

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 152**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.09.2012 PCT/DE2012/100287**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2012 E 12772206 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2758785**

54 Título: **Método para comprobar la autocuración por el sistema inmunológico de un sujeto infectado con virus del papiloma humano**

30 Prioridad:

**19.09.2011 DE 102011053741**

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

**29.07.2019**

73 Titular/es:

**ABVIRIS DEUTSCHLAND GMBH (100.0%)  
Beimoorkamp 6  
22926 Ahrensburg, DE**

72 Inventor/es:

**HILFRICH, RALF**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 721 152 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

Método para comprobar la autocuración por el sistema inmunológico de un sujeto infectado con virus del papiloma humano.

5 La invención se refiere a un método para predecir la formación de carcinomas causados por virus del papiloma humano en un sujeto infectado con los virus del papiloma humano.

10 Los virus del papiloma humano, abreviados VPH y en lo sucesivo también llamados VPH, forman un grupo de virus, que ahora se dividen en más de 100 tipos. Los virus invaden las células epiteliales de la piel o varias membranas mucosas y causan un crecimiento no controlado, similar a un tumor, en las células infectadas.

15 Algunos tipos de VPH pueden causar alteraciones malignas. Por ejemplo, se sospecha que los virus del papiloma humano están involucrados en el desarrollo del cáncer de cuello uterino, el llamado carcinoma cervical. Los virus del papiloma humano también son sospechosos de causar cánceres vaginales, de pene y anal, o al menos de estar involucrados en su desarrollo.

20 Las investigaciones en personas infectadas por VPH han demostrado que una infección con virus del papiloma humano que causan carcinoma no conduce a una formación de carcinomas. Las investigaciones han demostrado que, en muchos casos, el sistema inmunológico reacciona a la infección por VPH e inicia medidas para destruir el VPH. Por ejemplo, las llamadas células asesinas son activadas por el sistema inmunológico, que destruyen los virus del papiloma humano en una etapa temprana, de modo que la formación de un carcinoma se contrarresta de manera efectiva. En este caso, es muy poco probable que una persona infectada con el VPH se enferme con un carcinoma inducido por el VPH.

25 Sin embargo, a menos que el sistema inmunológico responda a dicha infección por VPH o al menos no responda a la infección por VPH con las medidas adecuadas, es probable que se produzca carcinoma.

30 Heim et al.: "Antibodies to human papillomavirus 16 L1 virus-like particles as an independent prognostic marker in cervical cancer", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 186, N.º 4, abril de 2002 (2002-04), páginas 705-711 han demostrado que la presencia de anticuerpos endógenos contra el VPH tiene una influencia positiva en los pacientes que ya presentan carcinomas originados por el VPH. Se observó que los pacientes con carcinomas originados por el VPH vivían más tiempo cuando se detectaban anticuerpos endógenos contra el VPH en los pacientes.

35 Aaltonen et al., "Poor antibody response against human papillomavirus in adult-onset laryngeal papillomatosis", *Journal of Medical Microbiology*, Harlow, GB, vol. 50, N.º 5, 1 de mayo de 2001, pp. 468-471, examinaron pacientes con verrugas en la garganta causadas por VPH tipo 6 y/o VPH tipo 11. En estos pacientes, se detectaron anticuerpos endógenos, en donde estos anticuerpos también podían detectarse en un grupo de control de pacientes que no tenían verrugas en la garganta. Se concluyó de ello que los anticuerpos endógenos detectados no pueden ser una reacción del sistema inmunológico a la formación de las verrugas.

40 Gruijl et al.: "Immunoglobulin G responses against human papillomavirus type 16 virus-like particles in a prospective non-intervention cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 89, N.º 9, 7 de mayo de 1997, páginas 630-638, han estudiado a un grupo de mujeres que se infectaron con el VPH y ya tenían lesiones precancerosas ocasionadas por el VPH. Se observó que, cuando se detectaban anticuerpos endógenos contra el VPH, las mujeres tendían a mostrar un avance progresivo de la enfermedad causada por el VPH.

50 El objetivo de la invención es proponer un método por medio del cual una predicción confiable sea mejor que hasta ahora, de si en las personas infectadas con virus del papiloma humano realmente también se llega a una formación de carcinomas.

55 El objetivo se logra mediante un procedimiento que presenta las características de la reivindicación 1. Los desarrollos ventajosos de la invención se harán evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes, la siguiente descripción y las Figuras.

60 Un procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para verificar la autocuración a través del sistema inmunológico de un voluntario infectado con el virus del papiloma humano basándose en al menos dos muestras tomadas del voluntario y que contienen células. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

1. determinar si el VPH con al menos una molécula de estímulo específica del VPH que estimula el sistema inmunológico del voluntario está contenido en al menos una de las muestras;
- 65 2. determinar si los anticuerpos endógenos al VPH con la molécula de estímulo están contenidos en al menos otra de las muestras;

3. evaluar las etapas 1 y 2 en el sentido de que, en presencia de la molécula de estímulo y en presencia de los anticuerpos, el sistema inmunológico del voluntario inicia la autocuración, lo que evita la formación de un carcinoma inducido por VPH.

