos de alto riesgo del HPV en la muestra.

En el ensayo de HPV RNAscope®, se diseña una pluralidad de conjuntos de sondas diana para hibridarse con una pluralidad de ácidos nucleicos diana que son ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo. En una realización preferida, la pluralidad de los ácidos nucleicos diana incluye el subgrupo HPV de 18. En otra realización, la pluralidad de ácidos nucleicos diana incluye el subgrupo de HPV de 15. En otra realización, el ácido nucleico diana es el HPV-16 solo. De forma similar al método descrito en la sección anterior con respecto a HNC, cada conjunto de sondas diana está diseñado para reconocer un subtipo de HPV, y los conjuntos de sondas diana pueden usarse individualmente o en un grupo, dependiendo de si los subtipos de HPV están destinados a ser detectados individual o indistinguiblemente. En una realización preferida, cada conjunto de sondas diana contiene una secuencia de reconocimiento idéntica adecuada para ser detectada por un sistema de amplificación de señal universal.

El sistema de amplificación contiene tanto un marcador de peroxidasa de rábano picante (HRP) como de fosfatasa alcalina (AP), que puede detectarse mediante la formación de un precipitado después de la incubación con sustratos DAB o Fast Red, respectivamente. Opcionalmente, el sistema de amplificación de señal contiene amplificadores y preamplificadores que están diseñados para ayudar a amplificar las señales del ácido nucleico diana. En otra realización, el conjunto de sondas de captura está diseñado cada uno para contener una secuencia de reconocimiento específica para un sistema de amplificación de señal específico y, de este modo, para permitir la detección de diferentes ácidos nucleicos diana basados en las diferentes señales emitidas desde cada sistema de amplificación de señal específico.

Además, el método descrito en la presente memoria puede utilizar el patrón espacial y los niveles de ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo en un paciente diagnosticado de lesión cervical para evaluar el estado de progresión hacia la neoplasia completa y asistir en el control y el tratamiento de seguimiento de dicho paciente. Actualmente, no hay buenos métodos para ayudar en el control de pacientes con lesiones cervicales de bajo grado donde tales lesiones pueden progresar o regresar. Los métodos actualmente disponibles prueban el estado de progresión hacia la neoplasia maligna completa basándose en la clasificación histológica, que clasifica las lesiones intraepiteliales de neoplasia cervical en CIN1, CIN2, CIN3 y cáncer invasivo (10). Se considera que una clasificación de CIN2 o peor (CIN2+) es el umbral para procedimientos quirúrgicos agresivos. Sin embargo, el diagnóstico CIN2 por histología sola es muy variable e impreciso, lo que conduce tanto al infra-tratamiento como al supra-tratamiento (11). La incapacidad de predecir qué mujeres progresarán a lesiones de grado superior de aquellas mujeres que tendrán regresión tiene como resultado que todas las mujeres recibirán el mismo seguimiento intensivo y las mismas pruebas, lo que desecha recursos financieros y médicos y también reduce la productividad laboral del paciente.

La prueba basada en el ARNm de E6/E7 de HPV puede definir mejor la actividad oncogénica de la lesión cervical y reflejar mejor la progresión o regresión de la enfermedad (12). Por lo tanto, una realización de la presente invención es utilizar el ensayo de HPV RNAscope® para detectar el patrón espacial y los niveles del ARNm de E6/E7 de los subtipos de alto riesgo del HPV. Un grupo de estos subtipos es el subgrupo de HPV de 18. Otro grupo de estos subtipos es el subgrupo de HPV de 15. También puede usarse el HPV-16 solo. Mediante la determinación de la progresión de CIN en un paciente, la presente invención permite clasificar a los pacientes más específicamente basándose en el riesgo de progresión de la enfermedad, en lugar de exigir que todos los pacientes tengan múltiples visitas al consultorio y exámenes repetidos de citología y colposcopia.

En otra realización, la presente invención puede utilizarse para detectar por separado la presencia de varios grupos de subtipos de HPV. Cada uno de estos grupos contiene subtipos de HPV que tienen el mismo riesgo de persistencia viral y cáncer cervical. Actualmente se ha establecido que diferentes subtipos de HPV tienen niveles muy diferentes de riesgo de causar cáncer precanceroso (CIN3) y cáncer (13, 14). El ensayo de HPV RNAscope® puede ser configurado para detectar subtipos de HPV asociados con diferentes niveles de riesgo. Por ejemplo, los inventores desarrollaron ensayos de HPV RNAscope® que pueden analizar tres grupos de subtipos de HPV, por ejemplo, el grupo 1 que contiene solo HPV-16, el grupo 2 que contiene un grupo de HPV-18, 31, 33 y el grupo 3 que contiene una agrupación de HPV-26, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. Los inventores han descubierto que la positividad del subtipo de HPV del grupo 1 indica el nivel más alto de desarrollo del cáncer cervical. La positividad de los subtipos de HPV del grupo 2 indica un menor riesgo de desarrollar cáncer cervical. Los subtipos del HPV del grupo 3 indican el menor riesgo de desarrollar cáncer cervical. Esta prueba puede ser una estrategia de genotipificación altamente eficiente que proporciona una evaluación individualizada del riesgo. Mediante una mejor evaluación de la etapa de progresión de la enfermedad y el riesgo de desarrollo viral persistente y de cáncer, la prueba de HPV RNAscope® puede proporcionar así información objetiva para el control óptimo de la enfermedad. Por ejemplo, basándose en la evaluación de la etapa de progresión de la enfermedad y el riesgo de desarrollar cáncer, se pueden seleccionar las opciones de tratamiento que sean mejores para el paciente. También se puede optimizar la frecuencia para repetir la prueba por el paciente.

En otra realización, la presente invención proporciona también un kit que comprende reactivos e instrucciones para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria para detectar ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo en lesiones cervicales.

