

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 526**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2015 PCT/IT2015/000126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2015 E 15751091 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3140655**

54 Título: **Procedimiento para detectar carcinogénesis en el cuello uterino**

30 Prioridad:

07.05.2014 IT RM20140225

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

01.08.2019

73 Titular/es:

**MACCALLINI, VINCENZO (20.0%)
Via G. Verrazzano 44
67051 Avezzano (AQ), IT;
IAKUSHEVA, MARINA (20.0%);
DI BENEDETTO, FEDERICA (20.0%);
DI BENEDETTO, LUDOVICA (20.0%) y
DI BENEDETTO, NICOLE (20.0%)**

72 Inventor/es:

**MACCALLINI, VINCENZO y
DI BENEDETTO, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 721 526 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 detectar carcinogénesis en el cuello uterino.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar carcinogénesis en el cuello uterino. Más específicamente, la invención se refiere a algunos procedimientos para diagnosticar el cáncer del cuello uterino que integran o sustituyen el campo de acción de la citología con el de la biología molecular, y proporciona un sistema para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las lesiones cervicales inducidas por el PVH que aprovecha procedimientos analíticos muy sensibles y específicos, como inmunoelectrotransferencia y ELISA de tipo sándwich, para detectar aquellos casos en que la transformación hacia una lesión neoplásica se ha vuelto irreversible.

15 **Antecedentes de la invención**

La asociación entre la infección por el papilomavirus humano (PVH) y el cáncer ha estimulado un interés constante en los investigadores. El PVH infecta las células basales del epitelio escamoso e induce la formación de lesiones benignas y/o, en algunos casos, tumores malignos invasores. El virión del PVH consiste en una cubierta proteica (cápside) que rodea un ADN bicatenario circular organizado en regiones codificantes y no codificantes. En la región codificante, se han identificado ocho marcos de lectura abiertos tempranos (ORF) (E1-E8) y dos ORF tardíos (L1, L2). Los primeros ORF codifican proteínas que intervienen en la replicación del ADN vírico durante la proliferación, la regulación de la expresión génica vírica (E2), el ensamblaje del virus (E4), la inmortalización y transformación del virus (E6 y E7, solo en PVH de alto riesgo). Los ORF tardíos se activan solo después de la diferenciación celular y codifican las proteínas de la cápside vírica (L1 y L2). Los promotores, los potenciadores y otros elementos reguladores se sitúan en la región reguladora en dirección 5' (URR) no codificante.

Todos los tipos de PVH se desarrollan y se reproducen únicamente en los queratinocitos (o células epiteliales productoras de queratina), cuya diferenciación es fundamental para el desarrollo vírico. Al pasar por una lesión de las capas epiteliales, el PVH alcanza e infecta las células madre de los queratinocitos situadas en la capa basal del epitelio. Aquí el virus comienza su replicación usando la maquinaria de replicación de la célula: reproduce su propio genoma varias veces mientras retiene una carga vírica baja (hasta 50-300 copias). Cuando las células basales proliferan y se mueven hacia las capas externas del epitelio, al mismo tiempo se mueven también los virus y continúan reproduciéndose sin amplificar aún más su genoma, para eludir la detección por el sistema inmunitario. Cuando el queratinocito huésped alcanza la fase S de su diferenciación (queratinización), el PVH replica su genoma hasta aproximadamente 1000 copias. De hecho, en esta fase el virus libera las proteínas E6 y E7, que estimulan el paso de las células a la fase S (Kadaja M, *et al.*, Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability. *Virology*. 2009 20 de febrero; 384(2):360-8). Finalmente, cuando el queratinocito alcanza el epitelio superficial y muere, el genoma vírico, reempaquetado en una cápside, sale de la célula.

En los países industrializados, el cáncer de cuello uterino es una enfermedad cuidadosamente controlada, gracias a la difusión de la prueba de Papanicoláu y, en particular, a los programas de cribado organizados. En realidad, esta es una de las pocas enfermedades oncológicas que se pueden prevenir a través de la detección y el tratamiento tempranos de lesiones preinvasoras (neoplasia intraepitelial de cuello uterino, NIC). A través del examen citológico de una pequeña cantidad de células extraídas del cuello uterino es posible determinar la presencia de anomalías en el epitelio escamoso (SIL, lesiones intraepiteliales escamosas), que se clasifican como ASC-US (células escamosas atípicas de significación indeterminada), ASC-H (células escamosas atípicas: no puede excluir HSIL), LSIL (lesión intraepitelial escamosa de bajo grado), HSIL (lesión intraepitelial escamosa de alto grado) y, por último, "carcinoma", cuando ya están presentes células carcinomatosas. Se ha estimado que el cribado con la prueba de Papanicoláu cada tres años en el grupo de edad de 35 a 65 años puede reducir el riesgo de cáncer invasor en un 90 % (IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Strategies. *IARC Handbooks of Cancer Prevention Vol. 10. Cervix Cancer Screening Lyon: IARC press, 2005*).

En las últimas décadas, el PVH se ha reconocido como una causa necesaria pero no suficiente del cáncer de cuello uterino (IARC Working Group **2005**. *loc. cit.*). Solo la infección persistente por tipos de alto riesgo del PVH puede causar cáncer (Schiffman M, *et al.* *Lancet*. 2007; 370:890-907). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha confirmado recientemente sus declaraciones sobre la carcinogenicidad de algunos tipos del PVH (Strait KA, *et al.*, on behalf of the WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol*. 2009; 10:321-322), e identificó 12 tipos de alto riesgo más un tipo sospechoso, mientras que otros 12 tipos tienen una relación dudosa con el tumor. Este importante avance en el conocimiento de la evolución natural de la enfermedad ha dado lugar rápidamente a la introducción de dos nuevas herramientas de prevención: la vacuna para evitar la infección en sí misma y la prueba para detectar ADN de cepas del PVH de alto riesgo oncogénico (prueba de ADN del PVH-AR para identificar a las mujeres que tienen, o corren el riesgo de desarrollar, lesiones invasoras o invasoras. La prueba

de determinación del ADN del PVH-AR ha demostrado ser más sensible que la citología en el cribado del cuello uterino (Arbyn J. *et al.* Vaccine. 2006; 24 Suppl 3: S3-78-89; Cuzick J. *et al.* Int J Cancer. 2006; 119:1095-1101).

5 Sin embargo, la transformación neoplásica es una complicación rara de la infección por el PVH de alto riesgo que, en la mayoría de los casos, es un acontecimiento transitorio. Además, se ha demostrado que las lesiones de bajo grado (NIC 1, que corresponden a LSIL de la prueba de Papanicoláu), que también están relacionadas con la infección por el PVH, no se pueden considerar verdaderas lesiones preinvasoras porque, en la gran mayoría de los casos, remiten espontáneamente (Schiffman M. *et al.* Lancet. 2007; 370:890-907). Por esta razón, por lo tanto, la prueba de determinación del ADN del PVH-AR tiene una especificidad baja (Cuzick J. *et al.* **2006**, *loc. cit.*).

15 Los ensayos controlados aleatorizados han demostrado la eficacia de las pruebas de determinación del ADN del PVH-AR para reducir tanto la mortalidad como la incidencia del cáncer de cuello uterino (Sankaranarayanan R. *et al.* N Engl J Med. 2009; 360:1385-94; Bulkman NW. *et al.* Lancet. 2007; 370:1764-7). Los resultados de estos estudios motivaron la construcción de grandes ensayos demostrativos en Italia, que usaron la prueba de determinación del ADN del PVH-AR como un ensayo de cribado primario, seguido de un examen citológico de los casos positivos (Confortini M. *et al.* J Med Screen. 2010; 17:79-86). Cabe señalar que no solo las lesiones CIN1 son regresivas, sino que también las CIN2 y CIN3 (que corresponden a HSIL en la prueba de Papanicoláu) a menudo remiten, especialmente en mujeres jóvenes Schiffman M. *et al.* **2007**, *loc. cit.*; Ronco G. *et al.* J Natl Cancer Inst, 2008; 100: 492-501).

25 El rasgo característico citado de los programas de cribado implica que cierto porcentaje de sobrediagnóstico se puede deber a la prueba de cribado en sí misma; sin embargo, el sobrediagnóstico inducido por el cribado citológico en intervalos de tres años se considera aceptable. El estudio italiano NTCC (Nuevas tecnologías para el cáncer de cuello uterino), iniciado en 2004, ha demostrado que la prueba de determinación del ADN del PVH-AR incrementa tanto el sobrediagnóstico como el sobretreatmento, en comparación con la citología en mujeres menores de 35 años, aunque se lleva a cabo un "triaje" citológico (es decir, un "estudio de diagnóstico" de los resultados positivos de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR) mediante la prueba de Papanicoláu (Ronco G. *et al.* **2008**, *loc. cit.*; Ronco G. *et al.* Lancet Oncol 2010 Jan18). Por otra parte, en mujeres mayores de 35 años se demostró que el sobrediagnóstico, si existe, es bajo incluso cuando no se adopta una citología como triaje.

35 El resultado anterior destaca además la necesidad de biomarcadores específicos de la CIN y el cáncer de alto grado, con los que se pretende detectar cambios moleculares estrechamente relacionados con la transformación más que con la simple detección de infecciones por el ADN del PVH-AR. La especificidad es aún más relevante cuando las cohortes de mujeres vacunadas contra el PVH se aproximen al cribado (Franco EL. *et al.* Vaccine. 2006; 24 Suppl 3:8171-7).

