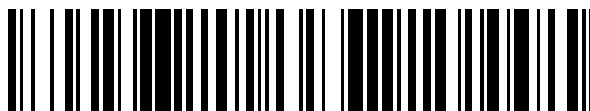


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 698**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2009 PCT/EP2009/006415**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10025928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2009 E 09736808 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2356460**

54 Título: **Procedimiento para la predicción del riesgo de progresión de tumores**

30 Prioridad:

04.09.2008 EP 08105235

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

16.04.2018

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**MARTIN, PETER y
RIDDER, RÜDIGER**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 663 698 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

Procedimiento para la predicción del riesgo de progresión de tumores

La presente invención se refiere a un procedimiento para predecir la posibilidad de crecimiento invasor y/o el riesgo de progresar a un cáncer de grado alto de tumores en procedimientos de detección basados en células. En un aspecto, la invención se refiere a predecir el riesgo de progresión y/o la posibilidad de crecimiento invasor en tumores basándose en la codetección simultánea de la presencia de sobreexpresión de los productos génicos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} junto con la expresión de marcadores para la proliferación celular activa.

Antecedentes

Se han ofrecido programas preventivos para diversos cánceres desde mediados de los años cincuenta. Para determinados cánceres, existen incluso programas de cribado para el diagnóstico para la población general en diversos países desarrollados. Dichos programas de cribado para el diagnóstico son aplicables a entidades cancerosas y a los respectivos estadios precursores, tales como, por ejemplo, cáncer cervicouterino, cánceres del aparato urinario, de las vías respiratorias y demás.

En todos los casos de cribado para el diagnóstico del cáncer, el resultado de una prueba diagnóstica se categoriza de acuerdo con la gravedad de la lesión detectada. Se han establecido y se usan ampliamente sistemas de gradación para categorizar cánceres de diferentes orígenes. En general, para cualquier tipo de cáncer, se pueden encontrar tumores de grado bajo que sean benignos o bien sean mayoritariamente benignos con un determinado riesgo de progresión a una neoplasia maligna.

Generalmente, la detección de lesiones de grado bajo plantea problemas al médico que realiza el diagnóstico y al paciente. Un porcentaje de moderado a alto de lesiones de grado bajo tiene la tendencia a remitir espontáneamente sin la necesidad de ningún tratamiento adicional. Por otro lado, también hay un porcentaje más bajo de lesiones de grado bajo que progresarán a formas más graves y acaban como cáncer infiltrante. El dilema con las lesiones de grado bajo en la práctica es que es difícil predecir qué lesión particular es propensa a remitir y cuál progresa a cáncer infiltrante.

Se han efectuado varios intentos para predecir el riesgo de progresión y la posibilidad de crecimiento invasor de lesiones de grado bajo. Se han examinado especialmente los marcadores moleculares que pueden tener la posibilidad de predecir la progresión. Se ha comprobado especialmente el nivel de expresión de las proteínas de regulación del ciclo celular y se ha descubierto que es útil en determinadas circunstancias.

A pesar de todos los intentos realizados hasta el momento, hay una fuerte necesidad de obtener procedimientos que permitan predecir el riesgo de progresión de tumores y especialmente de lesiones cancerosas de grado bajo y lesiones precursoras de cánceres. Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para predecir el riesgo de progresión de tumores.

El inventor descubrió que se puede usar la detección de una combinación del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y de marcadores de la proliferación celular para la predicción del riesgo de progresión de tumores.

El documento EP 1 510 820 describe un procedimiento para diagnosticar afecciones médicamente pertinentes, tales como, por ejemplo, trastornos neoplásicos basados en un análisis bioquímico no basado en células de la presencia o ausencia y/o del nivel de moléculas marcadoras en muestras corporales solubilizadas. Sin embargo, el documento EP 1 510 820 no divulga ningún procedimiento de detección basado en células, en el que la sobreexpresión de al menos un producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular se determine en al menos una célula individual. En cambio, el procedimiento se aplica a muestras solubilizadas, tales como, por ejemplo, muestras de CBL, es decir, muestras que se han sometido a condiciones de lisis celular, de modo que se pierde cualquier información morfológica de la muestra.

Breve descripción de la invención

Un aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para predecir la posibilidad de crecimiento invasor y el riesgo de progresar a un cáncer de grado alto de tumores que comprende determinar en inmunohistoquímica o inmunocitoquímica la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular en al menos una célula individual.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Microfotografía de una pieza de biopsia del cuello uterino con doble tinción de manera inmunohistoquímica

usando anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína p16^{INK4a} humana y a la proteína Ki67 humana. Ki67 produjo una tinción roja específica, p16^{INK4a} una tinción marrón específica. El patrón de tinción es focal para p16^{INK4a}. No hay presentes células con doble tinción para ambos marcadores.

- 5 **Figura 2:** Microfotografía de una pieza de biopsia del cuello uterino con doble tinción de manera inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína p16^{INK4a} humana y a la proteína Ki67 humana. Ki67 produjo una tinción roja específica, p16^{INK4a} una tinción marrón específica. El patrón de tinción es difuso para p16^{INK4a}. Hay presentes muchas células con doble tinción para ambos marcadores.

10 Descripción detallada de la invención

Durante los experimentos que dan lugar a la presente invención, los inventores llegaron a la conclusión de que se puede usar la detección de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas en tumores y también en lesiones precursoras de cánceres incipientes o cánceres de grado bajo para la predicción de la posibilidad de crecimiento

15 invasor de cánceres. Especialmente la sobreexpresión de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas de manera concurrente con la expresión de la expresión de marcadores de la proliferación celular es una indicación de la progresión a formas invasoras del cáncer.

Adicionalmente, los inventores descubrieron que se pueden usar preparaciones de sondas que comprenden a) al menos una sonda específica para un producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas y b) al menos una sonda específica para un producto génico marcador de la proliferación celular para la predicción de la posibilidad de crecimiento invasor y/o para la predicción del riesgo de progresión en tumores y en lesiones precursoras de cánceres incipientes y cánceres de grado bajo.

Las denominaciones dadas a lo largo de este texto para los genes se pueden referir, en parte, a los genes o proteínas como se han descubierto en cualquier organismo. En el contexto de la presente invención, esta denominación se conferirá al respectivo homólogo de los marcadores mencionados en el organismo que se encuentra particularmente en cuestión para un procedimiento como se divulga en el presente documento. En determinados modos de realización de la presente invención, este organismo es un mamífero y en un modo de realización puede ser un ser humano. En dicho modo de realización de la presente invención, los marcadores mencionados serán los homólogos humanos de los respectivos denominados.

Un marcador útil de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier molécula transcrita a partir de un gen o cualquier molécula traducida a partir de dicho transcrito. De esta manera, "*producto génico*" como se usa en el contexto de la presente invención puede comprender polinucleótidos, tales como, por ejemplo, ADN o ARN, y polipéptidos, tales como proteínas, proteoglicanos, péptidos, etc.

Los "*inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas*" para su uso en la presente invención comprenden los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas p14^{ARF}, p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}, P21^{WAF1/CIP1} y p27^{KIP1}. Además de los inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, también se puede usar la proteína reguladora del ciclo celular p14^{ARF} codificada por un marco de lectura alternativo del gen p16^{INK4a} para un procedimiento como se divulga en el presente documento. Por conveniencia, dentro del contexto de la presente invención, la proteína reguladora del ciclo celular p14^{ARF}, que por su función no es un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas, se incluirá en la expresión "*inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas*".