La presente invención presenta un nuevo concepto de determinar si una lesión cervical en un paciente es una lesión benigna o una lesión CIN basada en la presencia o ausencia de ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV de alto riesgo. Antes de la descripción de la presente invención, no era obvio para las personas de la técnica que la detección de

ARNm de HPV de alto riesgo en muestras de tejido cervical podía tener una utilidad clínica significativa en el diagnóstico de seguimiento para los pacientes con resultados positivos de cribado. Los inventores de esta solicitud descubrieron un método para usar el patrón espacial y el nivel de ARNm de E6/E7 de subtipos de alto riesgo de HPV en un paciente para evaluar el estado de progresión hacia la neoplasia maligna completa. Los inventores de esta solicitud también establecieron un método para usar subtipos de ARNm de HPV de E6/E7 agrupados para evaluar el nivel de riesgo de una lesión de bajo nivel para progresar a un nivel más alto, una lesión maligna y un cáncer.

Tecnología de ensayo RNAscope®

Los inventores de esta solicitud han desarrollado un método de hibridación in situ (Patente de los Estados Unidos N° 7.709.198 y Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 11/471. 278), llamado RNAscope®, que permite la visualización directa de ARN in situ. Este método utiliza los conjuntos de sondas de oligonucleótidos y los nuevos sistemas de amplificación de señales descritos a continuación. El ensayo puede usarse en una variedad de tipos de muestras incluyendo células cultivadas, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), tejido congelado y tejido embebido en parafina fijado con formalina. Además, el ensayo puede utilizar reactivos de detección tanto cromogénicos como fluorescentes.

La tecnología de ensayo RNAscope® proporciona ensayos de ácidos nucleicos multiplex en células individuales (véase la figura 1). En el centro de esta tecnología está el diseño de la sonda "doble Z", que permite la amplificación robusta de señales de hibridación específicas sin amplificar también eventos no específicos. Cada sonda diana ("Z") tiene una secuencia específica de diana, que se une al ARNm diana, un espaciador y una secuencia de "cola". Dos sondas diana (doble Z) se hibridan contiguamente sobre un ARNm diana, y las dos secuencias de "cola" forman un sitio de hibridación para el PreAmplificador. Por ejemplo, la longitud del sitio de hibridación puede tener una longitud de 28 bases. El diseño de la sonda doble Z asegura una alta fidelidad de la amplificación de la señal porque 1) es altamente improbable que un par de sondas diana se hibriden inespecíficamente yuxtapuestas entre sí para formar un sitio de unión para el PreAmplificador; y 2) ninguna cola sola puede unirse eficientemente al PreAmplificador bajo las condiciones de ensayo. El PreAmplificador, el Amplificador y la Sonda Marcadora se hibridan secuencialmente a cada par de sondas diana, dando como resultado la acumulación de hasta 8.000 moléculas marcadoras por 1 kb de ARN diana. La Sonda Marcadora puede conjugarse con un fluoróforo o con una enzima cromogénica (por ejemplo, HRP), que permite la visualización de señales de hibridación bajo un microscopio de campo brillante estándar o epifluorescente, respectivamente. Con una Sonda Marcadora fluorescente, las señales pueden contener al menos 100 veces más moléculas fluorescentes que los métodos ISH fluorescentes tradicionales de ARN y son fácilmente visibles bajo un microscopio fluorescente estándar.

Además, se han construido amplificadores de señales múltiples que cada uno reconoce una secuencia de cola única en las sondas diana, lo que permite la visualización simultánea de múltiples ARN diana. Es importante destacar que este ensayo es compatible con el ARN parcialmente degradado presente en los tejidos FFPE de archivo, ya que los pares de sondas doble Z se dirigen a las regiones cortas de los nucleótidos en longitud.

Uso del RNAscope® para la detección de subtipos de HPV

La marcada mejora en la relación señal-ruido con el RNAscope® permite la detección de múltiples moléculas de ARN como puntos de puntuación en las diapositivas teñidas. Para demostrar esto, se ilustra a continuación un ensayo de RNAscope® para detectar tres subtipos de HPV de HPV-18, HPV-31 y HPV-33. Está claro que los conjuntos de sondas diana se pueden expandir o reducir para detectar cualquier número razonable de subtipos de HPV.

El RNAscope® se utilizó para detectar tres dianas de ácido nucleico, HPV-18, HPV-31 y HPV-33, en una muestra de tejido cervical de un paciente. En los métodos, se proporciona una muestra que comprende la célula. La célula ensayada comprende, o se sospecha que comprende, HPV-18, HPV-31 y HPV-33. En el ensayo se proporcionan: una primera sonda marcadora que comprende un primer marcador, una segunda sonda marcadora que comprende un segundo marcador y una tercera sonda marcadora que comprende un tercer marcador, en el que las señales de los tres marcadores son distinguibles entre sí. Alternativamente, los marcadores HPV-18, HPV-31 y HPV-33 son idénticos y las señales emitidas desde los tres marcadores son indistinguibles entre sí. Para cada uno de las tres dianas de ácido nucleico HPV-18, HPV-31 y HPV-33, se proporcionan tres conjuntos de sondas diana, comprendiendo cada uno al menos dos sondas diana.

En una realización de la presente invención, la primera diana de ácido nucleico es HPV-18, la segunda diana de ácido nucleico es HPV-31 y la tercera diana de ácido nucleico es HPV-33. Cuando se usan marcadores idénticos para HPV-18, HPV-31 y HPV-33, la detección de señales marcadoras en una muestra indica que o HPV-18, HPV-31 o HPV-33, o todos ellos existieron en la muestra. La detección de señales de marcador uniformadas sugiere la presencia de HPV en la muestra. Cuando los tres marcadores son distinguibles, la detección de cada marcador individual proporciona información adicional con respecto a la expresión de los genes individuales en la muestra.