5 La invención se basa en la idea de utilizar dos determinantes para verificar la autocuración del sistema inmunológico de una persona infectada con el VPH, a saber, por un lado, si la persona infectada por el VPH tiene una molécula de estímulo específica del VPH que estimula su sistema inmunológico y, por el otro, si la persona infectada por el VPH ya ha formado anticuerpos endógenos que actúan contra el VPH con la molécula de estímulo.

10 Se ha encontrado que, mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza un método por medio del cual se predice con gran certeza si la formación de carcinomas causados por el VPH se produce en voluntarios infectados por VPH o si dicha formación de carcinoma es prevenida por las defensas del sistema inmunológico.

15 El procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para su uso en seres vivos de todo tipo. En principio, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede usar, por lo tanto, tanto en seres humanos como en animales.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para verificar la autocuración por el sistema inmunológico de una mujer cuyo útero, especialmente el cuello uterino está infectado por el VPH. Por medio del procedimiento de acuerdo con la invención, se puede hacer una predicción confiable sobre si, en el área del útero, en particular del cuello uterino, se formarán tumores malignos causados por el VPH. A este respecto, el procedimiento de acuerdo con la invención es una ayuda particularmente buena para decidir si se debe realizar una operación en la mujer, por ejemplo, para llevar a cabo una conización.

25 El procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo de la siguiente manera: primero se verifica sobre la base de una muestra extraída si al menos una de las células tomadas con la muestra está infectada con el VPH que tiene la molécula de estímulo. Si la prueba es positiva, es decir, el VPH se detecta con la molécula de estímulo, la siguiente etapa es verificar si el sistema inmunológico del voluntario ya reaccionó a la infección actual del VPH determinando si el sistema inmunológico ya formó anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo.

30 Para verificar si se han formado anticuerpos endógenos, se extrae al menos una muestra adicional del voluntario, por ejemplo, en un momento posterior. Esta verificación también se puede realizar, por ejemplo, sobre la base de una muestra tomada en un sitio diferente del voluntario que la muestra anterior. Básicamente, se utilizan fluidos corporales de todo tipo, como sangre, suero o plasma, para realizar el examen de si se han formado los anticuerpos endógenos.

35 El procedimiento de acuerdo con la invención se dirige a al menos un tipo de cápside del VPH como molécula de estímulo. La molécula de estímulo utilizada es la proteína L1 de la cápside del VPH tipo 16.

40 Estudios anteriores han demostrado que, en la persona infectada por VPH, cuyas células aún forman la proteína L1, falla con una probabilidad de más del 80% la formación de carcinomas causados por el VPH. Si el sistema inmunológico de la persona infectada formó anticuerpos endógenos contra las proteínas L1 y respondió de esta manera a la infección por VPH, se siguieron manteniendo hasta ahora todos los carcinomas.

45 Las investigaciones también han demostrado que existe una probabilidad de más del 90% en la persona infectada por el VPH a una formación de carcinoma causado por el VPH, siempre y cuando falte el estímulo de L1 y el sistema inmunológico no forme los anticuerpos endógenos contra la proteína L1.

50 En este contexto, es aconsejable que, según la invención, primero se determine si el VPH está contenido con al menos una proteína L1 como molécula de estímulo en la muestra y, luego, si el VPH se detecta con la proteína L1, se verifica si la formación de los anticuerpos endógenos contra la proteína L1 se ha utilizado en el voluntario.

55 La muestra se toma de la membrana mucosa del voluntario. Al respecto, tiene sentido que, para tomar muestras, se realice un frotis de una superficie de la mucosa del voluntario, por ejemplo, un frotis de la mucosa del cuello uterino de una mujer.

60 Para determinar si el VPH está contenido con la molécula de estímulo en la al menos una muestra, se lleva a cabo una etapa en la que tiene lugar la detección de un cambio morfológico y/o un cambio biomolecular de al menos una de las células, preferiblemente con respecto a un estado de referencia. Como resultado, los voluntarios sanos son reconocidos porque sus células no tienen un cambio morfológico o biomolecular. En este caso, no es necesaria una implementación adicional del método de acuerdo con la invención, de modo que las etapas adicionales del procedimiento de acuerdo con la invención se puedan reducir y, por lo tanto, se ahorren costos.

Para poder distinguir que en el caso de un cambio determinado se trata de una desviación del estado saludable, el cambio morfológico y/o el cambio biomolecular se lleva a cabo preferiblemente en comparación con las células sanas.