"p16" o "inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}" como se usa en el presente documento se refiere al inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} (también denominado CDKN2 o MTS1), del que su gen está localizado en la región cromosómica 9p21. p16^{INK4a} se describió por primera vez en Serrano, M., *et al.*, Nature, 16 de dic. de 1993; 366(6456):704-7. Los términos "p16^{INK4a}" o "inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}" en todas sus formas gramaticales como se usa en el contexto de la presente invención se refieren a moléculas de ácido nucleico, así como de polipéptido. De esta manera, "p16" o "inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}" comprende, por ejemplo, ARN (ARNm, ARNnh, etc.), ADN (ADNc, ADN genómico, etc.), proteínas, polipéptidos, proteoglicanos, glucoproteínas y los respectivos fragmentos de estas moléculas.

El término "marcador de la proliferación (celular)" o "marcador para la proliferación celular" como se usa en el contexto de la presente invención comprenderá cualquier molécula marcadora conocida en la técnica que sea característica para el estado de proliferación de las células. El estado de proliferación puede ser, por ejemplo, un estado de células que proliferan activamente, de proliferación celular retrasada, de proliferación celular detenida, de células senescentes, de células terminalmente diferenciadas, de apoptosis, etc. En un modo de realización de la invención, el marcador de la proliferación celular es una molécula marcadora característica para la proliferación celular activa. En otro modo de realización de la invención, la molécula marcadora de la proliferación puede ser una molécula característica para células detenidas, terminalmente diferenciadas, senescentes o apoptóticas. Generalmente, a lo largo del texto, el término "*marcador de la proliferación (celular)*" o "marcador para la proliferación celular" en las diversas formas gramaticales se usa para denominar proteínas, así como marcadores de ácidos nucleicos. En caso de que el nombre de la proteína de un marcador tal como, por ejemplo, "proteína de replicación" se use en el presente documento, se debe entender que este uso es metonímico y pertenece tanto a la

proteína como a las moléculas marcadoras de ácido nucleico que codifican la proteína particular.

En determinados modos de realización, los marcadores para la proliferación para su uso en el contexto de la presente invención pueden comprender genes implicados en la replicación del ADN tal como, por ejemplo, proteínas del complejo de preiniciación o de la horquilla de replicación. Dichas moléculas pueden comprender, por ejemplo, helicasas, tales como helicasa eucariota o proteínas MCM (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7), proteína TP como se divulga en los documentos WO0050451 y WO0217947 (también denominada HELAD1, Pomfil2, Unc-53), cinasas o fosfatasa implicadas en el proceso de replicación, tales como, por ejemplo, CDC6, CDC7, proteína cinasa CDC7, Dbf4, CDC14, proteína fosfatasa CDC14, CDC45 y MCM10. Además, los marcadores de la proliferación pueden comprender proteínas implicadas en la horquilla de replicación procesiva, tales como, por ejemplo, topoisomerasas (por ejemplo, topoisomerasa 2 alfa), PCNA o ADN polimerasa delta, proteína de replicación A (PRA), factor de replicación C (FRC), FEN1.

En otros modos de realización, los marcadores de la proliferación pueden comprender moléculas necesarias para el mantenimiento de la proliferación celular, tales como Ki67, Ki-S5 o Ki-S2. En este modo de realización, las proteínas pueden estar presentes, por ejemplo, a lo largo de todo el ciclo celular. Son útiles para realizar un procedimiento de acuerdo con la presente invención siempre que sean características para la proliferación celular activa y no se expresen significativamente en estados de células detenidos, terminalmente diferenciados, apoptóticos o senescentes. Ki67, Ki-S2 y Ki-S5, como se usa en el presente documento, denominarán a las moléculas marcadoras de proteínas detectadas por los respectivos anticuerpos, así como a los ácidos nucleicos que codifican estos antígenos.

"*Tumores*" como se usa en el contexto de la presente invención se referirá a cualquier clase de tumor, tal como, por ejemplo, tumores benignos y malignos, carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas, carcinomas *in situ* o displasias. Los tumores pueden comprender tumores de cabeza y cuello, tumores de las vías respiratorias, tumores del tubo digestivo, tumores del aparato urinario, tumores del aparato reproductor, tumores del aparato endocrino, tumores del sistema nervioso central y periférico, tumores de la piel y sus faneras, tumores de partes blandas y huesos, tumores del sistema linfopoyético y hematopoyético, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer anogenital, etc. El término "cáncer" como se usa en el contexto de la presente solicitud se referirá a cánceres de cualquier clase y origen y a estadios precursores de los mismos, respectivamente. Por consiguiente, el término "tumor" comprenderá la materia objeto identificada por los términos "neoplasia", "cáncer", "precáncer", "carcinomas *in situ*" o "tumor". Además, el equivalente citológico de las afecciones histológicas identificadas como "displásicas" o como "displasias" está dentro del alcance del término "tumor" como se usa en el presente documento.

En determinados modos de realización de la presente invención, el término tumor se refiere a los estadios incipientes de tumores y comprenderá especialmente tumores de grados 1 (grado bajo) y 2 (grado intermedio) de acuerdo con la clasificación de la UICC (Unión Internacional contra el Cáncer). Especialmente, el grado 1, que comprende tumores de grado bajo, es de importancia para los procedimientos de la invención. Los estadios incipientes de tumores también se refieren a los grados de tumores que se correlacionan con el grado según la UICC mencionado, también en el caso de que el tumor particular se clasifique de acuerdo con un sistema de gradación diferente. Especialmente para el cáncer de mama, los términos "lesiones precursoras de cánceres incipientes", así como los "estadios incipientes de tumores", incluyen las puntuaciones 3, 4 y 5 (grado bajo) y las puntuaciones 6 y 7 (grado intermedio) del sistema de puntuaciones combinadas de Bloom-Richardson. Para el cáncer cervicouterino, los términos "lesiones precursoras de cánceres incipientes", así como los estadios incipientes de tumores, comprenden las categorías LSIL y HSIL del sistema de clasificación de Bethesda y NIC1, NIC2 y también NIC3 del sistema de clasificación de las NIC. Para los exámenes citológicos y la clasificación de acuerdo con el sistema de clasificación de Múnich, las lesiones clasificadas como Pap I, Pap II, Pap II W y Pap III D se considerarán "lesiones precursoras de cánceres incipientes", así como los estadios incipientes de tumores.