El primer conjunto de sondas diana se hibrida, en la célula, con la primera diana de ácido nucleico HPV-18 (cuando la primera diana de ácido nucleico está presente en la célula), el segundo conjunto de sondas diana se hibrida, en la

célula, con la segunda diana de ácido nucleico HPV-31 (cuando la segunda diana de ácido nucleico está presente en la célula), y el tercer conjunto de sondas diana se hibrida, en la célula, con la tercera diana de ácido nucleico HPV-33 (cuando la tercera diana de ácido nucleico está presente en la célula). En el caso en el que se usan las sondas de marcaje distinguibles, la primera sonda marcadora se captura en el primer conjunto de sondas diana, la segunda sonda marcadora se captura en el segundo conjunto de sondas diana y la tercera sonda marcadora se captura en el tercer conjunto de sondas diana, capturando de este modo la primera sonda marcadora a la primera diana de ácido nucleico HPV-18, la segunda sonda marcadora a la segunda diana de ácido nucleico HPV-31 y la tercera sonda marcadora a la tercera diana de ácido nucleico HPV-33. Entonces se detectan la primera señal del primer marcador, la segunda señal del segundo marcador y la tercera señal del tercer marcador. Dado que los marcadores primero, segundo y tercero están asociadas a sus dianas de ácidos nucleicos respectivas a través de las sondas diana, la presencia del marcador(es) en la célula indica la presencia del(de las) diana(s) de ácido nucleico correspondiente(s) en la célula. Los métodos son opcionalmente cuantitativos. De este modo, se puede medir una intensidad de la primera, segunda y tercera señales, y la intensidad de la primera señal puede correlacionarse con una cantidad de HPV-18, HPV-31 y HPV-33 en la célula. Como otro ejemplo, se puede contar un punto de señal para cada copia de los genes HPV-18, HPV-31 y HPV-33 para cuantificarlos. En el caso de que se utilicen sondas de marcadores distinguibles, se capturan sondas de marcadores idénticas a las tres sondas diana diferentes.

En un aspecto, las sondas marcadoras se unen directamente a las sondas diana. En otro aspecto, las sondas marcadoras se capturan indirectamente en las sondas diana, por ejemplo, mediante la unión de preamplificadores y/o amplificadores. El uso de amplificadores y preamplificadores puede ser ventajoso para aumentar la intensidad de la señal, ya que pueden facilitar la unión de un gran número de sondas marcadoras a cada diana de ácido nucleico.

En las clases anteriores de realizaciones, una sonda diana se hibrida con cada sonda marcadora, amplificador o preamplificador. En las clases alternativas de realizaciones relacionadas, dos o más sondas diana se hibridan con la sonda marcadora, amplificador o preamplificador.

En realizaciones en las que se emplean dos o más sondas diana, las sondas diana se hibridan preferiblemente con secuencias de polinucleótidos no superpuestas en su diana de ácido nucleico respectiva. Las sondas diana pueden, pero no necesariamente, cubrir una región contigua de la diana de ácido nucleico. Las sondas de bloqueo, polinucleótidos que se hibridan a regiones de la diana de ácido nucleico no ocupadas por sondas diana, se proporcionan opcionalmente y se hibridan a la diana. Para una diana de ácido nucleico dada, las sondas diana y las sondas de bloqueo correspondientes son preferiblemente complementarias a secuencias no superpuestas físicamente distintas en la diana de ácido nucleico, cuyas secuencias no superpuestas son preferiblemente, pero no necesariamente, contiguas. Tener las sondas diana y las sondas de bloqueo opcionales contiguas entre sí puede, en algunas realizaciones, mejorar la resistencia a la hibridación, eliminar la estructura secundaria y asegurar una señal más consistente y reproducible.

Como se ha indicado, los métodos son útiles para la detección multiplex de ácidos nucleicos, incluyendo la detección simultánea de más de tres dianas de ácido nucleico. De este modo, la célula comprende opcionalmente o se sospecha que comprende una cuarta, quinta, sexta, séptima diana de ácido nucleico o incluso más. Por ejemplo, el método que detecta una cuarta diana de ácido nucleico comprende: proporcionar una cuarta sonda marcadora que comprende un cuarto marcador, en el que una cuarta señal del cuarto marcador puede ser tanto distinguible como indistinguible de las tres primeras señales dependiendo del grado de información a recopilar, proporcionar al menos dos cuartas sondas diana, hibridar en la célula la cuarta sonda diana con la cuarta diana de ácido nucleico (cuando la cuarta diana está presente en la célula), capturar la cuarta sonda marcadora a la cuarta sonda diana y detectar la cuarta señal del cuarto marcador.

En la detección de dianas de ácido nucleico en una célula, la célula está típicamente fijada y permeabilizada antes de la hibridación de las sondas diana, para retener las dianas de ácido nucleico en la célula y permitir que las sondas diana, las sondas de marcaje, etc. entren a la célula. La célula se lava opcionalmente para eliminar los materiales no capturados a una de las dianas de ácido nucleico. La célula puede lavarse después de cualquiera de las diversas etapas - por ejemplo, después de la hibridación de las sondas diana con las dianas de ácido nucleico para eliminar las sondas diana no unidas, después de la hibridación de los preamplificadores, amplificadores y/o sondas marcadoras a las sondas diana y/o similar.

Las diversas etapas de captura e hibridación pueden realizarse simultánea o secuencialmente, esencialmente en cualquier orden conveniente. Preferiblemente, se logra una etapa de hibridación dada para todas las dianas de ácido nucleico al mismo tiempo. Por ejemplo, todas las sondas diana (primera, segunda, etc.) se pueden añadir a la célula a la vez y permitiendo que se hibriden a sus dianas correspondientes, la célula puede lavarse, los amplificadores (primero, segundo, etc.) pueden hibridarse a las sondas diana correspondientes, la célula puede lavarse, las sondas marcadoras (primera, segunda, etc.) se pueden hibridar con los amplificadores correspondientes, y la célula puede lavarse de nuevo antes de la detección de los marcadores. Como otro ejemplo, las sondas diana pueden hibridarse con las dianas, la célula puede ser lavada, los amplificadores y las sondas marcadoras pueden añadirse juntas e hibridarse, y la célula puede entonces lavarse antes de la detección. Será evidente que la(s) diana(s) de ácido nucleico bicatenaria(s) están preferiblemente desnaturalizadas, por ejemplo, por calor, antes de la hibridación de la sonda(s) diana correspondiente con el/las diana(s).