5 Para detectar el cambio morfológico y/o el cambio biomolecular de la al menos una célula, la muestra puede someterse a un análisis que usa un cambio mensurable y/o perceptible por el usuario, preferiblemente en relación con un estado de referencia, para extraer conclusiones sobre el cambio morfológico o biomolecular de la célula en comparación con el estado saludable de la célula, en particular para poder determinar dicho cambio.

10 Para este propósito, se puede llevar a cabo un examen microscópico de la muestra, por ejemplo, se puede determinar un cambio morfológico de al menos una célula, preferiblemente comparado con un estado de referencia, después de una coloración de la muestra bajo el microscopio. Es útil para detectar el cambio morfológico de al menos una célula en la que se realiza una prueba de Papanicolaou. Por ejemplo, para detectar el cambio biomolecular de la al menos una célula, es posible que la muestra se someta a un análisis en el que se pueda detectar en la célula una mutación de la célula y/o información genética adicional como, por ejemplo, informaciones genéticas virales.

15 Para determinar si el VPH está contenido con la molécula de estímulo en al menos otra de las muestras, se lleva a cabo una etapa adicional en la cual, por medio de anticuerpos específicos para el VPH, se identifica el cambio morfológico y/o biomolecular de la al menos una célula, preferiblemente respecto de un estado de referencia, como cambio inducido por el VPH, en el que el VPH está involucrado con la molécula de estímulo. Ya con esta etapa adicional, se puede hacer una primera estimación de si en la persona infectada por VPH se llega a la formación de un carcinoma causado por el VPH.

20 Las investigaciones han demostrado que, por ejemplo, los voluntarios con infección por VPH, en los que no se forma la molécula de estímulo, es decir, la molécula de estímulo no es detectada, es altamente probable que desarrollen un carcinoma. Por otro lado, es muy probable que el voluntario no produzca carcinomas inducidos por VPH a menos que la presencia de la molécula de estímulo en la muestra se identifique en esta etapa. Para este caso, luego se determina en la siguiente etapa del procedimiento de acuerdo con la invención si el sistema inmunológico ya ha comenzado por la molécula de estímulo y se forman anticuerpos endógenos contra el VPH o la molécula de estímulo.

25 El al menos un anticuerpo específico de VPH está diseñado para unirse a al menos un VPH que presenta la molécula de estímulo, de modo que en el caso de la presencia de la molécula de estímulo a través del anticuerpo puede deducirse la molécula de estímulo asociada.

30 El anticuerpo específico contra el VPH puede ser un anticuerpo no humano. También es concebible que el anticuerpo específico contra el VPH sea un anticuerpo humano. Además, el anticuerpo específico contra el VPH puede ser un anticuerpo endógeno.

35 Es aconsejable que el anticuerpo específico contra el VPH sea un anticuerpo de ratón, en particular un anticuerpo monoclonal de ratón, ya que un anticuerpo de este tipo puede prepararse de una manera simple específicamente para uso en el procedimiento de acuerdo con la invención.

40 Para identificar una cápside como una molécula de estímulo, el anticuerpo es un anticuerpo específico de la cápside. Además, el anticuerpo es un anticuerpo específico de L1, también denominado anticuerpo específico de VPHL1, para actuar como un anticuerpo para la proteína L1 de VPH.

45 De acuerdo con una realización de la invención, se prevé que, en la etapa adicional, la muestra se trate primero con calor, luego se agreguen los anticuerpos específicos contra el VPH y más tarde la muestra se someta a análisis con los anticuerpos específicos contra el VPH, lo cual es un cambio mensurable y/o un cambio perceptible por el usuario en las células infectadas por VPH, preferiblemente respecto de un estado de referencia, debido a la adición de los anticuerpos específicos contra el VPH.

50 El tratamiento térmico destruye las estructuras de proteínas existentes, lo que favorece la unión de anticuerpos a las células infectadas por VPH. Por tratamiento térmico, se produce un llamado desmascaramiento antigénico. El tratamiento puede realizarse mediante calor de vapor y/o microondas. Preferiblemente, el tratamiento térmico de la muestra se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 90 grados y aproximadamente 100 grados centígrados, con preferencia, a aproximadamente 95-96 grados centígrados.

55 Se contempla que se pueda agregar un agente potenciador que mejore el cambio mensurable y/o perceptible por el usuario de las células infectadas con VPH debido a la adición de anticuerpos específicos contra el VPH. El agente potenciador reduce el límite de detección del análisis por el cual se identifican las células infectadas por VPH debido a la adición de anticuerpos específicos contra el VPH. A este respecto, el VPH puede identificarse particularmente bien con la molécula de estímulo y el anticuerpo unido a él por medio del agente potenciador.

60

65

También es recomendable que el agente potenciador esté unido a otros anticuerpos específicos contra el VPH y se agregue junto con los otros anticuerpos específicos contra el VPH, en donde los otros anticuerpos específicos contra el VPH se unen a las células infectadas por el VPH y/o los anticuerpos específicos contra el VPH ya agregados. Como resultado, se genera un complejo de unión de una manera simple, que consiste en la célula infectada con VPH, el anticuerpo específico contra el VPH y el otro anticuerpo específico contra el VPH con el agente potenciador.