40 En la actualidad, los únicos biomarcadores listos para su uso son aquellos relacionados directa o indirectamente con la expresión de los genes víricos *E6* y *E7*, que regulan la replicación del PVH. Los genes *E6* y *E7* de genotipos de alto riesgo son conocidos como oncogenes y su regulación transcripcional alterada, que afecta a casi todas las vías celulares (Fehrmann F, Laimins LA. Oncogene. 2003; 22:5201-7) y promueve la inestabilidad del ADN, parece ser una etapa necesaria para la transformación de las células hacia una neoplasia maligna. La expresión de oncogenes del PVH y su impacto en la célula huésped se puede rastrear directamente, identificando transcritos de ARNm de *E6-E7* víricos (Lie AK, Kristensen G., Expert Rev Mol Diagn. 2008; 8:405-15), o indirectamente a través de la detección de la proteína celular p16 (Carozzi F. *et al.*, Lancet Oncol. 2008; 9:937-945; Benevolo M. *et al.* Am J Clin Pathol. 2008; 129:606-12). Esta última, como se sabe, es una proteína implicada en el control del ciclo celular, que está sobreexpresada en células del cuello uterino transformadas por el PVH. De hecho, como se informó ampliamente, la expresión de p16 está influenciada por la proteína *E7* del PVH-AR, y su regulación por incremento en el cuello uterino se relaciona significativamente con el incremento de la gravedad de las lesiones (Benevolo M. *et al.*, Mod Pathol. 2006 Mar;19(3):384-9).

55 Sin embargo, la evaluación inmunohistoquímica de p16 presenta actualmente una reproducibilidad limitada debido a la falta de criterios estándar para la interpretación de la inmunotinción (Tsoumpou I, *et al.*, p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis, Cancer Treat Rev. 2009; 35:210-20). Respecto a *E6-E7*, el ARNm del PVH podría ser un biomarcador prometedor para la identificación de infecciones por el ADN del PVH-AR clínicamente relevantes con una prueba totalmente *in vitro*. En realidad, se observó que el ARNm de *E6-E7* se incrementa con la gravedad de la afectación del cuello uterino (Sotlar K. *et al.*, J Med Virol. 2004; 74:107-16; Castle PE. *et al.*, Clin Cancer Res. 2007; 13:2599-605). Se ha informado de que ambos ensayos, el ARNm de p16 y de *E6-E7*, son un poco menos sensibles que el ADN del PVH-AR, pero mucho más específicos (Carozzi F. *et al.*, Lancet Oncol. 2008; 9:937-945; Szarewski A. *et al.*, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17:3033-4; Monsonego J. *et al.* EUROGIN 2010, Monaco. ES 4-4).

La línea de investigación mencionada anteriormente (detección de transcritos del ARNm vírico E6-E7) incluye, por ejemplo, las patentes europeas EP 1463839, EP 1718774 y EP 2267155 (Norchip A/S) y la patente estadounidense US 7524631 (Patterson).

5 Hasta ahora, sin embargo, no hay marcadores biológicos que indiquen la transformación irreversible de las lesiones precancerosas hacia el cáncer del cuello uterino (Koo YJ. *et al.*, Dual immunostaining of cervical cytology specimens with atypical squamous cells for p16/Ki-67 does not exclude the existence of a high-grade squamous intraepithelial lesion. *Virchows Arch.* 2013 Oct 1; Pacchiarotti A. *et al.*, Prognostic value of p16-INK4A protein in women with negative or CIN1 histology result: A follow-up study. *Int J Cancer.* 2014, 134, 897-904).

10 Wang P *et al.*, Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, vol. 14, n.º 2, 1 de junio de 2000, páginas 117-120 y Wang P *et al.*, Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, vol. 32, n.º 12, 1 de diciembre de 1997, páginas 722-724, divulgan procedimientos para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el virus del papiloma humano (PVH), que comprende detectar la presencia de un complejo de proteínas E7/pRB.

15 Sumario de la invención

En el marco de los estudios relacionados con la presente invención, se ha considerado la interacción de los dos oncogenes virales E6 y E7 con los genes oncosupresores p53 y pRB de la célula huésped. En realidad, se sabe que la proteína oncogénica E6 se une a la proteína oncoinhibidora p53 de la célula huésped, lo que induce la degradación de la misma y destruye la actividad de detención del crecimiento y activación de la apoptosis, que es típica de este oncoinhibidor. De forma similar, la proteína oncogénica E7 forma complejos con la proteína pRb de la célula huésped y la inactiva, anulando de este modo su actividad oncoinhibidora (Ishiji T., Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol* 2000, Feb; 27(2):73-86L; Buitrago-Pérez A. *et al.*, Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Curr Genomics.* 2009 Mar;10(1): 26-34; Shaikh F. *et al.*, Molecular screening of compounds to the predicted Protein-Protein Interaction site of Rb1-E7 with p53-E6 in HPV. *Bioinformation.* 2012; 8(13): 607-12).

30 Específicamente, la expresión de los genes E6 y E7 y la consiguiente producción de proteínas relacionadas serían la causa necesaria para desencadenar la oncogénesis inducida por el PVH, que se caracteriza por las interacciones entre las proteínas E6 y p53 y las proteínas E7 y pRb, respectivamente. E6 se une a p53 en el citoplasma y también recluta a la ubiquitina ligasa E6AP, lo que hace que p53 sea una diana para la degradación del proteasoma. De forma similar, E7 se une a pRb en el citoplasma y recluta a la ubiquitina ligasa Cullin2, que a su vez promueve la degradación por el proteasoma.

35 De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que es posible identificar mediante exámenes relativamente simples el momento mismo de la carcinogénesis, identificando la presencia de aquellas proteínas que, derivándose de la interacción de los oncogenes víricos E6 y E7 con los genes oncoinhibidores p53 y pRB de la célula huésped, representan un índice de transformación neoplásica irreversible. Para poder cumplir su función en la selección de casos en los que ha tenido lugar la transformación neoplásica en comparación con aquellos en los que, a pesar de la aparición de lesiones también de alto grado, el proceso de carcinogénesis todavía sería reversible, los exámenes propuestos de acuerdo con la invención se deberían insertar en el procedimiento de diagnóstico de los programas de cribado o diagnóstico precoz del cáncer de cuello uterino después de un resultado positivo de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR y/o un diagnóstico citológico de atipia de las células escamosas (ASC) o peor. Preferentemente, la prueba propuesta se debería realizar después de la ejecución de la prueba tanto de determinación del ADN del PVH-AR como de Papanicoláu con resultados positivos.

50 El procedimiento propuesto de acuerdo con la invención innova el control clínico de las mujeres que han tenido un diagnóstico de lesiones displásicas de alto grado del cuello uterino relacionadas con la infección por el PVH. Esencialmente, consiste en analizar con tecnologías específicas las proteínas codificadas por los oncogenes víricos (E6 y E7) y las codificadas por los genes oncoinhibidores de la célula huésped (p53 y pRb), categorizándolas y midiéndolas de acuerdo con las fases de integración y/o interacción del genoma del virus en el huésped. Como se señala, la especificidad del procedimiento propuesto es definir el estado de irreversibilidad de la transformación cancerosa debido a la interacción de proteínas víricas con proteínas humanas.

El procedimiento de la presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

60 En la implementación del procedimiento propuesto de acuerdo con la invención, la búsqueda de proteínas derivadas de la interacción de E6 con p53 (específicamente, el complejo de proteínas E6/p53) y de la interacción de E7 con pRb (específicamente, el complejo de proteínas E7/pRB) se puede realizar mediante cualquier técnica analítica que permita identificar, de manera simple pero fiable, la formación de uno o ambos de los complejos de proteínas mencionados en una muestra de células tomadas de la unión pavimentoso-cilíndrica del cuello uterino de una paciente sometida a examen. Más específicamente, la técnica analítica adoptada debería poder detectar en la muestra la presencia de la proteína E6 o la proteína E7 conjuntamente con la presencia de un complejo de proteínas mayor que contiene, respectivamente, la proteína E6 o la proteína E7 en unión con la proteína p53 o la

proteína pRB. En la práctica, las dos técnicas que son adecuadas para lograr de la mejor manera dicho objetivo son: A) el procedimiento analítico de inmunoelectrotransferencia y B) el ensayo de inmunoadsorción enzimática de tipo sándwich (ELISA de tipo sándwich).

5 A) Inmunoelectrotransferencia: se lleva a cabo la obtención de una muestra nueva del cuello uterino y la muestra se almacena en solución salina isotónica a 4 °-8 °C. Esta última se somete a un análisis de acuerdo con el procedimiento bioquímico conocido como inmunoelectrotransferencia. Este procedimiento se usa para
10 identificar una proteína en una muestra dada de homogeneizado de tejido o extracto celular. Prevé la centrifugación de la muestra con la separación del sobrenadante y, por tanto, la separación de proteínas, previamente desnaturalizadas por calor, en función de su masa molecular, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). A continuación, las proteínas se transfieren del gel a una membrana, típicamente de nitrocelulosa, donde son reconocidas y unidas por anticuerpos específicos.

15 B) ELISA de tipo sándwich: se lleva a cabo la obtención de una muestra nueva del cuello uterino en fase líquida (ThinPrep - Hologic, Inc., Marlborough, MA, o SurePath - BD Diagnostics, Burlington, NC), si no se realizó ya para las pruebas anteriores, en cuyo caso se usa la muestra residual. La muestra se analiza mediante el inmunoensayo enzimático ELISA de tipo sándwich. Este es un procedimiento de análisis inmunológico usado en bioquímica para detectar la presencia de una sustancia por medio de uno o más
20 anticuerpos, a uno de los cuales se une una enzima: dependiendo de la detección de la proteína de interés, el procedimiento implica la transferencia directa de la muestra del cuello uterino en la placa de reacción, debidamente preparada con anticuerpos específicos anti-proteína E6 y anti-proteína E7, y sometida a prueba posteriormente por otros anticuerpos específicos anti-proteína p53 y anti-proteína pRb para la detección de la interacción de los complejos de proteínas de interés.