En algunas realizaciones, la célula está en suspensión para todas o la mayoría de las etapas del método, para su facilidad de manejo. Sin embargo, los métodos son también aplicables a células en muestras de tejido sólido (por ejemplo, secciones de tejido) y/o en células inmovilizadas sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos u otra superficie). Por lo tanto, en una clase de realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula, y/o la célula está en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión en la muestra y durante las etapas de hibridación, captura, lavado opcional y detección. En otras realizaciones, la célula está en suspensión en la muestra que comprende la célula y la célula se fija sobre un sustrato durante las etapas de hibridación, captura y/o detección. Por ejemplo, la célula puede estar en suspensión durante las etapas de hibridación, captura y lavado opcional y puede estar inmovilizada sobre un sustrato durante la etapa de detección. En otras realizaciones, la muestra comprende una sección de tejido.

Ejemplo 1

Protocolo para el ensayo de HPV RNAscope®

Para cada muestra de tumor, se cortaron secciones de tejido de 5 micras y se montaron sobre portaobjetos de vidrio. Se realizaron los siguientes pasos para cada muestra de tumor:

1. Obtención de una muestra de un sujeto. La muestra puede ser una muestra de tejido obtenida de un paciente sin tratamiento de preservación o en una sección de tejido fijada con formalina fijada en parafina.
2. Opcionalmente, si la muestra está en una sección de tejido FFPE, la muestra se tratará, primero calentando la sección de tejido FFPE en un tampón citrato, y seguido por digestión con una proteasa.
3. Realización de un ensayo de HPV RNAscope® en la muestra, que incluye las siguientes pruebas:
 - i) realizar un control negativo usando sondas diana contra el gen bacteriano dapB;
 - ii) llevar a cabo un control positivo usando sondas diana contra el gen humano UBC;
 - iii) realizar una prueba utilizando conjuntos de sondas diana de HPV que contienen tanto un grupo de subtipos de HPV de alto riesgo como un conjunto de sonda diana individual específica para uno de estos subtipos. Por ejemplo, para el cáncer de cabeza y cuello, un solo grupo de 7 tipos de alto riesgo (HPV-16, 18, -31, -33, -35, -52 y -58) se pueden usar juntos. Alternativamente, se puede dividir los conjuntos de sondas de HPV en dos ensayos separados: uno para HPV-16 solo y otro que contiene los otros 6 tipos (HPV-18, -31, -33, -35, -52 y -58). La estrategia exacta de agrupación y división puede adaptarse a la información diagnóstica específica deseada.

Este protocolo experimental permite la evaluación de la positividad del HPV en el contexto de la integridad del ARN (UbC) y el fondo del ensayo (DapB). Una muestra se considera HPV positiva si las señales emitidas por la muestra de HPV son más altas que la muestra de DapB. Una muestra se considera negativa al HPV si no se observa señal en la muestra de HPV, pero las señales en la muestra UbC son positivas.

Ejemplo 2

Detección RNAscope® de ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV en líneas celulares específicas de los subtipos

Con el fin de demostrar la viabilidad del ensayo de HPV RNAscope® para detectar y discriminar entre diferentes subtipos de HPV, se realizó un experimento para detectar los subtipos de HPV en líneas celulares que se sabe que contienen sólo subtipos específicos de HPV. Se utilizó el protocolo para el ensayo de HPV RNAscope® descrito en el Ejemplo 1. Los conjuntos de sondas diana están diseñados para ser específicos para el ARNm E6/E7 de HPV-16, HPV-18 y HPV-45, respectivamente. La hibridación de los conjuntos de sondas a su diana se detectó utilizando un sistema de amplificación de señal conjugado con fosfatasa alcalina seguido de desarrollo con Fast Red, lo que da como resultado un precipitado rojo fluorescente. Como se muestra en la Figura 2, el conjunto de sondas diana de HPV-16 produjo una señal positiva sólo en células SiHa y CaSki, ambas de las cuales sólo albergan el subtipo HPV-16. El conjunto de sondas diana de HPV-18 produjo una señal positiva sólo en las líneas celulares Hela que albergan sólo el subtipo HPV-18. Los conjuntos de sondas diana de HPV-45 sólo produjeron señales positivas en las líneas celulares MS-751 que contienen sólo el subtipo HPV-45. Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que el conjunto de sondas diseñado en la presente invención consiguió su resultado deseado mediante la detección de subtipos específicos de HPV. Además, estos resultados muestran que los conjuntos de sondas son capaces de distinguir secuencias altamente homólogas porque los subtipos de HPV probados son idénticos hasta el 85%.

Ejemplo 3

Detección de RNAscope® de subtipos de HPV en muestras de tejidos de cáncer de cabeza y cuello

El siguiente experimento se llevó a cabo para detectar el ARNm de E6/E7 de subtipos de alto riesgo de HPV en muestras de tejido FFPE obtenidas de pacientes con HNC. En el experimento, se utilizó el protocolo para el ensayo de HPV RNAscope® descrito en el Ejemplo 1. Se crearon los dos grupos de conjuntos de sondas diana. En un grupo, los conjuntos de sondas diana contienen sólo sondas diana que sólo se unen al HPV-16. En el otro grupo, los

conjuntos de sondas diana contienen sondas diana que se unen a HPV-18, 31, 33, 35, 52 y 58 (denominadas "conjunto de sondas HR-HPV"). Múltiples muestras de pacientes con HNC que son diagnosticados con lesiones cervicales se probaron usando los grupos de sondas diana anteriores. Un resultado ejemplar se muestra en la Figura 3. El resultado muestra la detección del ARNm de E6/E7 positivo del subgrupo de alto riesgo de HPV en ambos pacientes. Se sabe que ambos pacientes tienen HNC relacionado con el HPV. Por lo tanto, la prueba demuestra que el ensayo de HPV RNAscope® con los conjuntos de sondas diana de HPV específicamente diseñados puede detectar con precisión los subtipos de HPV y determinar así si un HNC determinado está o no relacionado con HPV. Además, se utilizaron los dos grupos de conjuntos de sondas diana para distinguir entre los pacientes que albergaban HPV-16 (esquina inferior izquierda de la Figura 3) y los que albergaban otros subtipos de HPV (esquina superior derecha de la Figura 3). Esto permite una mayor separación de los diferentes genotipos del HPV. Se ha sabido que diferentes genotipos llevan niveles muy diferentes de riesgo para la progresión del cáncer. La estrategia de genotipado descrita en este ejemplo proporciona una evaluación de riesgo individualizada de pacientes de cabeza y cuello.