Los tumores a los que se pueden aplicar los procedimientos de la presente invención comprenden, por ejemplo, lesiones neoplásicas de las vías respiratorias, del aparato urinario, del tubo digestivo, del aparato anogenital, tumores asociados con la infección por PVH y demás. En un modo de realización, el PVH puede ser un subtipo de PVH de riesgo alto, tal como PVH16, PVH18, PVH31, PVH 33, PVH35, PVH 39, PVH 45, PVH 51, PVH 52, PVH56, PVH 58, PVH 59, PVH 66 y PVH 68. Los tumores pueden ser cánceres de las vías respiratorias, el aparato urinario, el aparato reproductor o cánceres anogenitales, cánceres asociados con el PVH y, particularmente, cáncer cervicouterino. En relación con este último, se han mencionado particularmente sus estadios precursores, por ejemplo, neoplasias intraepiteliales cervicouterinas (NIC 1 - 3), carcinomas *in situ* (CIS), etc. El término "estadios precursores" en todas sus formas gramaticales como se usa en el presente documento comprende todos los estadios precursores y precursores de cánceres o cualquier otra neoplasia maligna. Con respecto a los estadios preliminares o precursores de cánceres cervicouterinos como se usa en el presente documento, se pueden referir a los estadios de las neoplasias intraepiteliales cervicouterinas identificadas mediante sistemas de clasificación apropiados, tales como, por ejemplo, la clasificación de las NIC (NIC I - NIC III), la clasificación de PAP (PAP I - PAP V) o la clasificación de Bethesda (NILM, LSIL, HSIL).

Con respecto a los cánceres de las vías respiratorias, los cánceres pueden comprender cualquier afección maligna de las vías respiratorias, tal como, por ejemplo, cáncer de pulmón, alveolos, bronquiolos, árbol bronquial y bronquio,

cavidad nasofaríngea, cavidad bucal, faringe, fosas nasales y senos paranasales. Cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma epidermoide de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de pulmón de células grandes, carcinoma adenoescamoso de pulmón, tumor carcinoide pulmonar, tumor de la glándula bronquial o mesotelioma (maligno). Se pueden encontrar los aspectos generales de los tumores de las vías respiratorias en Colby TV, *et al.*: Tumors of the Lower Respiratory Tract, Atlas of Tumor Pathology, Third Series, Fascicle 13, AFIP: Washington 1995".

Los tumores del aparato urinario pueden comprender cáncer de vejiga, cáncer de riñón, pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer de uretra, etc. Los tumores del aparato reproductor pueden comprender cáncer y estadios precursores del mismo de ovario, útero, testículos, próstata, epidídimo, etc.

En un modo de realización, los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar al cáncer de mama. El cáncer de mama puede comprender cualquier clase de carcinoma de la mama que comprenda, por ejemplo, cualquier clase de carcinoma ductal (por ejemplo, carcinoma intraductal *in situ*, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma ductal medular, mucinoso (coloide), papilar, escirroso o tubular), cualquier clase de carcinoma lobulillar, tal como carcinoma lobulillar *in situ*, carcinoma lobulillar infiltrante con componente *in situ* predominante, carcinoma lobulillar infiltrante, cualquier clase de carcinoma en el pezón (por ejemplo, enfermedad de Paget con carcinoma ductal [infiltrante]) y también cánceres de mama atípicos, tales como tumores filoides y angiosarcoma.

En determinados modos de realización, los tumores a los que se puede aplicar el procedimiento de acuerdo con la presente invención comprenden cualquier tumor caracterizado por la sobreexpresión de productos génicos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, tales como, por ejemplo, p16^{INK4a}; o p14^{ARF}.

En determinados modos de realización adicionales, los procedimientos de la invención son aplicables a tumores asociados con el PVH. En este respecto, la invención es aplicable a tumores asociados con el PVH y especialmente a los tipos de PVH de riesgo alto y los tipos de PVH de las mucosas. El PVH de riesgo alto puede comprender subtipos de PVH tales como, por ejemplo, los PVH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68. Los marcadores para la infección por PVH pueden comprender, por ejemplo, los productos de expresión de PVH de los genes L1, L2, E2, E4, E5, E6 o E7 del PVH.

La expresión "*muestra de tejidos o células*" comprende cualquier muestra de tejidos o células de cualquier clase y naturaleza. Los ejemplos de dichas muestras de tejidos o células son secreciones, hisopados, lavados, líquidos corporales, semen, muestras de células y tejidos, sangre, frotis, esputo, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, bilis, secreciones digestivas, linfa, médula ósea, aspirados y biopsias de órganos, tales como biopsias con aguja o en sacabocados, y aspirados con aguja (fina). Las muestras pueden comprender, en determinados modos de realización, frotis cervicouterinos, líquido aspirado del pezón, lavados bronquioalveolares, etc. En particular, los frotis, los hisopados y las biopsias están indicados cuando se trata de la detección de cánceres anogenitales, por ejemplo, cánceres cervicouterinos. De acuerdo con la presente invención, las muestras de células o tejidos, según sea el caso, pueden comprender células del aparato anogenital, de las vías respiratorias o de la piel y sus faneras. En determinados modos de realización, las células pueden ser células del cuello uterino, vagina, vulva, pene, ano, recto, mama, árbol bronquial, pulmón, peritoneo, cavidad peritoneal, cavidad nasofaríngea, cavidad bucal o la piel. En determinados modos de realización de la presente invención, las muestras pueden comprender células infectadas por papilomavirus.

El término "*biopsias*" como se usa a lo largo de este texto comprende toda clase de biopsias conocidas por los expertos en la técnica. De esta manera, como se usa en el contexto de la presente invención, las biopsias pueden comprender, por ejemplo, muestras de resección de tumores, muestras de tejidos preparadas mediante medios endoscópicos o biopsias de órganos en sacabocados o con aguja. Las biopsias comprenden piezas obtenidas mediante varios procedimientos diferentes, tales como biopsias con bisturí, biopsias LEEP (procedimiento de escisión electroquirúrgica con asa), etc.

Muestras de tejidos o células como se usa en el contexto de la presente invención pueden comprender muestras de células o tejidos fijados o conservados. Las muestras de tejidos pueden comprender muestras estándar usadas para histología, tal como, por ejemplo, tejido congelado, tejido fijado, bloques de tejidos incluidos en parafina que se pueden fijar mediante un procedimiento apropiado, tal como, por ejemplo, fijación en formol o cualquier otro procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Las muestras de células o tejidos se pueden conservar, por ejemplo, en un medio de obtención, almacenamiento o transporte de muestras estándar, conocido por los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, medios de conservación disponibles comercialmente (solución de formol, "PreservCyt" o "CytoLyt" de Cytec, "Universal Collection Medium" de Digene, "Cytorich" de Tripath Imaging, etc.). En un modo de realización de la invención, las muestras de células o tejidos proporcionadas en medios de obtención de muestras estándar son muestras de citología en base líquida (muestras de CBL) que se preparan de acuerdo con o de manera análoga a los procedimientos empleados para procedimientos citológicos de CBL conocidos por los expertos en la técnica. Los medios de conservación de células adecuados pueden contener una mezcla de uno o más seleccionados de un grupo que comprende alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, iones de metal o sublimatos, éteres, etc. para la conservación de componentes celulares. Los alcoholes incluyen metanol, etanol, (n- o i-) propanol, (n-, i- o t-) butanol o alcoholes superiores ramificados o no ramificados. Los aldehídos incluyen

formaldehído, acetaldehído, glutaraldehído, etc. Se pueden usar cetonas, tales como acetona. Los ácidos para su uso en medios de muestras estándar incluyen ácidos orgánicos (ácido acético, ácido tricloroacético, ácido salicílico, ácido pícrico) o ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido crómico. Las soluciones de muestras estándar pueden comprender metales, tales como plata, cobre, cromo, mercurio, osmio, uranio. Las soluciones de sales, tales como acetato de uranilo, bicromato de potasio, sulfato de amonio, etc. pueden ser componentes de los medios conservantes.