25 Los procedimientos de inmunoelectrotransferencia y ELISA de tipo sándwich se llevan a cabo, de acuerdo con la presente invención, usando anticuerpos monoclonales específicos - anticuerpos anti-proteína E6 y anti-proteína E7 de cepas del PVH de alto riesgo oncogénico, anticuerpos anti-proteína p53, anticuerpos anti-proteína pRb - disponibles comercialmente. Estos procedimientos permitieron no solo identificar la presencia de las cuatro
30 proteínas de interés, sino también detectar el posible estado de interacción entre E6 y p53 (E6/p53) y entre E7 y pRb (E7/pRB), que representa el punto de irreversibilidad de la transformación de lesiones precancerosas hacia el carcinoma de cuello uterino.

35 La búsqueda de estas proteínas en mujeres que han tenido un diagnóstico de atipia citológica de las células escamosas (ASC) o peor, propuesta de acuerdo con la invención, permite aumentar la exactitud diagnóstica de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR y la prueba de Papanicoláu de triaje, incrementando la sensibilidad y especificidad generales del cribado. En particular, la introducción de esta búsqueda incrementará el VPP del cribado (valor predictivo positivo, que es la proporción de los sujetos positivos verdaderos y el total de todos los sujetos positivos, tanto verdaderos como falsos), y para reducir entonces el sobrediagnóstico y el
40 sobretratamiento.

Descripción detallada de la invención

45 De acuerdo con su modo de realización más amplio, por lo tanto, la presente invención proporciona específicamente un procedimiento para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) en mujeres que se someten a un cribado para el carcinoma de cuello uterino, que comprende detectar, en muestras de células tomadas de la unión pavimentoso-cilíndrica del epitelio del cuello uterino de una paciente a la que se está examinando, la presencia de un complejo de proteínas E6/p53 producido por la proteína E6 con la proteína p53 y/o un complejo de proteínas E7/pRb producido por la proteína
50 E7 con la proteína pRb, en el que la detección de al menos uno de dichos dos complejos de proteínas muestra que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible, realizándose dicha detección mediante el uso combinado de anticuerpos anti-proteína E6 y anticuerpos anti-proteína E7 y de anticuerpos anti-proteína p53 y anticuerpos anti-proteína pRb, preferentemente en técnicas analíticas de inmunoelectrotransferencia o ELISA de tipo sándwich.

55 De acuerdo con la técnica convencional, el procedimiento A) que usa inmunoelectrotransferencia para la detección de interacciones E6/E7 y p53/pRB consiste en las siguientes etapas: (a) preparación de la muestra (por ejemplo, homogeneización/extracción, centrifugación y ebullición para la desnaturalización de las proteínas en tampón de muestra); (b) electroforesis en gel; (c) transferir a la membrana; (d) bloqueo de sitios no
60 específicos de la membrana, normalmente con albúmina bovina (BSA) o leche; (e) identificación de la proteína buscada por incubación con anticuerpos (uno primario y otro que reconoce el antígeno al que sigue el secundario, conjugado con un sistema de detección, que reconoce el primario); (f) detectar el antígeno-anticuerpo de unión normalmente por reacción colorimétrica o quimioluminiscencia.

65 Por lo tanto, la presente invención proporciona además específicamente un procedimiento para la detección de una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) en mujeres sometidas a

cribado para carcinoma de cuello uterino, que comprende las siguientes operaciones de acuerdo con la técnica de inmunoelectrotransferencia:

- 5 a) preparar una muestra de células tomadas de la unión pavimentoso-cilíndrica del epitelio del cuello uterino de una paciente a la que se está examinando y colocarla en una solución fisiológica;
- b) extraer proteínas de dicha muestra y desnaturalizar las proteínas obtenidas;
- 10 c) someter las proteínas así desnaturalizadas obtenidas a electroforesis en gel de poliacrilamida;
- d) transferir las proteínas obtenidas de la operación anterior sobre una membrana y neutralizar los sitios libres de dicha membrana;
- 15 e) identificar dichas proteínas incubándolas con al menos los siguientes anticuerpos:
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6;
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E7;
 - 20 anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53; y
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb;
 - y, a continuación, incubar con anticuerpos anti-IgG secundarios conjugados con biotina o con una enzima mensajera tal como fosfatasa alcalina;
 - 25 f) someter los productos de la operación anterior a detección colorimétrica o a detección por quimioluminiscencia;

30 en el que los resultados de dicha detección muestran una doble banda de reacción para al menos una de las proteínas E6 (peso molecular 18 kDa) y E7 (peso molecular 16 kDa), comprendiendo dicha doble banda una primera banda correspondiente al peso molecular de la proteína buscada, es decir, E6 o E7, y una segunda banda correspondiente a un peso molecular distinto y más alto que el peso molecular de la proteína respectiva de la primera banda, siendo dicho peso molecular sustancialmente igual a 71 kD para el complejo de proteínas E6/p53 y a 115,5 kD para el complejo de proteínas E7/pRb, indican que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible; y/o en el que los resultados de dicha detección muestran una doble banda de reacción para al menos una de las proteínas p53 y pRb, comprendiendo dicha doble banda una primera banda correspondiente al peso molecular de la proteína buscada, p53 o pRb, y una segunda banda correspondiente a un peso molecular distinto y más alto que el peso molecular de la proteína respectiva de la primera banda, indican que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible. Los pesos moleculares correspondientes a la segunda banda, que es evidente en estos casos, son sustancialmente iguales a la suma de los pesos moleculares de p53 y E6, o E7 y pRb, indicando de este modo una verdadera interacción entre las dos proteínas del par.

45 Preferentemente, de acuerdo con la invención, los resultados de dicha detección de acuerdo con la etapa f) que muestran una doble banda de reacción, como se describe anteriormente, tanto para la proteína E6 como para la proteína E7, se consideran, con mayor seguridad, indicativos de una carcinogénesis ya establecida. De acuerdo con un modo de realización preferente de la invención, en la fase e) las proteínas citadas previamente también se incuban con los siguientes anticuerpos:

50 Como se señala, las interacciones entre las proteínas E6 y p53 y entre las proteínas E7 y pRb causan, de hecho, la degradación tanto de p53 como de pRb. Teniendo en cuenta que p53 provoca la detención del ciclo celular en la fase G1, o desencadena los mecanismos de apoptosis, lo que permite la inhibición de clones de células tumorales y garantiza la estabilidad genómica, y que pRb es una proteína con actividad inhibidora del crecimiento celular, entiende cómo la interacción entre E6 y p53 y E7 y pRb y la posterior degradación produce de hecho la supresión de la función reguladora normal de los dos genes, lo que probablemente actúe como un desencadenante de la transformación neoplásica de la célula.

60 De acuerdo con el procedimiento de la invención, los resultados de dicha detección que muestran una única banda de reacción para ambas proteínas E6 y E7 (donde la banda única corresponde al peso molecular de la proteína buscada, E6 o E7) indican que en la paciente sometido a examen la carcinogénesis no ha comenzado o aún no se ha vuelto irreversible. De acuerdo con el mismo criterio, si los resultados de la detección no muestran ninguna banda de reacción para las proteínas E6 y E7, los resultados indican que en la paciente examinada no se ha producido integración del ADN vírico con el ADN celular.

65

Preferentemente, de acuerdo con la invención, los anticuerpos secundarios anti-IgG de dicha etapa e) se conjugan con fosfatasa alcalina, y la detección de la etapa f) es una detección colorimétrica o quimioluminiscente. Además, de acuerdo con los modos de realización preferentes de la invención, los anticuerpos monoclonales primarios anti-proteína E6 y anti-proteína E7 mencionados anteriormente son anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra la proteína E6, o la proteína E7, del tipo vírico PVH16 y PVH18.

También de acuerdo con los modos de realización preferentes de la invención, el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína p53 humana y el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína pRb humana.

Como se señala anteriormente, el procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención se inserta preferentemente como parte de un cribado de una población de mujeres para el carcinoma de cuello uterino, después de un resultado positivo de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR y/o después de un diagnóstico citológico de atipia de células escamosas (ASC) o peor.

De acuerdo con un modo de realización específico del procedimiento de la invención, el análisis propuesto proporciona un proceso de retirada de células epiteliales de la unión pavimento-cilíndrica del cuello uterino, preferentemente por medio de una herramienta conocida como "cepillo endocervical" (una punta de cepillo desechable para la toma de células endocervicales para examen citológico, que tiene cerdas dispuestas radialmente helicoides alrededor de su propio eje y una longitud que se inclina en pendiente hacia el extremo, para tener una conformación general cónica). La muestra obtenida de este modo se almacena en una solución fisiológica (1 ml) a 4 °C; y se lleva a cabo la extracción de las proteínas de interés y el análisis con tecnología de inmunoelectrotransferencia.

El sedimento celular obtenido por la centrifugación de la muestra se lava dos veces con cloruro de sodio al 0,9 % en peso. Después de la centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, se recogen las células en tampón de lisis y, después de la adición de inhibidores de la proteasa, se dejan en agitación durante 30 minutos a 4 °C. El lisado se centrifuga a continuación durante 20 minutos a 14 000 rpm a 4 °C para extraer las proteínas del sobrenadante. Las proteínas obtenidas de este modo se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) después de la desnaturalización por calor (95 °C durante 5 minutos) en un tampón específico. Las proteínas se transfieren a una membrana Poly Screen (DuPont NEN).