Ejemplo 4

15 Detección RNAscope® de subtipos de HPV en muestras de tejidos con lesión cervical

El siguiente experimento se llevó a cabo para detectar el ARNm de E6/E7 de ciertos subtipos de HPV de alto riesgo en muestras de tejido cervical obtenidas de pacientes a los que se les diagnosticó lesiones cervicales. Un microarray de tejidos que contenía múltiples casos de tejido normal del cuello uterino, CIN1, CIN2, CIN3 y carcinoma maligno se tiñó con un grupo de conjunto de sondas diseñado para reconocer el subgrupo HPV de 18. En el experimento, se utilizó el protocolo para el ensayo de HPV RNAscope® descrito en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 4, los ARNm de E6/E7 del subgrupo de HPV de 18 se detectaron en CIN1, CIN2, CIN3 y carcinoma maligno, pero no en tejidos cervicales normales. El experimento muestra que la positividad del ARNm de E6/E7 del HPV se correlaciona con la malignidad de la lesión cervical que se diagnostica por el método histológico. También se observó en la Figura 4 que el patrón espacial y el nivel de expresión del ARNm de E6/E7 del HPV (cuantificado por el número de puntos de precipitación en la imagen) varían entre CIN1, CIN2, CIN3 y carcinoma maligno. Como se describe en la presente solicitud, la morfología de la imagen del ensayo de HPV de E6/E7 RNAscope® ayuda a definir la actividad oncogénica de la infección por HPV en la lesión y, por lo tanto, permite una mejor evaluación de la progresión de la enfermedad.

Referencias

30 1. Chung, C. H. & Gillison, M. L. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 6758-62(2009).

2. D'Souza, G. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 356, 1944-56(2007).

35 3. Ang, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 363, 24-35(2010).

4. Marur, S. et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* 11, 781-789(2010).

40 5. Shi, W. et al. Comparative prognostic value of HPV 16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27, 6213-21(2009).

6. Moody, C. A, Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer* (2010).doi:10.1038/nrc2886

45 7. Lewis, J. S. et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *The American journal of surgical pathology* 34, 1088-96(2010).

8. Robinson, M., Sloan, P. & Shaw, R. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral oncology* 46, 492-6(2010).

9. Smeets, S. J. et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 121, 2465-72(2007).

50 10. Schiffman, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907(2007).

11. Stoler, M. H. & Schiffman, M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 285, 1500-5(2001).

12. Ho, C.-M. et al. Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 622-32(2010).
13. Kjaer, S. K. et al. Long-term Absolute Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse Following Human Papillomavirus Infection: Role of Persistence. *Journal of the National Cancer Institute* 102, 1478-88(2010).
- 5 14. Meijer, C. J., Snijders, P. J. & Castle, P. E. Clinical utility of HPV genotyping. *Gynecologic oncology* 103, 12-7(2006).
15. Naucler, P. et al. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *The New England journal of medicine* 357, 1589-97(2007).
16. Landis et al., *Cancer statistics, 1999. CA Cancer J Clin* 1999; 49(1):8-31.
- 10 17. Wright et al., *Precancerous lesions of the cervix*. In: Kurman R J, ed. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 5th ed. New York: Springer; 2002: 253-324.
18. Well, *Human papillomavirus associated lesions of the lower female genital tract*. In: Lowe D, Fox H, Editors. *Advances in Gynecological Pathology*. UK: Churchill Livingstone, 1992: 79-97.
- 15 19. Syrjanen, *Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV)*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 65(1):45-53.
20. Hines et al., *Human Papillomaviruses: Their clinical significance in the management of cervical carcinoma*. *Oncology* 1995; 9:279-85.
21. Solomon et al., *Cervical cancer screening rates in the United States and the potential impact of implementation of screening guidelines*. *CA Cancer J Clin* 2007; 57(2):105-11.
- 20 22. Ostor, *Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review*. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12(2): 186-92.
23. Thomison et al., *Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma*. *Hum Pathol*. 2008; 39(2):154-66.
- 25 24. Wright et al., *2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ*. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(4):340-5.
25. Wright et al., *2006 American Society for Colposcopy and Cervical Pathology-sponsored Consensus Conference. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ*. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11(4):223-39.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un cáncer de cabeza y cuello en un ser humano está relacionado con HPV, que comprende realizar un ensayo de hibridación de ARN in situ (ISH) en una muestra de cáncer de cabeza y cuello obtenida a partir de dicho humano, en donde dicha muestra está en una sección de tejido, en donde dicho ensayo ISH comprende:
- 5
- (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con el ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo, y
 - (ii) un sistema de amplificación de señales universal,
- en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,
- 10 en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal universal y
- en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana, y
- 15 en el que la presencia de ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo indica que el cáncer de cabeza y cuello en dicho ser humano está relacionado con el HPV.
2. Un método para determinar la progresión del cáncer de cabeza y cuello en un ser humano, que comprende:
- (a) llevar a cabo un ensayo de hibridación de ARN in situ (ISH) en una muestra de cáncer de cabeza y cuello obtenida a partir de dicho ser humano, en donde dicha muestra está en una sección de tejido, en la que dicho ensayo ISH comprende:
- 20
- (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con el ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo, y
 - (ii) un sistema universal de amplificación de señales; y
- (b) medir los niveles de ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo detectados en la etapa (a),
- 25 en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,
- en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal universal, y
- 30 en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana, y
- en el que los niveles de ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo determinan la progresión de dicho cáncer de cabeza y cuello.
3. Un método para determinar si una lesión cervical en un ser humano es una lesión benigna o una lesión de neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que comprende realizar un ensayo de hibridación de ARN in situ (ISH) sobre una muestra de tejido cervical obtenida a partir de dicho ser humano, en donde dicha muestra está en una sección de tejido, en donde dicho ensayo de ISH comprende:
- 35
- (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo,
 - (ii) un sistema universal de amplificación de señal,
- 40 en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,
- en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal universal, y
- 45 en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana, y
- en el que la ausencia de ARNm de E6/E7 de todos los subtipos de HPV de alto riesgo indica una lesión benigna y la presencia de ARNm de E6/E7 de dichos uno o más subtipos de HPV de alto riesgo indica una lesión de CIN.