El anticuerpo específico de VPH adicional puede ser un anticuerpo no humano. También es concebible que el otro anticuerpo específico contra el VPH sea un anticuerpo humano. Además, el otro anticuerpo específico contra el VPH puede ser un anticuerpo endógeno.

Es aconsejable que el otro anticuerpo específico contra el VPH sea un anticuerpo de ratón, en particular un anticuerpo monoclonal de ratón, ya que un anticuerpo de este tipo puede prepararse de una manera simple específicamente para uso en el procedimiento de acuerdo con la invención.

Por supuesto, el otro anticuerpo específico contra el VPH es uno que reacciona a la molécula de estímulo del VPH y/o responde al anticuerpo específico contra el VPH que ya se adhiere a la célula con los VPH y la al menos una molécula de estímulo.

El agente potenciador puede ser una molécula que actúa como un potenciador del color. El agente potenciador puede ser una enzima tal como, por ejemplo, una peroxidasa o fosfatasa.

Si el agente potenciador es una molécula que actúa como un potenciador del color, se recomienda que el análisis se realice agregando una cantidad predeterminada de colorante como, por ejemplo, un cromógeno, para teñir la al menos una célula infectada por VPH, en particular el al menos un anticuerpo específico contra el VPH adherido. Por lo tanto, es técnicamente fácil identificar el VPH con la molécula de estímulo, ya que la célula infectada por el VPH y/o el anticuerpo unido están marcados por tinción.

Adicional o alternativamente, se puede llevar a cabo un análisis o identificación de las células infectadas por el VPH o de los anticuerpos específicos contra el VPH que se adhieren a las mismas mediante marcación radioactiva y/o se identifican las células infectadas por el VPH o los anticuerpos específicos contra el VPH que se adhieren a las mismas por marcación mediante partículas fluorescentes.

Preferiblemente, los anticuerpos que no se adhieren a las células infectadas por VPH deben lavarse. Esto garantiza que los anticuerpos específicos contra el VPH que no se adhieran a las células infectadas por el VPH se eliminen de la muestra y no se analicen de manera que, por ejemplo, sólo los anticuerpos adheridos infectados por el VPH se visualicen en el curso de la tinción de los anticuerpos específicos contra el VPH.

Si, además de los anticuerpos específicos contra el VPH, también se agregan los otros anticuerpos específicos contra el VPH, se debe realizar una etapa de lavado después de cada adición o lixiviación al final de al menos la última etapa de adición. Esto también está en el contexto de tener sólo los anticuerpos que realmente se adhieren a las células infectadas por VPH en la muestra para identificar las células infectadas por VPH con la molécula de estímulo por medio de su marcación, en particular la marcación por tinción o fluorescencia o las marcaciones por medio de radioactividad.

De acuerdo con la invención, se prevé que, para determinar si los anticuerpos endógenos contra el VPH están presentes con la molécula de estímulo, se realiza una prueba para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de anticuerpos contra el VPH contenidos en el fluido corporal, que comprende al menos las siguientes etapas:

La muestra se mezcla con un reactivo que consiste esencialmente en una cantidad predeterminada de líquido fisiológicamente activo y una cantidad predeterminada de al menos un antígeno específico contra el VPH con la molécula de estímulo;

posteriormente, la mezcla se somete a un análisis que utiliza un cambio mensurable y/o perceptible por el usuario, preferiblemente en relación con un estado de referencia.

Como resultado, se puede lograr una detección de anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo de una manera simple y con poco esfuerzo.

Por ejemplo, se puede utilizar para ello una prueba rápida para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de los anticuerpos contenidos en el fluido corporal contra el VPH, que se describe en la solicitud de patente alemana con el número de referencia 10 2010 061 028.3.

Preferiblemente, esta prueba rápida debe realizarse con el sistema de análisis descrito en la solicitud de patente alemana con el número de referencia 10 2010 061 028.3, de modo que se utilice el sistema de análisis descrito en la misma. A este respecto, la referencia de solicitud de patente alemana 10 2010 061 028.3 se hace en su totalidad y está totalmente incorporada en esta solicitud de patente.

La prueba rápida no requiere un análisis complejo y complicado en un laboratorio central. A este respecto, el examen de diagnóstico ya es posible in situ, es decir, en el consultorio de un médico o en el hospital directamente en la enfermería.

5

Por ejemplo, una solución salina se puede utilizar como un líquido fisiológicamente activo en el curso de la prueba.