El gel recuperado y la membrana se sumergen durante 15 minutos en dos bandejas separadas que contienen el tampón de transferencia, preparando el sándwich mediante la colocación de los componentes en secuencia. Para este objetivo, se puede usar el sistema Semi-Dry-Electroblotter de aicos-Dinamarca. Como confirmación de la transferencia, la membrana se colorea preferentemente con rojo Ponceau en una platillo sobre una placa de agitación durante 5 minutos, lavándola con agua desionizada.

De nuevo, de acuerdo con el modo de realización específico mencionado anteriormente, se lleva a cabo la neutralización de los sitios libres de la membrana y el análisis posterior de las proteínas de interés. La membrana preparada con un tampón de lavado que contiene 2 % de leche se analiza para detectar la presencia de proteínas usando los siguientes anticuerpos primarios monoclonales durante 90 minutos mediante agitación continua:

- para la proteína E6, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína E6 (*anticuerpo PVH16 E6 + PVH18 E6 [C1P5], Abcam*);
- para la proteína E7, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína E7 (*anticuerpo PVH16-E7 [n.º 28-0006], Invitrogen Corporation*);
- para la proteína p53, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína p53 (*anticuerpo anti-p53 [n.º AH00112], Invitrogen Corporation*); y
- para la proteína pRb, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína Rb (*anticuerpo anti-Rb humana [n.º 554162], BD Biosciences*).

Se lleva a cabo la incubación de anticuerpos secundarios de ratón anti-IgG; a continuación, se lleva a cabo el lavado y el desarrollo de las reacciones por fosfatasa, para detectar la presencia de las oncoproteínas víricas E6 y E7 y su posible interacción, respectivamente, con las proteínas p53 y pRb, interpretando los resultados como se ilustra.

De acuerdo con la técnica convencional, el procedimiento B), que utiliza el ELISA de tipo sándwich para la detección de las interacciones E6/E7 y p53/pRB, siguiendo los conceptos científicos relacionados con la invención ya establecidos para el procedimiento A) de inmunoelectrotransferencia consiste en las siguientes

fases: (a) identificar la muestra almacenada de acuerdo con el procedimiento de fase líquida (LBC) en uso; (B) adsorber en diferentes pocillos de una placa de microvaloración que captura anticuerpos contra las proteínas E6 o E7; (C) bloquear los sitios restantes del pocillo que se unen a las proteínas mediante tampón de bloqueo; (D) dispensar la muestra directamente desde el transporte de LBC en cada pocillo; (E) identificar las proteínas de interés mediante incubación con el anticuerpo diluido anti-proteína p53 en los pocillos adsorbidos con el anticuerpo anti-proteína E6 y el anticuerpo diluido anti-proteína pRb en los pocillos adsorbidos con el anticuerpo anti-proteína E7; (F) bloquear el sustrato endógeno con una solución de H₂O al 0,3 % en metanol; (G) incubar en sus respectivos pocillos el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP); (H) dispensar la solución de cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) en cada pocillo; (I) proceder a la lectura de los resultados mediante la cuantificación del color azulado con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Para validar la prueba, las operaciones anteriores se realizan en dos pocillos separados que difieren según el tipo de anticuerpo primario que se introduce inicialmente: un pocillo se llena con un anticuerpo específico contra la proteína (E6 o E7) que se tiene que identificar, mientras que el otro está saturado con un anticuerpo no específico.

Para que la prueba se considere válida, en primer lugar debe tener un resultado negativo en el segundo pocillo y, en caso de que la muestra biológica sometida a prueba realmente contenga el anticuerpo de interés, la prueba debería ser positiva en el otro pocillo, el saturado con el anticuerpo primario específico contra la proteína de interés.

Por lo tanto, la presente invención se refiere específicamente a un procedimiento para la detección de una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) en mujeres que se someten a cribado para el carcinoma de cuello uterino, que comprende las siguientes operaciones de acuerdo con la técnica ELISA de tipo sándwich:

- a) identificar una muestra de células extraída de la unión pavimentoso-cilíndrica del cuello uterino de una mujer sometida a examen, almacenada en solución de acuerdo con el procedimiento de citología en fase líquida (LBC) en uso;
- b) adsorber, en diferentes pocillos de la microplaca en PVC, los anticuerpos de captura contra las proteínas E6 y E7, mediante incubación a 4 °C durante la noche y lavándolos a continuación con PBS (solución salina tamponada con fosfato);
- c) bloquear los sitios restantes del pocillo que unen las proteínas mediante un tampón de bloqueo que contiene leche seca sin grasa en PBS, incubando al menos 1-2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C;
- d) dispensar 100 microlitros de muestra del frasco de citología en fase líquida directamente en cada pocillo, incubar a 37 °C durante 90 minutos y retirar mediante un lavado adicional en PBS;
- e) identificar las proteínas de interés mediante incubación con 100 microlitros de anticuerpo diluido anti-proteína p53 en los pocillos adsorbidos con anticuerpo anti-proteína E6 y 100 microlitros de anticuerpo diluido anti-proteína pRb en los pocillos adsorbidos con anticuerpo anti-proteína E7, a temperatura ambiente durante 1-2 horas, y retirar con lavado repetido adicional en PBS;
- f) bloquear el sustrato endógeno por incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos con una solución al 0,3 % de H₂O₂ en metanol;
- g) incubar en los pocillos respectivos 100 microlitros de una solución que contiene el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP);
- h) dispensar una solución de cromógeno TMB en cada pocillo, durante 20 minutos (reacción enzimática: H₂O₂ + sustrato reducido 2 H₂O + sustrato oxidado) y bloquear la reacción por adición de una solución 2 M de H₂O₂;
- i) someter el producto de reacción de la etapa h) a la lectura de la intensidad de luz detectada a una longitud de onda de 450 nm, mediante espectrofotómetro,

en el que los resultados que muestran la tinción producida, documentados por una absorbancia positiva, indican que en la paciente sometida a examen están presentes complejos de proteínas E6/p53 y/o E7/pRB, lo que confirma la interacción entre las proteínas víricas y las humanas y, por lo tanto, la presencia de carcinogénesis irreversible.

El control de la prueba se valida en dos pocillos separados que difieren según el tipo de anticuerpo primario introducido inicialmente: uno se llena con un anticuerpo específico contra la proteína (E6 o E7) que desea

buscar, mientras que el otro está saturado el otro con un anticuerpo no específico. La prueba se considera válida si es negativa en la última vitrina y positiva en la vitrina que está saturada con el anticuerpo primario específico contra la proteína de interés.

5 De acuerdo con el procedimiento de la invención, para las etapas e), f), g) y h) es posible usar otros sistemas disponibles en el mercado que permitan amplificar la señal cromogénica (por ejemplo, usando anticuerpos anti-proteína p53 o pRb biotinilados y marcados con estreptavidina conjugada con peroxidasa u otra enzima).

10 Preferentemente, de acuerdo con la invención, los resultados que, con mayor seguridad, se consideran indicativos de una carcinogénesis ya establecida, son los resultados de dicha detección de acuerdo con la etapa i) que muestran unos valores de absorbancia detectados tanto para el complejo E6/p53 como para el complejo E7/pRb.

15 De acuerdo con el procedimiento de la invención, los resultados de esta detección que muestran una reacción positiva para ambos complejos de proteínas (E6/p53 y E7/pRb) indican que en la paciente examinada la carcinogénesis ya ha comenzado y se vuelve irreversible. De acuerdo con el mismo criterio, en caso de que los resultados de detección no muestren ninguna positividad de la reacción (es decir, ausencia de señal de absorbancia) para ninguno de los dos complejos de proteínas (E6/p53 y E7/pRb), el resultado indica que en la paciente examinada no se ha producido la interacción del ADN vírico con el ADN celular; sin descartarse la posibilidad de estar en presencia de una integración de ADN vírico con el ADN celular no diagnosticable con este procedimiento.

20 Preferentemente, de acuerdo con la invención, los anticuerpos de dicha etapa e) se evidencian por reacción con un anticuerpo específico conjugado con peroxidasa de rábano picante y la detección de las fases f), g) y h) es una detección del tipo colorimétrico. Además, de acuerdo con los modos de realización preferentes de la invención, los anticuerpos monoclonales primarios anti-proteína E6 y anti-proteína E7 mencionados anteriormente son anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra la proteína E6, o la proteína E7, de los tipos víricos PVH16 y PVH18.

30 También de acuerdo con los modos de realización preferentes, el anticuerpo monoclonal primario anti-p53 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína p53 humana y el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína pRb humana.

35 Como se señala anteriormente, el procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención se inserta preferentemente como parte de un cribado de una población de mujeres para el carcinoma de cuello uterino, después de un resultado positivo de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR y/o después de un diagnóstico citológico de células escamosas atípicas (ASC) o peor.

40 De acuerdo con un modo de realización específico del procedimiento de la invención, el análisis propuesto proporciona un proceso de retirada de células epiteliales de la unión pavimentoso-cilíndrica del cuello uterino, preferentemente por medio de una herramienta conocida como "cepillo endocervical". La muestra obtenida de este modo se conserva en una solución para citología en fase líquida y, a continuación, se lleva a cabo el análisis de las proteínas de interés con la tecnología ELISA de tipo sándwich.