4. Un método para determinar la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) en un ser humano, que comprende:
- 5 (a) realizar un ensayo de hibridación de ARN in situ (ISH) sobre una muestra de tejido cervical obtenida a partir de dicho ser humano, en donde dicha muestra está en una sección de tejido, en la que dicho ensayo de ISH comprende:
- (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo, y
- (ii) un sistema universal de amplificación de señales; y
- 10 (b) analizar el patrón espacial y medir los niveles del ARNm de E6/E7 de uno o más subtipos de HPV de alto riesgo detectados en la etapa (a),
- en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,
- en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de
- 15 señal universal, y
- en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana, y
- en el que el patrón espacial y los niveles del ARNm de E6/E7 de dicho uno o más subtipos de HPV de alto riesgo determinan la progresión del CIN.
5. Un método para determinar el riesgo de desarrollar cáncer cervical en un ser humano diagnosticado con
- 20 neoplasia intraepitelial cervical (CIN), que comprende realizar un ensayo de hibridación de ARN in situ (ISH) sobre una muestra de tejido cervical obtenida a partir de dicho ser humano, en donde dicha muestra está en una sección de tejido, en el que dicho ensayo ISH comprende:
- (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con el ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo, y
- 25 (ii) un sistema universal de amplificación de señal,
- en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,
- en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda
- 30 secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal universal, y
- en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana,
- en el que dichos uno o más subtipos de HPV de alto riesgo están organizados en tres grupos de subtipos de HPV cada uno con un nivel diferente de riesgo de transformar CIN en cáncer de cuello uterino, y
- 35 en el que la presencia de ARNm de E6/E7 de subtipos de HPV del grupo (1) indica el mayor riesgo de desarrollar cáncer de cuello uterino, la presencia de ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV del grupo (2) indica un menor riesgo de desarrollar cáncer cervical y la presencia del ARNm de E6/E7 de los subtipos de HPV del grupo (3) indica el menor riesgo de desarrollar cáncer cervical; y en el que dichos subtipos de HPV del grupo (1) incluyen HPV-16; dichos subtipos de HPV del grupo (2) incluyen HPV-18, HPV-31 y HPV-33; y dichos subtipos de HPV del grupo (3)
- 40 incluyen HPV-26, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-73 y HPV-82.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha sección de tejido es una sección de tejido fijada en formalina y embebida en parafina.
7. Un kit que comprende, en un recipiente adecuado, agentes para llevar a cabo un ensayo de hibridación de ARN
- situ (ISH) que incluye:
- 45 (i) más de un conjunto de sondas diana que están diseñadas para hibridarse individualmente con ARNm de E6/E7 de más de un subtipo de HPV de alto riesgo, y
- (ii) un sistema de amplificación de señales universal,
- en el que cada conjunto de sondas diana contiene una pluralidad de sondas diana,

- en el que cada sonda diana dentro de un conjunto de sondas diana comprende una primera secuencia polinucleotídica que es complementaria al ARNm de E6/E7 de un subtipo de HPV de alto riesgo y una segunda secuencia polinucleotídica que es complementaria a una secuencia polinucleotídica del sistema de amplificación de señal universal, y
- 5 en el que dicha segunda secuencia polinucleotídica es idéntica entre diferentes conjuntos de sondas diana, y
- en el que el kit es para determinar si un cáncer de cabeza y cuello en un ser humano está relacionado con el HPV o si una lesión cervical en un ser humano es una lesión benigna o una lesión cervical de neoplasia intraepitelial (CIN).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el kit de la reivindicación 7, en el que dicho sistema de amplificación de señales universal contiene un marcador de peroxidasa de rábano picante (HRP) o de fosfatasa alcalina (AP), que puede detectarse mediante la formación de un precipitado después de la incubación con sustratos DAB o Fast Red, respectivamente.
- 10 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el kit de la reivindicación 7, en el que dicho sistema de amplificación de señales universal contiene amplificadores y preamplificadores que están diseñados para ayudar a amplificar las señales del ARNm de E6/E7.
- 15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o el kit de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que dichos uno o más subtipos de HPV de alto riesgo se seleccionan de un grupo que consiste en HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-73, y HPV-82, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 11. El método o kit de la reivindicación 10, en el que dicho grupo consiste en los subtipos de HPV de: HPV-16, HPV-18, HPV-26, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-53, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66, HPV-68, HPV-73 y HPV-82.
12. El método o kit de la reivindicación 10, en el que dicho grupo consiste en subtipos de HPV de: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73, y HPV-82.
- 25 13. El método o kit de la reivindicación 10, en el que dicho grupo consiste en subtipos de HPV de: HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-52 y HPV-58.
14. El método o kit de la reivindicación 10, en el que dicho grupo consiste en el subtipo HPV-16 de HPV.