En el curso de la prueba, se utiliza un antígeno específico contra el VPH, que identifica los anticuerpos contra el VPH con la molécula de estímulo. Dado que la molécula de estímulo es una proteína L1, en el caso del antígeno específico contra el VPH se trata de un antígeno específico contra el VPHL1, es decir, un antígeno específico contra el VPH16L1 que identifica anticuerpos contra la proteína L1 del VPH de tipo 16.

10

Si los anticuerpos específicos de VPH contra VPH con la molécula de estímulo se detectan en la muestra por medio de la prueba, se trata de aquellos que se formaron por el sistema inmunológico del voluntario, es decir, los anticuerpos endógenos.

15

Al agregar el antígeno específico contra el VPH, se forma un complejo del antígeno y cualquier anticuerpo contenido en la muestra contra el VPH con la molécula de estímulo antes del análisis. Si la muestra contiene los anticuerpos asociados con al menos un antígeno, el reactivo se inactiva. Si no hay anticuerpos correspondientes presentes en la muestra, el reactivo permanece reactivo. Esta propiedad reactiva del reactivo se utiliza luego en el análisis.

20

Dependiendo de si la muestra contiene anticuerpos contra los virus del papiloma humano con la molécula de estímulo o no, el análisis da como resultado un cambio medible y/o perceptible por el usuario, o no se produce dicho cambio. En la prueba, el análisis mediante la medición o la percepción de un usuario determina si los anticuerpos que pertenecen a al menos un antígeno están presentes en la muestra o están por encima del límite de detección del procedimiento o están ausentes o están por debajo del límite de detección del procedimiento.

25

El cambio perceptible por el usuario en el curso del análisis puede ser un cambio óptico, acústico y/o táctil, preferiblemente en relación con un estado de referencia. Por ejemplo, se puede usar un medio fluorescente. El análisis puede usar un efecto de coloración o un efecto de decoloración o una reacción de color. Básicamente, el análisis puede utilizar cualquier tipo de reacción medible. Todas estas posibilidades permiten que el resultado del análisis se determine rápidamente.

30

En el caso de anticuerpos faltantes contra la molécula de estímulo o en el caso de una cantidad de anticuerpos de VPH endógenos en la muestra que están por debajo o dentro del intervalo de un límite de detección predeterminado para el antígeno específico contra el VPH, se prefiere que un usuario modifique un medio, en particular sobre una sección de área predeterminada o un volumen predeterminado, de modo perceptible y/o medible, preferiblemente en comparación con un estado de referencia. El cambio puede tener lugar sobre una sección del área determinada del medio o sobre un volumen predeterminado del medio.

35

40

El análisis debe alimentarse con una cantidad predeterminada de la mezcla del reactivo y la muestra de fluido corporal. Preferiblemente, la cantidad predeterminada debe ser una cantidad parcial de la mezcla existente. Como resultado, es posible realizar una serie de exámenes de diagnóstico de la muestra extraída y el reactivo combinado con ella, por ejemplo, para obtener una garantía estadística del resultado.

45

Además, la cantidad de al menos un antígeno específico contra el VPH puede determinarse por un límite de detección predeterminado para la cantidad de al menos un anticuerpo de VPH por determinar contenido en la muestra. El límite de detección es preferiblemente el límite de detección deseado, por ejemplo, para determinar que cierta cantidad de anticuerpos contra el VPH está contenida con la molécula de estímulo en la muestra de fluido, para confirmar que el sistema inmunológico ya ha comenzado con la presencia de VPH con la molécula de estímulo y ha reaccionado.

50

Otros objetos, ventajas, características y aplicaciones de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción de un ejemplo de realización con relación a los dibujos.

55

La Fig. 1 es una representación esquemática para describir un posible método para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, que es adecuado para verificar la autocuración por parte del sistema inmunológico de un ser humano infectado con el virus del papiloma humano.

Las Figuras 2A a 2D muestran las etapas del procedimiento para llevar a cabo una prueba rápida para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de anticuerpos contra virus del papiloma humano contenidos en fluidos corporales en el curso de la realización de un procedimiento, como es la base de la ilustración en la Figura 1.

60

La Figura 1 muestra esquemáticamente un posible método cuando se lleva a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, que es apropiado para comprobar la autocuración del sistema inmunológico de un ser humano infectado con el virus del papiloma humano (VPH).