45 Todavía de acuerdo con el modo de realización específico mencionado anteriormente, las células contenidas en la muestra para citología en fase líquida se analizan directamente, sin proceder a la extracción de proteínas, mediante una reacción de anticuerpos de tipo sándwich: un anticuerpo vírico anti-proteína (E6 o E7) adsorbido en la placa, complejo de proteínas de interés (E6/E7 o p53/pRb) presente en la muestra, un anticuerpo anti-proteína (p53 o pRb) humana. El procedimiento garantiza la especificidad de unión absoluta y documenta la presencia de los complejos de proteínas E6/p53 y E7/pRb mediante el uso de los siguientes anticuerpos monoclonales primarios:

- 50 • para la proteína E6, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína E6 (*anticuerpo PVH16 E6 + PVH18 E6 [C1P5], Abcam*);
- 55 • para la proteína E7, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína E7 (*anticuerpo PVH16-E7 [n.º 28-0006], Invitrogen Corporation*);
- para la proteína p53, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína p53 (*anticuerpo anti-p53 [n.º AH00112], Invitrogen Corporation*); y
- 60 • para la proteína pRb, anticuerpo monoclonal primario de ratón anti-proteína Rb (*anticuerpo anti-Rb humana [n.º 554162], BD Biosciences*).

65 La incubación posterior con anticuerpos de ratón anti-IgG conjugados con peroxidasa y el desarrollo de la reacción colorimétrica documentada por la lectura espectrofotométrica confirman la positividad de la investigación del complejo de proteínas de interés interpretando los resultados como ya se ha ilustrado.

La presente invención proporciona además específicamente, más en general, un modelo de procedimiento de diagnóstico para la detección de cualquier transformación de células neoplásicas inducida por la interacción de cualquier proteína con acción oncogénica (por ejemplo: BRAF, KRAS, NRAS, HER2, etc.) con otra proteína unida a acción oncoinhibidora (por ejemplo, P53, pRb, PTEN, BRCA, CD95, etc.) que se encuentran en los diversos órganos y sistemas del organismo.

En particular, estas proteínas con acción oncogénica o actividad oncoinhibidora se identifican con anticuerpos monoclonales específicos y su interacción se demuestra mediante las tecnologías de inmunoelectrotransferencia y/o ELISA de tipo sándwich. Preferentemente, de acuerdo con los procedimientos propuestos, el complejo de proteínas que ha interactuado (proteína oncogénica/proteína oncoinhibidora) también se identifica directamente con un anticuerpo monoclonal específico.

En conjunto, por lo tanto, la invención permite proponer un procedimiento válido para la detección de cualquier transformación de células neoplásicas inducida por la interacción de cualquier proteína con actividad oncogénica con otra proteína unida a actividad oncoinhibidora, de acuerdo con lo descrito anteriormente en el presente documento, en el que el procedimiento también se inserta como parte de un programa de diagnóstico y/o tratamiento terapéutico de pacientes oncológicos, o pacientes con sospecha de cáncer, que usan tratamientos dirigidos que inhiben dicha interacción de proteínas.

Breve descripción de los dibujos

Los rasgos característicos específicos de la invención, así como las ventajas de la misma, se harán más evidentes al referirse a la descripción del trabajo experimental del que se informa a continuación con propósitos meramente ilustrativos y a las figuras relacionadas, en las que:

La **figura 1** muestra un histograma con el diagnóstico citológico de 78 casos seleccionados como positivos de una población de 2500 mujeres que se someten a cribado con una prueba de Papanicoláu.

La **figura 2** muestra un histograma con los resultados de la aplicación del procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la presente invención a los 78 casos seleccionados como positivos a la prueba de Papanicoláu de la figura 1;

Las **figuras 3-6** muestran los resultados de inmunoelectrotransferencia de un caso seleccionado de los resultados del procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención en el que están presentes las proteínas E6 y E7, y en el que también están presentes las interacciones E6/p53 y E7/pRb;

La **figura 7** es un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente las indicaciones propuestas para el control de mujeres con una prueba de Papanicoláu positiva y una prueba de determinación del ADN del PVH-AR positiva para la aplicación del procedimiento de diagnóstico de la invención; y

La **figura 8** es un diagrama de flujo que ilustra esquemáticamente la aplicación del procedimiento ELISA de tipo sándwich al procedimiento de diagnóstico de la invención.

Prueba de cribado en una población de mujeres no seleccionadas que se someten a la prueba de Papanicoláu como examen primario

En el contexto de la presente invención, se llevó a cabo un estudio con el objetivo de identificar a mujeres con lesiones clínicamente relevantes que habían desarrollado lesiones displásicas de alto grado o cáncer de cuello uterino. El estudio se realizó en 2500 muestras de cuello uterino de mujeres, no seleccionadas, que se produjeron de forma espontánea en los centros de consulta ambulatoria de salud de Caserta Local Health Board ASL. La investigación se llevó a cabo en el período de junio a septiembre de 2012 e incluyó información para mujeres y la obtención de un consentimiento informado. En esta población se realizaron pruebas de Papanicoláu convencionales y las pruebas se analizaron en el Laboratorio de citopatología de Caserta ASL.

De las 2500 mujeres del estudio, a un total de 78, es decir, el 3,12 %, se les diagnosticó como no negativas, es decir, ASC + (atipia de células escamosas o peor) en la prueba de Papanicoláu. Como también se muestra en el diagrama de la Fig. 1 adjunta, los diagnósticos citológicos ASC+ se dividieron de la siguiente manera: 32 casos fueron con citología ASC-US (41 %), 42 casos fueron LSIL (54 %) y 4 casos HSIL (5 %).

El 96,88% de los casos fueron negativos para lesiones intraepiteliales escamosas o cancerosas que terminaron en las categorías de cambios inflamatorios normales o benignos, a veces marcados por la presencia de microorganismos (bacterias, hongos o *Trichomonas vaginalis*).

Se recordó que 78 mujeres con diagnóstico positivo se sometieron a un examen adicional de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, mediante una segunda muestra para estudiar la integración/interacción de las proteínas E6/p53 y E7/pRb.

5 La muestra se ha extraído y analizado de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para el modo de realización específico del procedimiento de acuerdo con la invención, en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Marcanise.

10 Los datos obtenidos mediante el análisis de inmunoelectrotransferencia de las 78 muestras positivas en la prueba de Papanicoláu se muestran en la **figura 2** adjunta. El histograma muestra en primer lugar que, de las 32 muestras con diagnóstico citológico de ASC-US, solo 2 (6,3 %) fueron positivas para la presencia de mientras que en las otras 30 (93,7 %) no se encontraron proteínas E6 y E7.

15 Por otra parte, en todas las muestras con diagnóstico citológico de LSIL (42) y HSIL (4) se ha demostrado la presencia de proteínas E6 y E7. Por lo tanto, en total, de los 78 casos que han tenido un diagnóstico no negativo con pruebas de Papanicoláu, solo 48 fueron positivos para la presencia de las proteínas E6 y E7 de acuerdo con el procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la invención.

20 A partir de la observación de los datos, está claro que en la mayoría de los casos de ASC-US (93,7 %) no se produjo integración del genoma vírico y, como resultado, puede significar:

- 25
- 1) *PVH ausente: las anomalías citológicas encontradas son solo de naturaleza inflamatoria;*
 - 2) *PVH de bajo riesgo presente: normalmente no es capaz de integrarse en el genoma, pero está limitado a la forma episomal;*
 - 3) *presencia de PVH de alto riesgo: todavía se encuentra en un estadio incipiente con una infección muy reciente y falta de integración.*

30 Para todos los casos con diagnósticos citológicos de LSIL y HSIL, se identificaron las proteínas E6 y E7, y, por lo tanto, se puede afirmar que estas muestras tienen un PVH de alto riesgo y, ciertamente, la infección no es reciente, ya que ya tenía la integración del genoma vírico.

35 Teniendo en cuenta los 48 casos positivos con la presencia de las proteínas E6 y E7, también como se muestra en la **figura 2**, el procedimiento de diagnóstico de la presente invención permite observar que las interacciones E6/p53 y E7/pRb están presentes en el 4,8 % de los casos de LSIL y en el 75,0 % de los casos de HSIL, estando ausentes en ASC-US que muestra la presencia de proteínas E6 y E7.

Los resultados mostrados en el histograma de la **figura 2** también se resumen en la siguiente tabla.

TABLA 1

Correlación del diagnóstico citológico e histológico de los casos sometidos a prueba con inmunoelectrotransferencia para la integración/interacción de las proteínas E6/p53 y E7/pRb.					
Diagnostico citológico	Presencia de proteínas E6 y E7	Sin interacción E6/p53 y E7/pRb	Presencia de interacción E6/p53 y E7/pRb		
				Histología	
ASC-US	2	2 (100,0 %)	2 NIC1-2	0	
LSIL	42	40 (95,2 %)	37 NIC1	2 (4,8 %)	1-NIC2
			3 NIC2		1 NIC3
HSIL	4	1 (25,0 %)	1 NIC3	3 (75,0 %)	2 NIC3
					1 CA. SQ. INV.
TOTAL	48	43 (89,6 %)	37 NIC1	5 (10,4 %)	1 CA. SQ. INV.
			2 NIC1-2		3 NIC3
			3 NIC2		1 NIC2
			1 NIC3		

40 Los datos mostrados anteriormente demuestran que un 48,8 % de LSIL y un 75,0 % de HSIL tienen la interacción de E6/p53 y E7/pRb, lo que permite asumir que el proceso de carcinogénesis se encuentra en una fase avanzada; para los casos restantes de LSIL y HSIL sin interacción, se puede suponer que el proceso de carcinogénesis todavía se encuentra en las primeras fases y que aún es posible la remisión.