Se pueden usar células conservadas en medios adecuados (alcoholes, etc.) o muestras de tejidos fijadas como muestras en bruto en los procedimientos de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización, la muestra de tejidos o células puede comprender, por ejemplo, una muestra de esputo, hisopado cervicouterino, líquido aspirado del pezón, hisopado bucal, hisopado uretral o similar que se haya transferido a un medio conservante que contenga alcohol.

En determinados modos de realización especiales de la presente invención, la muestra se puede preparar como una monocapa o preparación de capa fina de una pieza citológica. Los respectivos procedimientos para la preparación de una monocapa o preparación de capa fina en citología son conocidos por los expertos en la técnica. En un modo de realización, la preparación puede comprender, por ejemplo, la tecnología ThinPrep. Otros procedimientos comprenden frotis convencionales, o procedimientos que emplean suspensiones de células para la preparación de las piezas citológicas.

La preparación de una muestra puede comprender, por ejemplo, obtener una muestra de un tejido, de un líquido corporal, de células de un paciente. De acuerdo con la presente invención, la preparación de la muestra también puede comprender varias etapas de preparaciones adicionales de la muestra, tales como preparación de disecciones, preparación de suspensiones celulares, diseminación o aplicación de las células que se van a examinar en portaobjetos, preparación de matrices de tejidos, aislamiento de polipéptidos o ácidos nucleicos, preparación de péptidos o ácidos nucleicos fijados en fase sólida o preparación de microesferas, membranas o portaobjetos a los que se acoplan de manera covalente o no covalente las moléculas que se van a determinar.

En determinados modos de realización de la presente invención, el procedimiento se puede realizar de una manera automatizada. La automatización del procedimiento se puede lograr mediante tinción y análisis automatizados de piezas histológicas o citológicas sobre una superficie sólida mediante medios microscópicos. En otro modo de realización, la automatización puede comprender un análisis por citometría de flujo de la tinción de células en solución.

El término "*sobreexpresión*" en todas sus formas gramaticales como se usa en la presente invención se referirá a una expresión de un producto génico particular a un nivel que es elevado en comparación con el nivel de expresión en células normales no afectadas. El término "*expresión*" en todas sus formas gramaticales como se usa en la presente invención se referirá a una expresión de un producto génico a un nivel que es detectable y no necesita alterarse en comparación con el nivel de expresión en células normales no afectadas.

El procedimiento para la detección de la sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y de la expresión de los productos génicos marcadores de la proliferación celular de acuerdo con la presente invención es cualquier procedimiento, que pueda (pero no necesite) ser adecuado, por ejemplo, para detectar incluso cantidades muy pequeñas de moléculas biológicas específicas en muestras biológicas. La reacción de detección de acuerdo con la presente invención es una detección en el nivel de ácidos nucleicos o bien en el nivel de polipéptidos.

Se dice que una molécula marcadora es detectable como se usa en el contexto de la presente invención, siempre que el marcador se pueda detectar en el transcurso de un procedimiento de detección adecuado tal como, por ejemplo, hibridación *in situ*, tinción inmunquímica, ensayo de captura de híbridos, etc. El nivel de expresión de una molécula marcadora se puede volver detectable usando reacciones indicadoras adecuadas, tales como, por ejemplo, una tinción inmunquímica basada en fluorescencia o cromogénica o un procedimiento de hibridación *in situ* para el análisis automatizado o microscópico. Se pueden aplicar procedimientos adecuados para potenciar la señal indicadora conocidos por los expertos en la técnica en el transcurso de un procedimiento de acuerdo con la presente invención. De esta manera, se dice que el marcador es detectable en el caso en el que la tinción reemplaza la respectiva tinción de fondo obtenida de manera inherente en el procedimiento de tinción inmunquímica para producir resultados de tinción significativos.

Las moléculas marcadoras se pueden detectar usando reactivos que reconozcan específicamente estas moléculas. La reacción de detección para el producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y los productos génicos marcadores de la proliferación puede comprender una o más reacciones con agentes de detección que reconozcan las moléculas marcadoras iniciales o bien que reconozcan las moléculas anteriores usadas para reconocer otras moléculas.

En determinados modos de realización de la presente invención, se pueden usar dos o más sondas para la detección de una molécula marcadora individual. Por ejemplo, se pueden usar dos o más diferentes agentes de

unión (por ejemplo, anticuerpos) o sondas de oligonucleótidos dirigidas frente a una molécula marcadora individual (según sea el caso, frente a diferentes epítomos o diferentes secuencias) en el transcurso del procedimiento como se divulga en el presente documento.

La detección de los diferentes productos génicos se puede realizar en un recipiente de reacción o medio de contención o en diferentes medios de contención simultánea o posteriormente en el tiempo. De esta manera, los diferentes productos génicos se pueden detectar simultáneamente en una célula que coexpresa ambos productos. De otro modo, las células que coexpresan los productos génicos se pueden usar para la reacción de detección separada (separadas en el espacio o en el tiempo) para detectar cada marcador individual en las células. En otro modo de realización, puede haber células que expresen uno u otro marcador. La detección de las moléculas marcadoras en las diferentes células también se puede realizar simultáneamente o por separado en el tiempo y/o espacio.

La reacción de detección puede comprender adicionalmente una reacción indicadora que indique la presencia o ausencia y/o el nivel de los productos génicos de moléculas marcadoras. Por ejemplo, la reacción indicadora puede ser una reacción que produce un compuesto coloreado, una reacción de bioluminiscencia, una reacción de fluorescencia, generalmente una reacción que emite radiación, etc.

En determinados modos de realización, se pueden reconocer diferentes moléculas marcadoras mediante agentes que producen diferentes señales indicadoras, de modo que se puedan distinguir las señales que se refieren a las moléculas marcadoras. En un modo de realización preferente de la invención, la detección de la expresión de uno de los dos o más productos génicos de INK4a y productos génicos marcadores de la proliferación se lleva a cabo simultáneamente. En este caso, la reacción indicadora, por ejemplo, puede emplear diferentes marcadores fluorescentes o cromogénicos para las diferentes moléculas detectadas.

Sin embargo, dentro del contexto de la presente invención, no se debe responder necesariamente si se expresa en las células el uno o el otro marcador de la proliferación o el producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}. En determinados modos de realización, la cuestión es si se expresa cualquier marcador de la proliferación y el producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}. En el transcurso de los experimentos, se puede elegir dicho procedimiento que dé la misma señal de fluorescencia o cromogénica como indicación de la presencia de un marcador de la proliferación. Este procedimiento es adecuado para mejorar la sensibilidad de la detección de las características para la proliferación celular (diferentes marcadores característicos para la proliferación celular activa). Según sea el caso, se puede aplicar el procedimiento para producir una señal detectable para dos, tres, cuatro o incluso más moléculas marcadoras que sean características para la proliferación celular. De manera análoga, lo mismo puede ser cierto en determinadas circunstancias para el producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a}. Se debe entender que, según sea el caso, pueden ser deseables diferentes señales de tinción para diferentes moléculas marcadoras de la proliferación. Los procedimientos se pueden aplicar a las necesidades del respectivo experimento.