65

- 5 Según el procedimiento, en una primera etapa 3, se toma una muestra 2 de un voluntario 1 con células de una mucosa del voluntario 1. Por ejemplo, la extracción se puede realizar mediante un frotis de la superficie de una mucosa del voluntario 1. En el caso de la mucosa, se puede tratar, por ejemplo, de la mucosa del útero de una mujer.
- 10 Sobre la base de la muestra 2, se determina en una etapa adicional 4 si el VPH está contenido en la muestra 2 con al menos una molécula de estímulo específica contra el VPH que estimula el sistema inmunológico del voluntario. Se determina si el VPH presenta al menos una proteína L1 como molécula de estímulo.
- 15 Si se determina en el curso de la etapa 4 que el VPH que contiene la molécula de estímulo está contenido como el resultado 5 en la muestra 2, ya existe un requisito previo esencial de que el sistema inmunológico del voluntario 1 avanza contra el VPH con la molécula de estímulo y destruye el VPH y, por lo tanto, previene la formación de un carcinoma causado por VPH.
- 20 Queda por verificar que el sistema inmunológico del voluntario haya sido estimulado efectivamente por la molécula de estímulo y, por lo tanto, activado por la molécula de estímulo para atacar los VPH con la molécula de estímulo. Para este propósito, se extrae otra muestra 2' del voluntario 1, por medio de la cual se determina si el voluntario ya formó los anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo.
- 25 Esta etapa 6 para verificar la presencia de anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo se puede repetir varias veces, en particular mediante el muestreo 2' con múltiple desplazamiento en el tiempo. Sin embargo, en principio, también sobre la base de la muestra 2 es posible el examen de si los anticuerpos endógenos contra el VPH ya existen con la molécula de estímulo, por medio de la cual ya se realizó la etapa 4 anterior.
- 30 Al final de la implementación del procedimiento de acuerdo con la invención, como resultado 7, se puede afirmar que, en los VPH existentes con la molécula de estímulo, el sistema inmunológico del voluntario 1 ya ha formado anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo. En este caso, la formación de un carcinoma causado por el VPH es muy probablemente prevenida por el sistema inmunológico del voluntario 1.
- 35 Si el resultado 7 es que el sistema inmunológico del voluntario 1 no ha atacado el VPH con la molécula de estímulo, por lo que no se detectan anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo, habrá una alta probabilidad de formación de un carcinoma causado por el VPH.
- 40 En el curso de la realización de la etapa 4, en la que se determina si los VPH están contenidos con la molécula de estímulo en la muestra 2, se lleva a cabo una primera subetapa 4a, en la que se reconoce un cambio morfológico y/o un cambio biomolecular de al menos una de las células.
- 45 Para este propósito, la muestra 2 se coloca preferiblemente con las células en un portaobjetos, en particular un portaobjetos de vidrio. A continuación, se realiza preferiblemente una llamada prueba de Papanicolaou. Para ello, las células contenidas en la muestra 2 se tiñen por medio de un tinte y la muestra 2 con las células teñidas se somete a una evaluación microscópica.
- 50 En el curso de la evaluación microscópica, un usuario busca, por ejemplo, cambios morfológicos de las células. Si se detecta al menos tal cambio morfológico de al menos una célula de la muestra, debe verificarse si este cambio morfológico fue causado por el VPH, en particular el VPH con la molécula de estímulo.
- 55 Para este propósito, se lleva a cabo preferiblemente otra prueba en una subetapa 4b adicional de la etapa 4. En el curso de esta prueba, la muestra 2 se somete primero a un desmascaramiento de antígenos. Para ello, la muestra 2 se trata con calor a aproximadamente 95 grados centígrados.
- 60 A continuación, al menos uno, preferiblemente varios anticuerpos monoclonales de ratón del mismo tipo se agregan a la muestra 2. El anticuerpo monoclonal de ratón está diseñado preferiblemente para unirse a la al menos una célula infectada por VPH con la molécula de estímulo. El tratamiento térmico y la adición de los anticuerpos de ratón en cada caso se llevan a cabo preferiblemente en el portaobjetos con la muestra 2.
- 65 Luego se realiza una lixiviación de los anticuerpos de ratón. Para ello, los anticuerpos del ratón se retiran del portaobjetos que todavía están libres, es decir, no se adhieren a las células infectadas por el VPH.
- 70 En una etapa adicional 4c, se visualizan ahora los anticuerpos de ratón que se adhieren al VPH con la molécula de estímulo. Para ello, un anticuerpo de ratón adicional se aplica preferiblemente a la muestra 2, que también se adhiere al VPH con la molécula de estímulo o al menos se adhiere al anticuerpo de ratón anterior que ya se adhiere al VPH con la molécula de estímulo.
- 75 Los otros anticuerpos de ratón están vinculados a al menos una enzima como, por ejemplo, la peroxidasa o la fosfatasa, que aumenta la propensión al color del complejo de molécula de estímulo de anticuerpo de ratón/VPH.

5 En una etapa adicional, los constituyentes no adherentes de los anticuerpos de ratón agregados se lavan nuevamente de la muestra 2 o del portaobjetos con la muestra 2, de modo que permanecen anticuerpos de ratón exclusivamente en el portaobjetos con la muestra 2, que se adhieren a las células con VPH y la molécula de estímulo.