45

Los ejemplos más significativos del tipo de resultados obtenidos por inmunoelectrotransferencia en el estudio del que se informa en el presente documento se muestran en las **figuras 3, 4, 5 y 6** adjuntas, que muestran los resultados del análisis por inmunoelectrotransferencia obtenido de muestras donde, además de E6 y E7, también se descubrió interacción con p53 y pRb.

La observación de las **figuras 3 y 4**, respectivamente, en relación con los resultados de la inmunoelectrotransferencia con anticuerpos monoclonales primarios anti-E6 y anti-E7, muestra una doble tira de reacción, para cada muestra, 18 Kd y 71 Kd para anti-proteína E6, 16 Kd y 115,5 Kd para anti-proteína E7. La existencia de tiras adicionales de peso molecular mucho más alto que las de E6 y E7 demuestra, de acuerdo con la presente invención, la presencia de una interacción entre E6 y p53 y entre E7 y pRb.

Dicha hipótesis se ha confirmado por dos análisis adicionales de inmunoelectrotransferencia con anticuerpos monoclonales primarios, respectivamente, anti-proteína p53 y anti-pRb. En las **figuras 5 y 6** se muestran los resultados obtenidos que confirman dicha hipótesis, ya que las tiras reactivas coinciden exactamente con las dos tiras adicionales observadas anteriormente.

Para muestras con las proteínas E6 y E7 pero sin interacción E6/p53 y E7/pRb, la inmunoelectrotransferencia con el anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6 y anti-proteína E7 han mostrado, para cada muestra, una tira reactiva única de 18 Kd, respectivamente, para el anticuerpo anti-proteína E6 y de 16 Kd para anti-proteína E7.

Para las muestras, sin embargo, que fueron negativas para la presencia de proteínas E6 y E7, la inmunoelectrotransferencia con anticuerpo monoclonal primario tanto anti-proteína E6 como anti-proteína E7 no mostraron una tira de reacción, evidencia de que en estas muestras no ha habido integración del ADN vírico en la célula.

De acuerdo con los resultados obtenidos, está claro que todas las HSIL y la mayoría de las LSIL estudiadas presentan la integración del genoma vírico con la producción de proteínas E6 y E7. Sin embargo, un 75,0 % de las lesiones de alto grado y solo pocas lesiones de bajo grado (4,8 %) mostraron la interacción de las proteínas E6/p53 y E7/pRb. Estos datos confirman que la interacción es un marcador de carcinogénesis.

Por lo tanto, la técnica de inmunoelectrotransferencia para evaluar la presencia de proteínas E6 y E7 y su posible interacción (E6/p53 y E7/pRb) demuestra una mayor especificidad tanto de la prueba de determinación del ADN del PVH como de la citología, lo que permite identificar pacientes con lesiones clínicamente relevantes (NIC2+). El seguimiento histológico de LSIL y HSIL ha confirmado esta hipótesis. En particular (véase la Tabla 1), de las cuatro HSIL que tuvieron interacción de proteínas E6/p53 y E7/pRb, dos fueron NIC3 (displasia grave - carcinoma *in situ*) (50,0 %) y un carcinoma de células escamosas invasor (25,0 %), el cuarto caso sin interacción fue diagnosticado como NIC 3. También las dos LSIL (4,8 %) con interacción de las proteínas E6/p53 y E7/pRb son resultado uno de NIC2 (displasia moderada) (50,0 %) y el otro de NIC3 (50,0 %). Las 40 LSIL (95,2 %) sin interacción fueron 37 NIC1 (displasia leve) (88,1 %) y 3 NIC2 (7,1 %).

Esta información confirma que existe una relación entre las interacciones de las proteínas y la carcinogénesis, incluso todavía hay que entender cuáles son las bases biológicas de la integración con esas interacciones y, por lo tanto, con la transformación carcinomatosa. Básicamente, solo pocas lesiones integradas que expresan la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 progresan hacia una carcinogénesis completa. Esto sugiere la hipótesis de que existe un límite cuantitativo de proteínas víricas a lo largo del cual se desarrolla su interacción. Otros estudios podrán confirmar esta hipótesis de acuerdo con los estudios de caso más representativos.

Considerando la evaluación mencionada anteriormente como fundamental, de acuerdo con el procedimiento de la invención, proponemos la inmunoelectrotransferencia o el ELISA de tipo sándwich para llevar a cabo la *prueba de integración/interacción de las proteínas E6/p53 y E7/pRb* en el algoritmo diagnóstico después de la prueba positiva de determinación del ADN del PVH-AR y la positividad de la prueba de Papanicoláu para lesiones ASC+, en particular de acuerdo con las indicaciones esquemáticas en el diagrama de la **figura 7**.

Usando esta estrategia de diagnóstico, es posible incrementar la especificidad del diagnóstico citológico (ASC+) y molecular (prueba positiva de determinación del ADN del PVH-AR) en el cribado de cuello uterino, reservando a las mujeres para el segundo nivel de investigación solo en los casos con integración/interacción del genoma vírico. La misma estrategia se puede aplicar también para las lesiones neoplásicas inducidas por el PVH en áreas extrauterinas (región anogenital, región orofaríngea, etc.).

Una estrategia de vacunación eficaz combinada con un cribado organizado y una sensibilidad adecuada y una especificidad cada vez mayor de las pruebas usadas, como de la que se informa en el presente documento como ejemplo, dará lugar a la disminución de la prevalencia de la infección por el papilomavirus, lo que dará como resultado una disminución del impacto del cáncer de cuello uterino, una ventaja socioeconómica y de salud para la sociedad, reduciendo en gran medida la mortalidad, también mediante el tratamiento dirigido.

Otro posible uso ventajoso del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en el uso del mismo procedimiento para realizar experimentos, en las diversas fases de la progresión de la enfermedad, sobre las actividades de los fármacos antineoplásicos y la actividad inhibidora de la interacción E6/p53 y E7/pRb como nicandrenona (Shaikh F. *et al.* **2012**, *loc. cit.*), para el desarrollo y la experimentación de dicho medicamento en el tratamiento dirigido.

5

Con los mismos procedimientos también se pretende identificar, en muestras de células tomadas de cualquier localización anatómica que no sea el cuello uterino de cualquier paciente sometido a examen, las proteínas codificadas por oncogenes, también no víricos, y las codificadas por genes oncohibidores en el examen celular y determinar, por inmunoelectrotransferencia y/o ELISA de tipo sándwich, la posible interacción entre ellas.

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) en mujeres que se someten a un cribado para el carcinoma de cuello uterino, que comprende detectar, en muestras de células tomadas de la unión pavimentoso-cilíndrica del epitelio del cuello uterino de una paciente a la que se está examinando, la presencia de un complejo de proteínas E6/p53 producido por la proteína E6 con la proteína p53 y un complejo de proteínas E7/pRb producido por la proteína E7 con la proteína pRb, en el que la detección de dichos dos complejos de proteínas muestra que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible, realizándose dicha detección mediante el uso combinado de anticuerpos anti-proteína E6, anticuerpos anti-proteína E7, de anticuerpos anti-proteína p53 y anticuerpos anti-proteína pRb.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas de acuerdo con la técnica de inmunoelectrotransferencia:
- a) preparar una muestra de células tomadas de la unión pavimentoso-cilíndrica del epitelio del cuello uterino de una paciente a la que se está examinando y colocarla en una solución fisiológica;
 - b) extraer proteínas de dicha muestra y desnaturalizar las proteínas obtenidas;
 - c) someter las proteínas así desnaturalizadas obtenidas a electroforesis en gel de poliacrilamida;
 - d) transferir las proteínas obtenidas de la etapa anterior sobre una membrana y neutralizar los sitios libres de dicha membrana;
 - e) identificar dichas proteínas incubándolas con al menos los siguientes anticuerpos:
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6;
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E7;
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53;
 - anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb;
- y, a continuación, incubar con anticuerpos anti-IgG secundarios conjugados con biotina o con una enzima mensajera tal como fosfatasa alcalina;
- f) someter los productos de la etapa anterior a detección colorimétrica o a detección por quimioluminiscencia;
- en el que los resultados de dicha detección que muestran una doble banda de reacción para las proteínas E6 y E7, comprendiendo dicha doble banda una primera banda correspondiente al peso molecular de la proteína buscada, es decir, E6 o E7, y una segunda banda correspondiente a un peso molecular distinto y más alto que el peso molecular de la proteína respectiva de la primera banda, siendo dicho peso molecular sustancialmente igual a 71 kD para el complejo de proteínas E6/p53 y a 115,5 kD para el complejo de proteínas E7/pRb, indican que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible; y/o los resultados de dicha detección que muestran una doble banda de reacción para al menos una de las proteínas p53 y pRb, comprendiendo dicha doble banda una primera banda correspondiente al peso molecular de la proteína buscada, p53 o pRb, y una segunda banda correspondiente a un peso molecular distinto y más alto que el peso molecular de la proteína respectiva de la primera banda, indican que en la paciente examinada la carcinogénesis se ha vuelto irreversible.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los resultados de dicha detección que muestran una banda de reacción única para ambas proteínas E6 y E7, correspondiendo dicha banda única al peso molecular de la proteína buscada E6 o E7, indican que en la paciente examinada la carcinogénesis no ha comenzado aún y no se ha vuelto irreversible.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los resultados de dicha detección que no muestran ninguna banda de reacción para las proteínas E6 y E7 indican que en la paciente examinada no se ha producido integración del ADN vírico con el ADN celular.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los anticuerpos anti-IgG secundarios de dicha etapa e) se conjugan con fosfatasa alcalina, y en el que dicha detección de la operación f) es una detección colorimétrica o una detección por quimioluminiscencia.