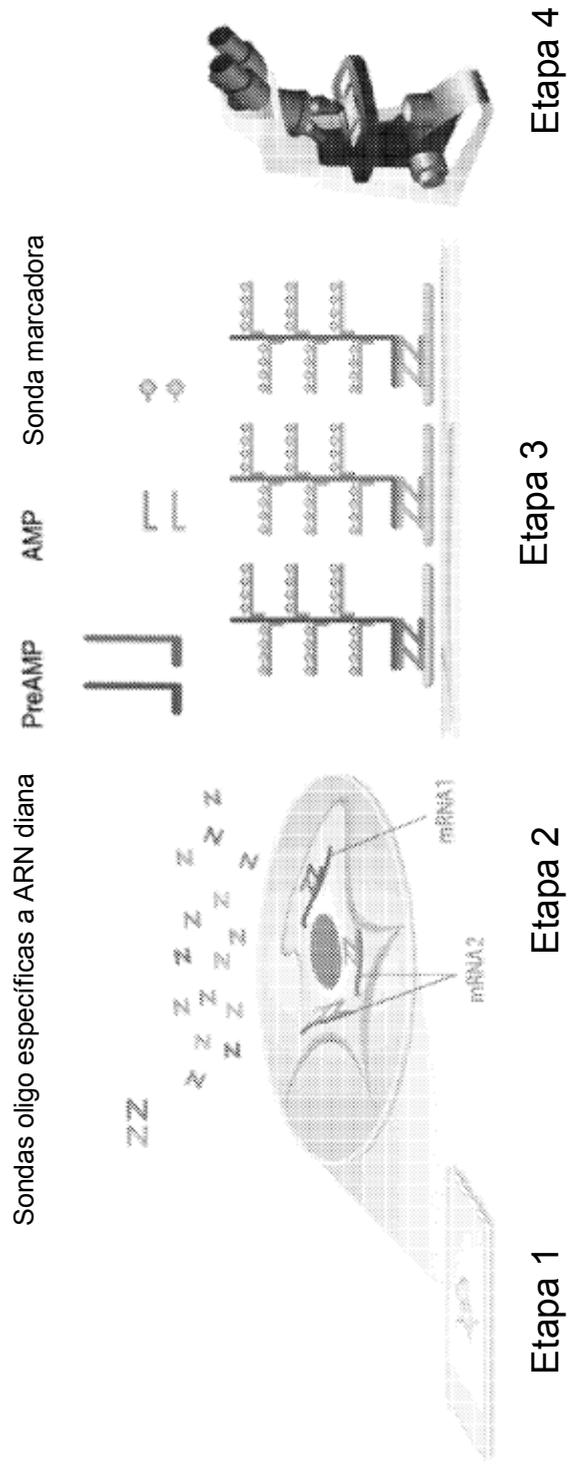


Fig. 1

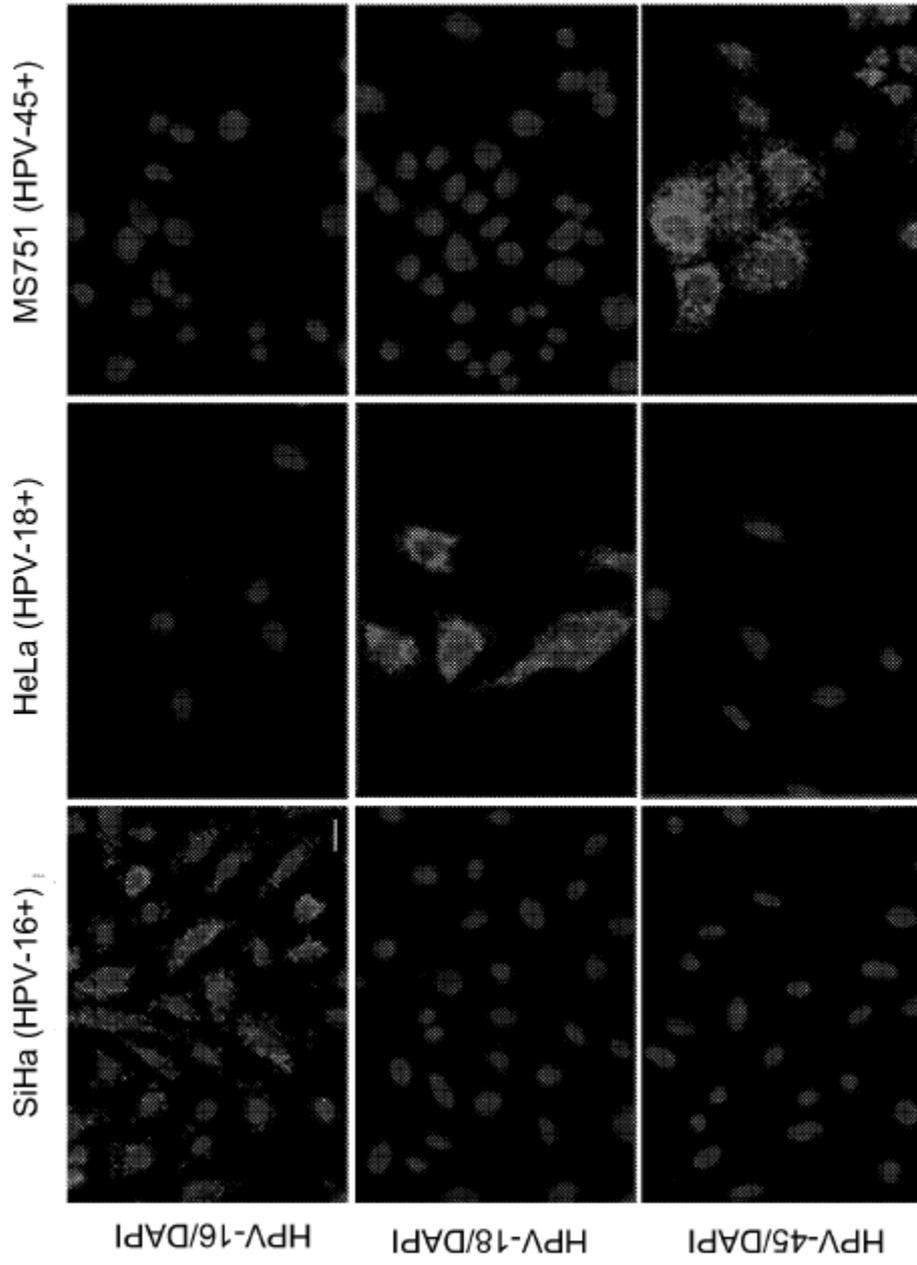


Fig. 2