En determinados modos de realización de la presente invención, se puede detectar una combinación de uno o más (por ejemplo, dos diferentes) productos génicos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas con una combinación de uno o más, por ejemplo, un conjunto de dos, un conjunto de tres, un conjunto de cuatro, un conjunto de cinco o un conjunto de incluso más marcadores de la proliferación celular. Según sea el caso, la detección de las moléculas marcadoras para la proliferación celular puede producir solo una señal indicadora. En otros casos, cada marcador individual para la proliferación celular puede producir una señal indicadora específica o grupos de moléculas marcadoras pueden producir señales indicadoras específicas.

Las señales para la indicación de la presencia de inmunorreactividad pueden ser señales cromogénicas producidas por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos pueden comprender, por ejemplo, la generación de precipitados coloreados en el sitio del antígeno usando peroxidasa de rábano picante para la conversión enzimática y DAB, AEC, HistoMark(R) ORANGE, HistoMark(R) BLACK, etc. como cromógeno, o usando la enzima fosfatasa alcalina para la conversión de un cromógeno y, por ejemplo, BCIP-NBT, Fast Red, New Fuchsin, etc. como cromógeno. De manera alternativa o incluso en combinación, se pueden usar señales fluorescentes. Las señales indicadoras adecuadas comprenden marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína, rodamina, etc.

Los formatos aplicables para la reacción de detección de acuerdo con la presente invención pueden ser técnicas de transferencia, tales como transferencia Western, transferencia de Southern, transferencia Northern, procedimientos inmunocitoquímicos o inmunohistoquímicos. Las técnicas de transferencia son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden realizar, por ejemplo, como electrotransferencias, transferencias semisecas, transferencias en vacío o transferencia por puntos. Los procedimientos de tinción inmunocitoquímica/histoquímica son conocidos por los expertos en la técnica y pueden comprender la detección de polipéptidos mediada por agentes de unión, así como técnicas de hibridación *in situ*. Ambas técnicas diferentes se pueden aplicar incluso simultáneamente. En determinado modo de realización, se puede usar la captura de híbridos de ácidos nucleicos para la detección. La reacción de amplificación también puede ser aplicable para la detección, por ejemplo, de moléculas de ácido nucleico.

En un modo de realización de la invención, la detección del nivel de los productos génicos marcadores de la proliferación e inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} se lleva a cabo mediante la detección de los respectivos ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNm) o fragmentos de los mismos presentes en la muestra. Los medios para la detección de moléculas de ácido nucleico son conocidos por los expertos en la técnica. El procedimiento para la detección de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una reacción de unión de la molécula que se va a detectar a sondas de ácidos nucleicos complementarias, proteínas con especificidad de unión por los ácidos nucleicos o cualquier otra entidad que específicamente reconozca y se una a dichos ácidos nucleicos. En un modo de realización, se puede usar la hibridación *in situ* de sondas de oligonucleótidos a ácidos nucleicos en una muestra para la detección de los marcadores o productos de expresión.

Las sondas como se usa en el contexto de la presente invención pueden ser cualquier agente que se una específicamente a una molécula e incluirán sondas de ácidos nucleicos, sondas de péptidos y de proteínas y otras sondas. En el caso de los ácidos nucleicos, una sonda puede ser un oligonucleótido que hibrida con una secuencia particular. En un modo de realización, la sonda puede ser, por ejemplo, un cebador. En el caso de la detección de polipéptidos o proteínas, la sonda como se usa en el presente documento puede ser, por ejemplo, un agente de unión, tal como un anticuerpo. En determinados modos de realización de la presente invención, las sondas se pueden marcar de manera detectable. El marcador se puede seleccionar del grupo que comprende un radioisótopo, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un compuesto fluorescente, un quelato de metal o una enzima. Se pueden aplicar sondas en cualquier procedimiento de detección conocido en la técnica, por ejemplo, en el transcurso de un procedimiento de hibridación *in situ*, en el transcurso de ensayos de captura de híbridos, en el transcurso de una reacción de tinción inmunoquímica, en el transcurso de técnicas de transferencia, etc.

Este procedimiento se puede realizar tanto *in vitro* como directamente *in situ*, por ejemplo, en el transcurso de una reacción de tinción de detección. Otra manera de detectar los ARNm marcadores en una muestra realizada en el procedimiento de acuerdo con la presente invención es una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, que se puede llevar a cabo de una manera cuantitativa, tal como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa. En un modo de realización preferente de la presente invención, se puede usar la RT-PCR en tiempo real para cuantificar el nivel de ARNm marcadores en muestras de displasias o tumores (muestras de células o tejidos).

En otro modo de realización preferente de la invención, la detección del nivel de los productos génicos marcadores de la proliferación e inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} se lleva a cabo determinando el nivel de expresión de una proteína o fragmentos de la misma. La determinación del producto génico marcador en el nivel de proteínas se puede llevar a cabo, por ejemplo, en una reacción que comprenda un agente de unión específico para la detección del polipéptido marcador particular.

Los agentes de unión se pueden usar en muchas técnicas de detección diferentes, por ejemplo, en transferencia Western, ELISA o inmunoprecipitación. Generalmente, la detección de polipéptidos basada en agentes de unión se puede llevar a cabo tanto *in vitro* como directamente *in situ*, por ejemplo, en el transcurso de una reacción de tinción inmunoquímica. Según sea el caso, se puede aplicar la reacción de tinción inmunoquímica en procedimientos de tinción citológica e histológica. Se puede usar cualquier otro procedimiento para determinar la cantidad de polipéptidos particulares en muestras biológicas de acuerdo con la presente invención.

Los procedimientos de tinción inmunocitoquímica (que comprenden, entre otras, aplicaciones en histología y citología) y/u obtención de imágenes para su uso en el contexto de la presente invención pueden comprender, por ejemplo, la tinción de preparaciones citológicas o histológicas con colorantes cromogénicos o fluorescentes. La tinción puede comprender, por ejemplo, la unión de las moléculas que se van a detectar mediante un primer agente de unión, que por sí mismo se detecta mediante un agente de unión secundario, que puede estar marcado. El primer agente de unión puede ser, en determinados modos de realización, un ácido nucleico o un agente de unión a proteína (por ejemplo, un anticuerpo) y el agente de unión secundario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo secundario que reconozca el primer agente de unión.

Se puede aplicar cualquier procedimiento conocido en la técnica para realizar la tinción citoquímica o histoquímica en el transcurso de un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, se pueden usar agentes de unión aislados o en combinación. Por medio de su combinación, es posible lograr un grado de sensibilidad más alto. El término anticuerpo, preferentemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales mezclados con diferentes especificidades epitópicas, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Se pueden usar preparaciones de anticuerpos policlonales de manera alternativa de acuerdo con la presente invención.

Los agentes de unión como se usa en el contexto de la presente invención para la detección del nivel de polipéptidos inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, tales como los polipéptidos p16^{INK4a} o p14^{ARF}, y polipéptidos marcadores de la proliferación, tales como, por ejemplo, los polipéptidos MCM5, MCM2, Ki67, Ki-S5, PCNA o Ki-S2, pueden comprender anticuerpos. Se dice que un anticuerpo o agente de unión a antígeno reacciona específicamente si reacciona a un nivel detectable con una proteína divulgada en el presente documento, y no reacciona significativamente con otras proteínas. El término "anticuerpo" en todas sus formas gramaticales como se

usa en el contexto de la presente invención comprende cualquier clase de anticuerpo, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos de unión a antígeno, fragmentos de anticuerpos, fragmentos fab', anticuerpos híbridos bifuncionales, anticuerpos monocatenarios, peptidomiméticos de anticuerpos humanizados que contienen epítopos de unión a antígeno mínimos, anticulinas (anti-caline™), etc.