10 Posteriormente, se aplica un colorante, por ejemplo un cromógeno, a la muestra 2, en particular el portaobjetos con la muestra 2, y se somete, por ejemplo, a un examen microscópico. Al agregar el colorante, se puede detectar una tinción precipitada en el microscopio, donde la molécula de estímulo formó un complejo de unión con el anticuerpo de ratón y/o el anticuerpo de ratón adicional con la enzima asociada. Por lo tanto, si dichas decoloraciones se pueden detectar bajo el microscopio, se determina que en la muestra 2 están presentes los VPH con la molécula de estímulo.

15 La etapa 6, para determinar si los anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo están formados por el voluntario, se lleva a cabo preferiblemente por medio de una prueba rápida para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de anticuerpos contenidos en el fluido corporal contra el VPH, como se describe en la solicitud de patente alemana 10 2010 061 028.3. Además, preferiblemente se utilizan un sistema de análisis y un dispositivo para llevar a cabo tal prueba rápida, como también se describe en la solicitud de patente alemana 10 2010 061 028.3.

20 Como puede verse en el ejemplo de las Figuras 2A a 2E, la muestra 2' se puede extraer mediante una pipeta 10 (Figura 2A). En este caso, se puede tratar de una muestra de sangre completa o, a su vez, de una muestra de otro fluido corporal como, por ejemplo, el moco de una superficie de mucosa del voluntario.

25 La muestra 2' se agrega a un recipiente 8 en el que se encuentra un reactivo 9 y se mezcla con el reactivo 9 (Figura 2B). El reactivo 9 consiste esencialmente en una cantidad predeterminada de líquido que actúa fisiológicamente, como solución salina y una cantidad predeterminada de al menos un antígeno específico contra el VPH.

30 En el presente caso, el antígeno específico contra el VPH es uno de esos antígenos que identifica anticuerpos contra el VPH con la molécula de estímulo y se une a dichos anticuerpos. En el caso del antígeno, se trata de un antígeno específico contra el VPH1.

35 Para mezclar la muestra 2' con el reactivo 9, el recipiente 8 se agita varias veces y se deja reposar durante un período de tiempo predeterminado, por ejemplo, 10 minutos. Como resultado, se ha producido una mezcla de las cantidades de muestra con el reactivo 9 (Figura 2C).

40 En una etapa adicional, el sustrato que se halla ahora en el contenedor 8 se extrae luego parcialmente mediante una pipeta 10' y se alimenta a una cantidad predeterminada, por ejemplo, una o más gotas del sustrato, a través de un punto 11 de llenado en un sistema 12 de análisis. El sistema 12 de análisis presenta un conjugado que consiste esencialmente en una cantidad predeterminada de una molécula que reacciona a la molécula de estímulo, en donde el conjugado está marcado con oro coloidal. La molécula del conjugado es una molécula específica de L1 que identifica una proteína L1 como una molécula de estímulo.

45 Después de la adición del sustrato al sistema 12 de análisis, sucede lo siguiente (Figura 2E): Si no hay una cantidad de anticuerpos contra el VPH con la molécula de estímulo situada por encima del límite de detección del sistema 12 de análisis en la muestra del paciente, se produce una decoloración en una región prevista del sistema 12 de análisis. Si los anticuerpos contra el VPH con la molécula de estímulo están presentes en la muestra o están por encima del límite de detección, no se producirá tal decoloración.

50 Lista de referencias

- 1 voluntario
- 2 muestra
- 2' muestra
- 3 etapa de procedimiento
- 4 etapa de procedimiento
- 4a subetapa
- 4b subetapa
- 4c subetapa
- 4d subetapa
- 5 resultado
- 6 etapa de procedimiento
- 7 resultado
- 8 recipiente

- 9 reactivo
- 10 pipeta
- 10' pipeta
- 11 punto de llenado
- 12 sistema de análisis