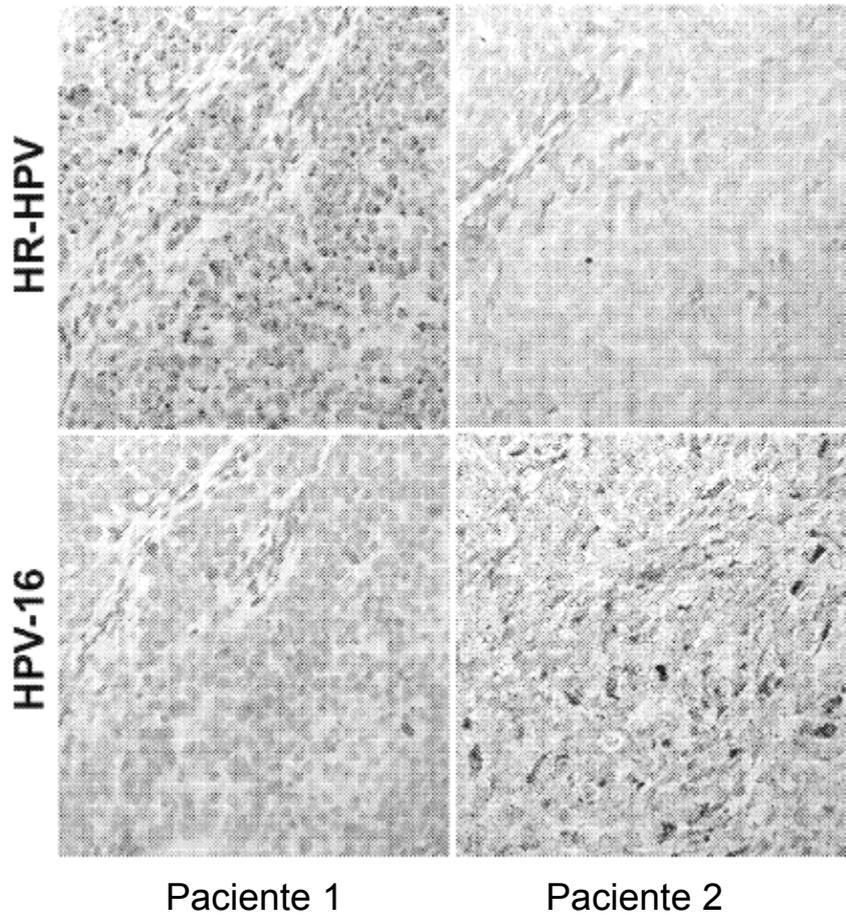


Fig. 3

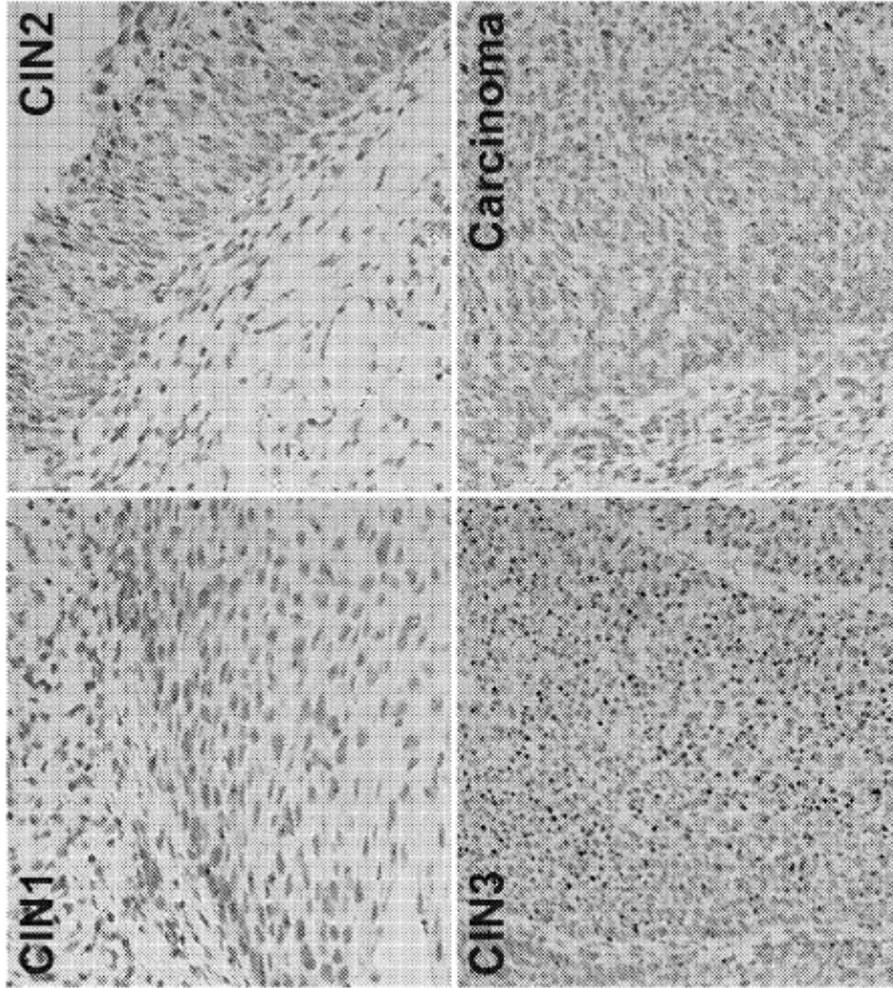


Fig. 4