Los anticuerpos monoclonales se producen frente a fragmentos que contienen antígeno del polipéptido de la invención usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica; véase, por ejemplo, Hariow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En una de dichas técnicas, se inyecta inicialmente un inmunógeno que comprende el polipéptido antigénico o una parte sintética del mismo en cualquiera de una amplia diversidad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras). En esta etapa, los polipéptidos de la presente invención pueden servir como inmunógeno sin modificación. De manera alternativa, particularmente para polipéptidos relativamente cortos, se puede inducir una respuesta inmunitaria superior si el polipéptido se une a una proteína transportadora, tal como seroalbúmina bovina o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferentemente de acuerdo con una pauta predeterminada que incorpore una o más inmunizaciones de refuerzo, y periódicamente se extrae sangre de los animales. Entonces, los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido se pueden purificar a partir de dichos antisueros, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

El producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y los productos génicos marcadores de la proliferación se pueden detectar simultáneamente de acuerdo con la presente invención. En este contexto, simultáneamente de acuerdo con la presente invención significa literalmente en el mismo instante o bien dentro del mismo procedimiento de prueba, con lo que las etapas de detección individuales son temporalmente consecutivas.

El procedimiento de detección de acuerdo con la presente invención puede comprender además un procedimiento de tinción citoquímica que produzca una tinción cromogénica o fluorescente de células o compartimentos celulares. Dichos procedimientos de tinción son conocidos por los expertos en la técnica y, por ejemplo, pueden comprender, por ejemplo, tinción de estructuras acidófilas o basófilas, de regiones subcelulares (por ejemplo, el núcleo, las mitocondrias, el aparato de Golgi, el citoplasma, etc.), de moléculas específicas (de cromosomas, de lípidos, de glucoproteínas, de polisacáridos, etc.) en las piezas citológicas. Se pueden emplear colorantes de fluorescencia, tales como DAPI, mepacrina, cromomicina, etc. Además, se pueden aplicar colorantes cromogénicos, tales como azán, naranja de acridina, hematoxilina, eosina, Sudán rojo, tinciones de tiazina (azul de toluidina, tionina). En otros modos de realización, se pueden usar procedimientos de tinción tales como tinción de Pap, tinción de Giemsa, tinción de hematoxilina-eosina, tinción de van-Gieson, tinción de Schiff (usando el reactivo de Schiff), procedimientos de tinción que emplean precipitación de metales (tales como, por ejemplo, de plata en procedimientos de tinción que emplean nitrato de plata) o tinciones insolubles tales como, por ejemplo, de azul de Turnbull (u otros cianuros de metal insolubles), etc., en el transcurso de un procedimiento como se divulga en el presente documento. Se debe entender que los colorantes y los procedimientos de tinción mencionados son ejemplos de los procedimientos aplicables y que se puede aplicar cualquier otro procedimiento conocido en la técnica a un procedimiento como se divulga en el presente documento.

Los procedimientos de tinción pueden producir tinciones cromogénicas para la inspección microscópica óptica o tinciones fluorescentes para la inspección bajo condiciones microscópicas de fluorescencia. En otro modo de realización de la presente invención, se pueden usar procedimientos de emisión de radiación, procedimientos que emplean sustancias que alteran la transmisión de radiación u otros medios de contraste para obtener imágenes de las condiciones citológicas en una muestra (por ejemplo, la generación de impresión óptica por medios tales como generación de imágenes (micro)radiográficas o (micro)autorradiográficas) para un procedimiento de acuerdo con la presente invención.

Se pueden usar todos los procedimientos de tinción y obtención de imágenes para el análisis, no solo en procedimientos microscópicos, sino también en procedimientos de análisis automatizados, tales como citometría de flujo, análisis microscópico automatizado (informatizado o asistido por ordenador) o cualquier otro procedimiento para el análisis de piezas citológicas teñidas.

Se puede realizar el análisis de los resultados de tinción u obtención de imágenes de los diferentes procedimientos en una etapa de análisis individual o en diferentes etapas posteriores. Por ejemplo, se puede realizar la inspección microscópica óptica de una pieza antes o después de la inspección microscópica de fluorescencia de la pieza. En microscopía de fluorescencia, el análisis de diferentes tinciones con diferentes longitudes de onda de excitación pueden ser análisis simultáneos o posteriores. Se pueden emplear otros procedimientos de obtención de imágenes simultánea o posteriormente a los procedimientos mencionados.

Puede haber diversas circunstancias, en las que las combinaciones de diferentes procedimientos de tinción sean adecuadas. Por ejemplo, en los casos en los que no se pueden lograr resultados de tinción citológica satisfactorios mediante tinción inmunoquímica, puede ser adecuada la aplicación adicional de técnicas de tinción citológica generales.

El análisis de los resultados de tinción de acuerdo con la presente invención en determinados modos de realización de la invención comprende la detección de determinados patrones de tinción en procedimientos histológicos. Generalmente, los patrones de tinción se pueden clasificar de diversas maneras. Cualquier clasificación adecuada de los patrones de tinción en histología será aplicable para el propósito de la presente invención. Especialmente, la detección del patrón de tinción difuso es de pertinencia para la invención. Un "*patrón de tinción difuso*" se refiere a una tinción histológica de un epitelio donde se detecta la tinción inmunoquímica para un producto génico particular como una tinción continua de células de las capas de células basales y parabasales del epitelio cervicouterino escamoso, con o sin tinción de células de las capas de células superficiales. En determinados modos de realización, la detección del patrón de tinción difuso para el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} puede ser la base para la predicción del riesgo de progresión o de la posibilidad de crecimiento invasor de tumores. Se ha de discriminar el patrón de tinción difuso de los patrones de tinción focales, donde solo se observa la tinción de células aisladas o agrupaciones de células pequeñas; es decir, una tinción no continua, particularmente no de las células basales ni parabasales.

La presente invención proporciona procedimientos para predecir la posibilidad de crecimiento invasor y el riesgo de progresar a un cáncer de grado alto de tumores que comprenden determinar en un procedimiento de detección basado en células realizado basándose en la detección de la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular en al menos una célula individual. La invención resuelve el problema presente en la técnica de que las herramientas bien adecuadas para el pronóstico de las características del crecimiento y del riesgo de progresión de tumores no estaban suficientemente disponibles. La presente invención pone ahora al experto en la posición de predecir el pronóstico y la posibilidad de crecimiento invasor. Por consiguiente, los procedimientos y las preparaciones de la presente invención pueden formar la base para la mejora en la atención del paciente y en la adaptación de un tratamiento adecuado para los pacientes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan solo para propósitos de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención divulgada en el presente documento.