- 5
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6 es un anticuerpo anti-proteína E6 de ratón de los tipos víricos PVH16 y PVH18, y dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E7 es un anticuerpo anti-proteína E7 de ratón de los tipos víricos PVH16 y PVH18.
- 10
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína p53 humana, y dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína pRb humana.
- 15
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha detección se realiza mediante el uso combinado de anticuerpos anti-proteína E6, anticuerpos anti-proteína E7, anticuerpos anti-proteína p53 y anticuerpos anti-proteína pRB, comprendiendo las siguientes etapas de acuerdo con la técnica de ELISA de tipo sándwich:
- 20
- a) identificar una muestra que se va a examinar, almacenada de acuerdo con una citología en fase líquida (LBC);
- b) adsorber, en diferentes pocillos de una microplaca, anticuerpos anti-proteína E6 y anti-proteína E7, como anticuerpos de captura contra las proteínas víricas E6 o E7;
- 25
- c) bloquear los sitios restantes del pocillo que unen las proteínas mediante un tampón de bloqueo;
- d) dispensar directamente en cada pocillo la muestra de células indicada que se va a analizar;
- 30
- e) identificar las proteínas de interés mediante incubación con el anticuerpo anti-proteína p53 diluido en los pocillos adsorbidos con el anticuerpo anti-proteína E6 y mediante el anticuerpo anti-proteína pRb diluido en los pocillos adsorbidos con el anticuerpo anti-proteína E7;
- f) bloquear el sustrato endógeno;
- 35
- g) incubar en los pocillos respectivos el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP);
- h) dispensar una solución de cromógeno en cada pocillo;
- i) someter el producto de reacción de la etapa h) a la lectura de la intensidad de luz detectada a una longitud de onda de 450 nm, mediante espectrofotómetro,
- 40
- en el que los resultados que muestran la tinción producida, documentados por una absorbancia positiva, indican que en la paciente sometida a examen están presentes los complejos de proteínas E6/p53 y E7/pRb, lo que confirma la interacción entre las proteínas víricas y humanas y, por lo tanto, indican que en la paciente sometida a examen la carcinogénesis comenzó y se ha vuelto irreversible.
- 45
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que en las etapas e), f), g) y h) se usan anticuerpos anti-proteína p53 y pRB biotinilados y se detectan con estreptavidina conjugada con peroxidasa o con otra enzima para amplificar la señal cromogénica.
- 50
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que, en caso de que los resultados de detección no muestren ninguna reacción positiva, con ausencia de absorbancia de señal a 450 nm, para ambos complejos de proteínas E6/p53 y E7/pRb, el resultado indica que en la paciente sometida a examen no se ha producido integración del ADN vírico con el ADN celular; sin descartarse la posibilidad de estar en presencia de una integración de ADN vírico con el ADN celular.
- 55
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína E6 de los tipos víricos PVH16 y PVH18, dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E7 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína E7 del tipo vírico PVH16, dicho anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti proteína p53 humana, dicho anticuerpo monoclonal primario de proteína anti-pRb es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína pRb humana.
- 60
12. El procedimiento para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 9-12, en el que dicho procedimiento se inserta en el marco de un programa de cribado de una población de mujeres, o en un programa para el diagnóstico precoz, para la detección de carcinoma de cuello uterino, después de un diagnóstico citológico de células escamosas atípicas (ASC) o peor, y un resultado positivo posterior de la prueba de determinación del ADN PVH-AR.
- 65

- 5 13. El procedimiento para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 9-12, en el que dicho procedimiento se inserta en el marco de un programa de cribado de una población de mujeres, o en un programa para el diagnóstico precoz, para la detección de carcinoma de cuello uterino, después de un resultado positivo de la prueba de determinación del ADN del PVH-AR, y el diagnóstico citológico posterior de células escamosas atípicas (ASC) o peor.
- 10 14. El procedimiento para detectar una transformación de células neoplásicas inducida por el papilomavirus humano (PVH) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 y 9-12, en el que dicho procedimiento se inserta en el marco de la actividad de diagnóstico, el cribado o el seguimiento de pacientes con lesiones neoplásicas inducidas por el PVH, o con sospecha de las mismas, en áreas extrauterinas, como la región anogenital, la región orofaríngea.

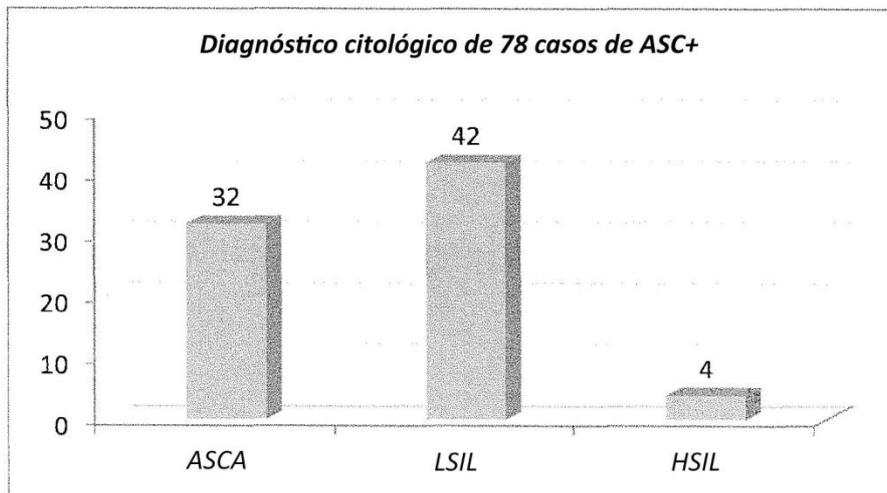


FIG. 1

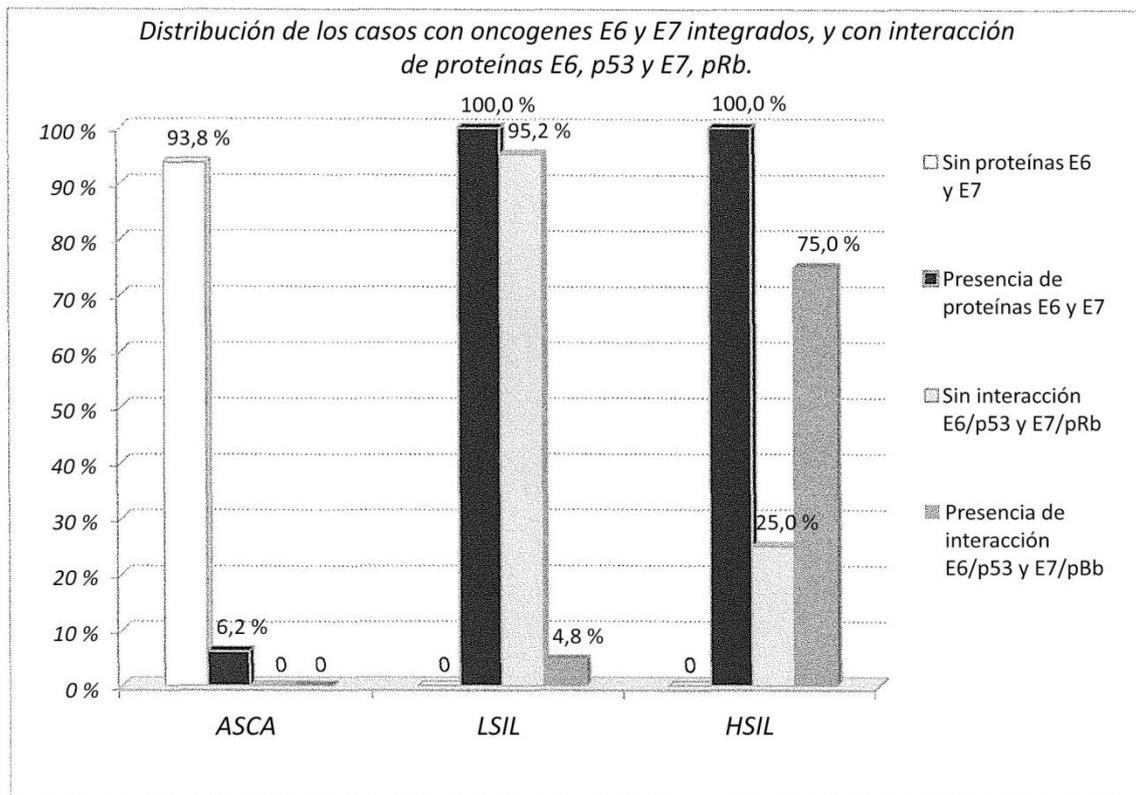


FIG. 2

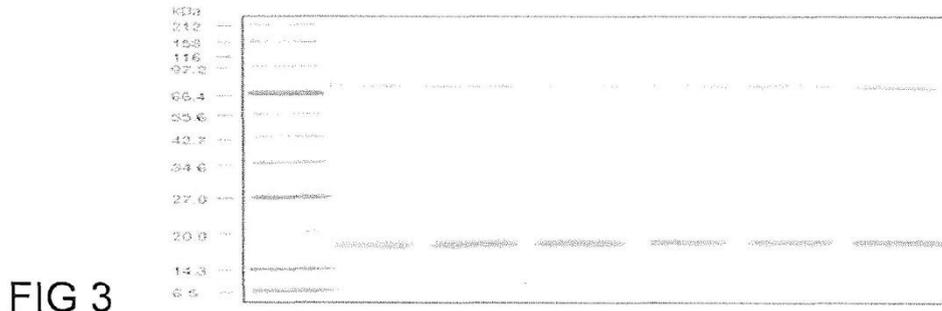


FIG 3

Inmunoelctrotransferencia con anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E6 (reacción de doble vía en 18 kd y 71 kd)