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para predecir la formación de carcinomas originados por virus del papiloma humano (VPH) en un voluntario infectado por VPH, que comprende las siguientes etapas:
- 1) extracción de al menos dos muestras que contienen células del voluntario, en donde una de las al menos dos muestras es una muestra de mucosa (muestra de la mucosa) y otra de las al menos dos muestras es una muestra de líquido corporal (muestra de líquido corporal);
- 10 2) determinación de si en la muestra de la mucosa los VPH contienen al menos una molécula de estímulo que estimula el sistema inmunológico del voluntario al reconocer mediante un anticuerpo un cambio morfológico y/o un cambio biomolecular de al menos una de las células de la muestra de mucosa como una alteración inducida por el VPH, en la que están involucrados los VPH con la molécula de estímulo, en donde la molécula de estímulo en consideración es la proteína L1 de la cápside de VPH de tipo 16 (VPH16) y los anticuerpos son específicos contra la
- 15 molécula de estímulo;
- 3) determinación de si la muestra de fluido corporal contiene anticuerpos endógenos contra el VPH con la molécula de estímulo mezclando la muestra de fluido corporal con un reactivo que consiste esencialmente en una cantidad predeterminada de líquido fisiológicamente activo y una cantidad predeterminada de al menos un antígeno, y luego
- 20 la mezcla se somete a un análisis que utiliza un cambio mensurable y/o perceptible por el usuario, en donde el antígeno es reactivo en referencia a los anticuerpos contenidos en la muestra de fluido corporal que son específicos contra la molécula de estímulo de VPH16 (anticuerpos específicos de VPH16L1);
- 4) evaluación en el sentido de que, cuando se detecta la molécula de estímulo en la etapa (2) y se detecta el anticuerpo endógeno en la etapa (3), se predice que la formación de carcinomas, causados por los VPH
- 25 considerados, se evita por el sistema inmunológico del voluntario con muy alta probabilidad.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa (2), para detectar el cambio morfológico de al menos una célula, se realiza una prueba de Papanicolaou.
- 30 3. Procedimiento de acuerdo con reivindicación 1 o 2, en donde, en la etapa (2), la muestra de la mucosa se trata primero con calor, luego se agregan los anticuerpos y más tarde se analizan la muestra de la mucosa y los anticuerpos, lo que proporciona un cambio mensurable y/o perceptible por el usuario de las células infectadas con VPH debido a la adición de los anticuerpos.
- 35 4. Procedimiento de acuerdo con reivindicación 3, en el que, en la etapa (2), se agrega un agente potenciador, mediante el cual el cambio mensurable y/o perceptible por un usuario se potencia en el análisis.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, en la etapa (3), se suministra una cantidad predeterminada de la mezcla del análisis.
- 40 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, en la etapa (3), en el caso de anticuerpos específicos de VPH16L1 faltantes en la muestra de fluido corporal o en el caso de una cantidad de anticuerpos específicos de VPH16L1 en la muestra de fluido corporal, que están por debajo o en el intervalo de un límite de detección predeterminado para el antígeno, se modifica un medio, en particular sobre una sección de superficie predeterminada o un volumen predeterminado, de modo perceptible por un usuario y/o en forma mensurable.
- 45

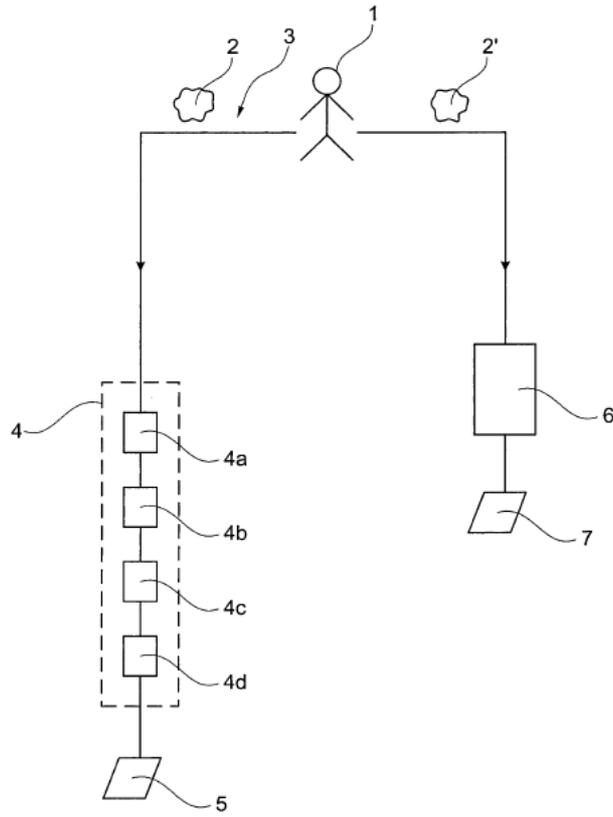


Fig. 1

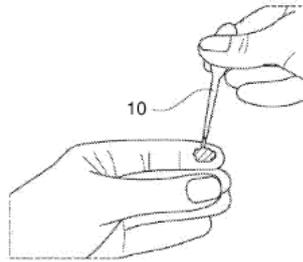


Fig. 2A

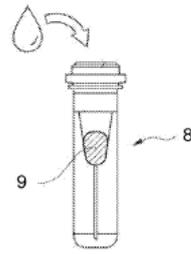


Fig. 2B

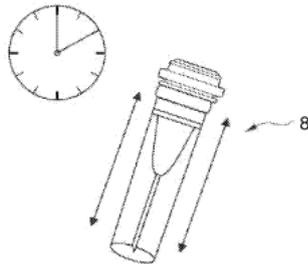


Fig. 2C

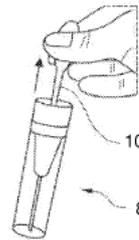


Fig. 2D

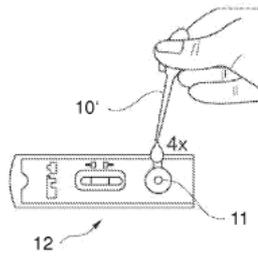


Fig. 2E