Ejemplo 1: Predicción del riesgo de progresión de piezas histológicas obtenidas del cuello uterino clasificadas como NIC 1 mediante la detección de la proteína p16^{INK4a} y la proteína Ki67

Se tiñeron de manera inmunohistoquímica muestras histológicas de archivo (secciones generadas a partir de biopsias en sacabocados incluidas en parafina, fijadas en formol tamponado neutro) del cuello uterino usando anticuerpos específicos para p16^{INK4a} y Ki-67. En total, se han teñido 10 piezas. Se han elegido piezas con datos de seguimiento disponibles. Para 6 piezas, los exámenes de seguimiento revelaron una remisión de la NIC 1. Para 4 piezas, los exámenes de seguimiento revelaron la progresión de las lesiones NIC1 a lesiones displásicas de grado alto. Para las 10 piezas, también estuvieron disponibles datos de PVH o se generaron durante los experimentos realizados.

Todas las piezas se trataron como sigue.

Los bloques de tejidos se seccionaron en cortes de 4 µm de espesor. Antes de la desparafinización, los portaobjetos se han dispuesto en un horno de secado a una temperatura de 60 °C durante un periodo de tiempo de 30 minutos para fundir la parafina. Entonces, los portaobjetos con tejidos se han desparafinado para eliminar el medio de inclusión y se han rehidratado antes de que se realizara el procedimiento de tinción. Posteriormente, se realizó la recuperación de epítomos durante 10 minutos a 98 °C usando Tris 10 mM como solución de recuperación de epítomos. La tinción de los portaobjetos se ha realizado con una mezcla de anticuerpos primarios, es decir, anti-p16^{INK4a} humana de ratón monoclonal y anti-Ki67 humana de conejo monoclonal. Para la detección, se han usado reactivos secundarios basados en un soporte polimérico acoplado a los respectivos anticuerpos secundarios y a fosfatasa alcalina (para el anticuerpo secundario anti-conejo) y a peroxidasa de rábano picante (para el anticuerpo secundario anti-ratón). La tinción se realizó en un instrumento Labvision Autostainer usando el siguiente programa:

- 200 µl de reactivo de bloqueo de peroxidasa - 5 minutos;
- 200 µl de solución de anticuerpos primarios - 30 minutos;
- 200 µl de reactivo de visualización con HRP - 15 minutos;
- 200 µl de reactivo de visualización con AP - 15 minutos;
- 200 µl de solución sustrato-cromógeno (DAB) - 10 minutos;
- 200 µl sustrato-Fast Red (Fast Red) - 15 minutos;

Entre y después de las etapas individuales, se realizaron etapas de aclarado apropiadas. Después de la tinción, se realizó la contratinción con hematoxilina y se montaron permanentemente los portaobjetos.

Las microfotografías de los portaobjetos se dan en las figuras 1 a 2.

La inspección microscópica de los portaobjetos reveló que las lesiones NIC 1 que habían demostrado remitir espontáneamente no mostraban células con doble tinción para p16^{INK4a} y Ki67 (cf. la figura 1). Adicionalmente, estas lesiones mostraron un patrón de tinción focal o esporádico para p16^{INK4a} y ningún patrón de tinción difuso (cf. también la figura 1).

5 Una correlación entre los resultados para PVH de riesgo alto y la tinción para p16 en inmunohistoquímica y la doble tinción para p16^{INK4a}/Ki67 en inmunohistoquímica para NIC que mostró remisión espontánea se da en las siguientes tablas:

10 **Tabla 1:** Correlación de los resultados de tinción para p16^{INK4a} con el estado de PVH ra para lesiones NIC1 que habían demostrado remitir espontáneamente.

	p16 (+)	p16 (-)	Σ
PVH ra +	1	4	5
PVH ra -	-	1	1
Σ	1	5	6

15 **Tabla 2:** Correlación de los resultados de doble tinción para p16/Ki67 con el estado de PVH ra para lesiones NIC1 que habían demostrado remitir espontáneamente.

	p16/Ki67 (+)	p16/Ki67 (-)	Σ
PVH ra +	-	5	5
PVH ra -	-	1	1
Σ	-	6	6

p16^{INK4a} se considera positivo (+), para el propósito de las tablas anteriores, una vez que haya una inmunorreactividad de p16^{INK4a} positiva, independientemente del patrón de tinción observado. La doble tinción para p16^{INK4a} y Ki67 se considera positiva (+) en caso de que haya al menos una célula individual observada en la pieza que sea positiva para ambos marcadores y, por consiguiente, tenga doble tinción.

20 En cambio, las cuatro lesiones que habían demostrado progresar a lesiones de grado alto muestran doble tinción para p16^{INK4a} y Ki67 en al menos una célula individual en la pieza. Además, dichas piezas mostraron un fuerte patrón de tinción difuso para p16^{INK4a} únicamente (cf. la figura 2).

Una correlación entre los resultados para PVH de riesgo alto y tinción para p16^{INK4a} en inmunohistoquímica y doble tinción para p16^{INK4a}/Ki67 en inmunohistoquímica para NIC con posibilidad de progresión se da en las siguientes tablas:

25 **Tabla 3:** Correlación de los resultados de tinción para p16^{INK4a} con el estado de PVH ra para lesiones NIC1 que habían demostrado progresar a lesiones de grado alto.

	p16 (+)	p16 (-)	Σ
PVH ra +	4	-	4
PVH ra -	-	-	-
Σ	4	-	4

30

35

Tabla 4: Correlación de los resultados de doble tinción para p16/Ki67 con el estado de PVH ra para lesiones NIC1 que habían demostrado progresar a lesiones de grado alto.

	p16/Ki67 (+)	p16/Ki67 (-)	Σ
PVH ra +	4	-	4
PVH ra -	-	-	-
Σ	4	-	4

De nuevo, p16^{INK4a} se considera positivo (+), para el propósito de las tablas anteriores, una vez que haya una inmunorreactividad de p16^{INK4a} positiva, independientemente del patrón de tinción observado. La doble tinción para p16^{INK4a} y Ki67 se considera positiva (+) en caso de que haya al menos una célula individual observada en la pieza que sea positiva para ambos marcadores y, por consiguiente, tenga doble tinción.

Se puede deducir que, basándose en el patrón de tinción para p16^{INK4a}, se ha facilitado la predicción del riesgo de progresión de las lesiones NIC 1. Sin embargo, se debe advertir que la interpretación del patrón de tinción de la preparación histológica deja espacio para su interpretación subjetiva y, por lo tanto, es de alguna manera propensa a errores. Como una alternativa que sea menos propensa a la interpretación subjetiva, se proporciona el procedimiento de doble tinción. También, en este caso, basándose en la presencia de células con doble tinción para p16^{INK4a} y Ki67, ha sido posible predecir las lesiones NIC 1 sometidas a prueba que tuvieron la posibilidad de progresar a lesiones de grado alto. Para la prueba del PVH ra, los resultados muestran que 9 de las 10 piezas sometidas a prueba eran positivas para PVH ra. De modo que 5 de las 6 piezas que remitieron espontáneamente mostraron positividad para PVH ra.

El experimento muestra que fue posible la determinación del riesgo de progresión de las lesiones NIC1 basándose en el patrón de tinción para p16^{INK4a} (el patrón de tinción difuso es indicativo de un riesgo de progresión a lesiones de grado alto), basándose en la doble tinción de células para p16^{INK4a} y Ki67 o bien en una combinación de PVH ra con positividad para p16^{INK4a}. Para la doble tinción, también se da la predicción del riesgo de progresión cuando se combina la prueba de doble tinción con las pruebas del PVH ra.