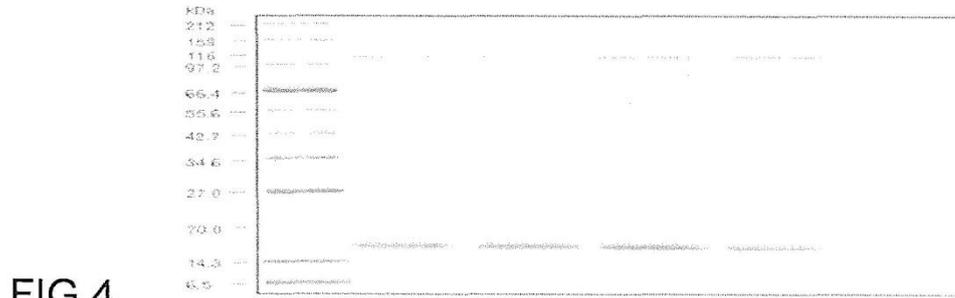


FIG 4

Inmunoelctrotransferencia con anticuerpo monoclonal primario anti-proteína E7 (reacción de doble vía en 16 kd y 115,5 kd)

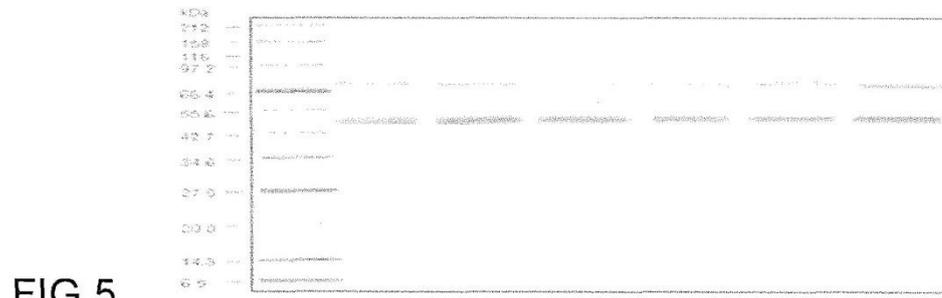


FIG 5

Inmunoelctrotransferencia con anticuerpo monoclonal primario anti-proteína p53 (reacción de doble vía en 53 kd y 71 kd)

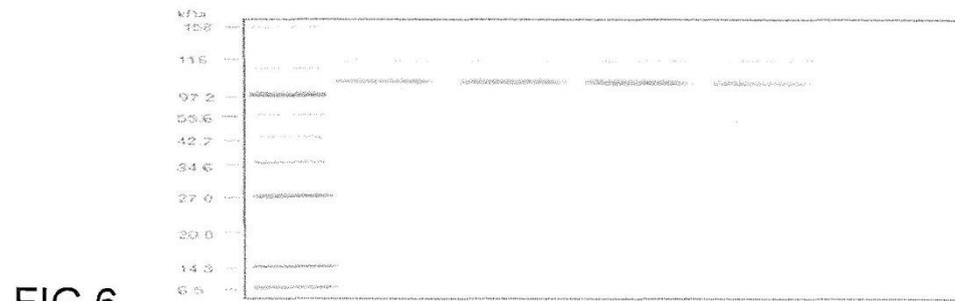


FIG 6

Inmunoelctrotransferencia con anticuerpo monoclonal primario anti-proteína pRb (reacción de doble vía en 105 kd y 115,5 kd)

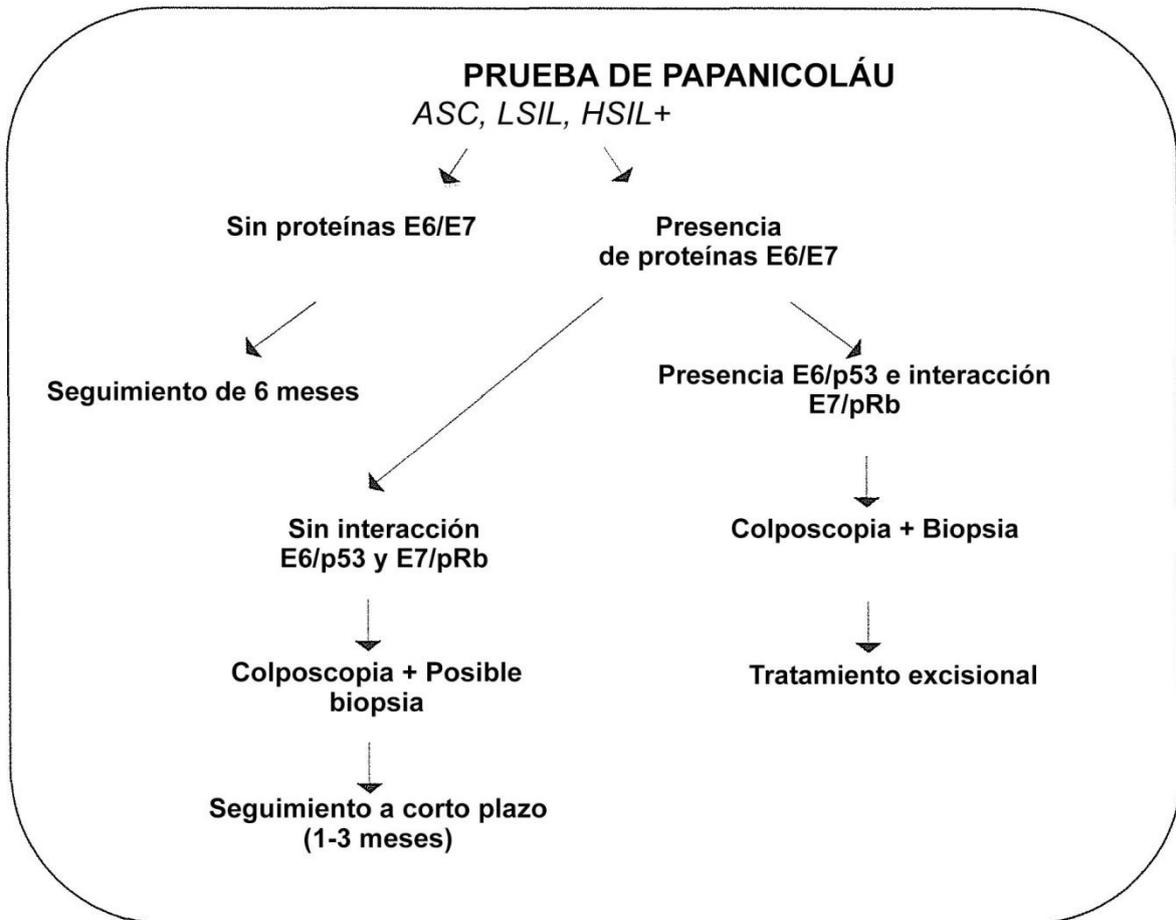


FIG. 7

ELISA EN SÁNDWICH PARA LA DETECCIÓN DE COMPLEJOS E6/p53 Y E7/pRb

Incubar con recubrimiento de anticuerpo monoclonal en los pocillos de una placa de microvaloración de PVC para anti-proteína E6 de ratón y anti-proteína E7 de ratón.



↓ Lavar las placas con PBS
Bloquear los sitios restantes de unión a proteínas mediante tampón de bloqueo ↓

Añadir directamente la muestra del vial de LBC en cada pocillo

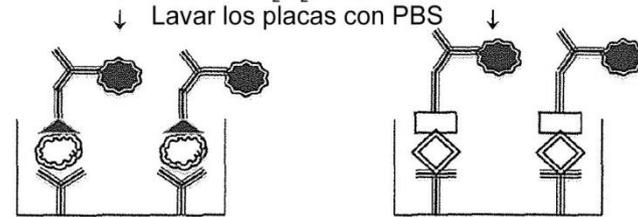


↓ Lavar las placas con PBS ↓

Incubar con el anticuerpo de detección anti-p53 en los pocillos con anti-proteína E6 y anticuerpo de detección anti-proteína pRb con anti-proteína E7



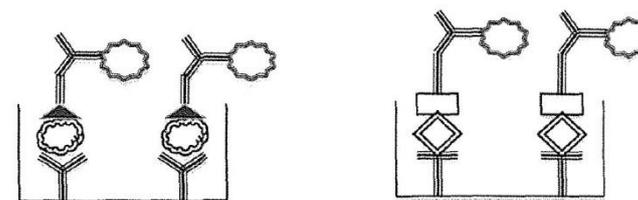
↓ Lavar las placas con PBS
Bloquear el sustrato endógeno mediante incubación con de H₂O₂ al 0,3 % ↓



Incubar con una solución que contenga anticuerpo conjugado unido a *peroxidasa de rábano picante* (HRP);

↓ Lavar las placas con PBS ↓

Añadir cromógeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) a cada pocillo



↓ Leer la adsorbancia con densidad óptica a 450 nm en el lector de placas ELISA y analizar los resultados

FIG. 8

LEYENDA

- | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |  |
| Captura de MAb primario anti-E6 | Complejo E6/p53 | Captura de MAb primario anti-E7 | Complejo E7/pRb | Detección de MAb primario anti-p53 | Detección de MAb primario anti-pRb | Ab secundario conjugado de HRP |