Ejemplo 2: Predicción del riesgo de progresión en biopsias de mama mediante la detección de la proteína p16^{INK4a} y diferentes proteínas marcadoras de la proliferación celular

En total, se usaron 15 piezas de biopsia de archivo de tumores de la mama (piezas de carcinoma ductal *in situ* y carcinoma lobulillar *in situ*) para el presente experimento. 10 de las piezas sometidas a prueba fueron de tumores menos invasores, 5 procedieron de tipos de tumores más invasores. Se demostraron el riesgo de progresión y la capacidad invasora de los tumores mediante datos de seguimiento en casos individuales. Para cada muestra, se sometieron cinco secciones a diferentes experimentos de doble tinción. En cada experimento, se combinó la tinción para p16^{INK4a} con uno de los siguientes marcadores de la proliferación celular: Ki67, MCM2, KiS2, MCM5, topoisomerasa 2 alfa.

Se realizó la preparación de las piezas y la tinción como se describe anteriormente para el ejemplo 1.

También, en este experimento, la inspección microscópica reveló que la doble tinción de las células individuales solo se detectó en las piezas que tenían características más invasoras y tenían un pronóstico desfavorable. Las cinco piezas caracterizadas por el crecimiento más invasor, como se demostró mediante los datos de seguimiento, mostraron un patrón de tinción difuso para p16^{INK4a} y, además, también se caracterizan por muchas células con doble tinción que muestran tinción para Ki67 junto con tinción para p16^{INK4a} en células individuales. Para los demás experimentos de doble tinción, cada uno de los marcadores de la proliferación celular sometidos a prueba mostró en al menos 4 de las 5 piezas al menos una célula individual con doble tinción. Por consiguiente, una combinación de cualquiera de los marcadores de la proliferación celular sometidos a prueba con p16^{INK4a} es adecuada para detectar los tumores de la mama que tienen la posibilidad de crecimiento invasor que necesitan un tratamiento más drástico. Para potenciar la sensibilidad por la doble tinción, se puede considerar que se incluya una combinación de más de un marcador de la proliferación en combinación con el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas.

Para las piezas en las que el seguimiento había demostrado propiedades de crecimiento menos invasor y un pronóstico más favorable, también se pudo demostrar sobreexpresión de p16. Sin embargo, aquí el patrón de tinción no fue difuso. Se pudo detectar la tinción adicional para p16^{INK4a} y para los marcadores de la proliferación en la pieza total, sin embargo, no como una doble tinción de una célula individual.

Por consiguiente, tanto el patrón de tinción para el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas como la doble tinción de células individuales con ambos marcadores es indicativo de las propiedades de crecimiento más invasor.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la posibilidad de crecimiento invasor y/o el riesgo de progresar a un cáncer de grado alto de tumores que comprende determinar en inmunohistoquímica o inmunocitoquímica la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular en al menos una célula individual;
5
en el que la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular en al menos una célula individual es indicativa de una posibilidad de crecimiento invasor y un riesgo elevado de progresar a un cáncer de grado alto, y en el que el producto génico marcador de la proliferación celular se selecciona del grupo que consiste en Ki67, Ki-S2, MCM2, MCM5 y topoisomerasa 2 alfa.
10
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tumor se selecciona de un grupo que comprende tumores de las vías respiratorias, del aparato urinario, del tubo digestivo, del aparato anogenital, del cuello uterino, de la próstata, de la mama, del pulmón y tumores asociados con el PVH.
15
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que adicionalmente el estado de PVH de las lesiones precursoras de cánceres incipientes se determina por la misma persona o por otra persona antes de, simultáneamente con o posteriormente a realizar el procedimiento de la reivindicación 2.
20
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se predice el riesgo de progresión de lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LSIL) del cuello uterino, y en el que la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular seleccionado del grupo que consiste en Ki67, Ki-S2, MCM2, MCM5 y topoisomerasa 2 alfa en al menos una célula individual es indicativa de un riesgo elevado de progresar a lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto (HSIL).
25
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los tumores son tumores de la mama, y en el que la presencia simultánea de sobreexpresión del producto génico inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p16^{INK4a} y la expresión de al menos un producto génico marcador de la proliferación celular seleccionado del grupo que consiste en Ki67, Ki-S2, MCM2, MCM5 y topoisomerasa 2 alfa en al menos una célula individual es indicativa de un riesgo elevado de progresar a un tumor de grado alto de la mama y/o de una posibilidad de crecimiento invasor del tumor de la mama.
30
35

Figura 1:

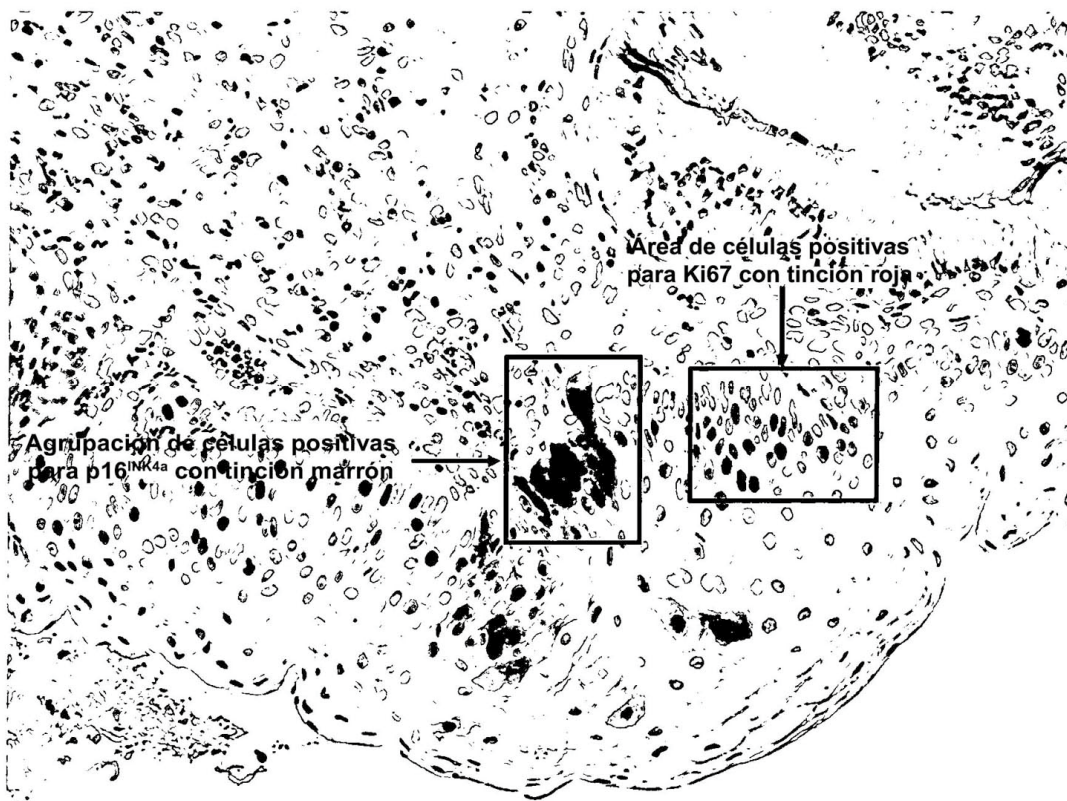


Figura 2:

