

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 994**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2014 PCT/US2014/032563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14168788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2014 E 14783232 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2984487**

54 Título: **Método para estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en un sujeto**

30 Prioridad:

11.04.2013 US 201361811034 P

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

23.12.2019

73 Titular/es:

**CYTOCORE, INC. (100.0%)
414 North Orleans Street, Suite 510
Chicago, IL 60654, US**

72 Inventor/es:

**JOLLEY, MICHAEL E. y
DOMANIK, RICHARD A.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 735 994 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 estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en un sujeto

5 **Antecedentes**

La información sobre citocinas y la citología obtenida de especímenes biológicos se combinan en métodos para predecir el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer.

10 1. Cribado de displasia

Un problema bien conocido en la medicina clínica es que, aunque las lesiones precancerosas (displasias) son relativamente comunes, solo una pequeña proporción de estas lesiones evoluciona a cáncer real. En ausencia de un medio confiable para diferenciar entre las lesiones que probablemente evolucionen a cáncer y aquellas que no, los médicos generalmente adoptan un enfoque conservador y tratan agresivamente todas las lesiones que superan algún umbral de anomalía. Una desventaja de tal enfoque conservador es que una fracción significativa de estos pacientes recibe tratamientos innecesarios y/o excesivamente agresivos, muchos de los cuales se sabe que producen efectos secundarios graves. Una segunda desventaja es que tales tratamientos innecesarios consumen grandes cantidades de recursos médicos limitados, desviando de esta manera estos recursos de otros pacientes que podrían obtener más beneficios de ellos. Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para diferenciar entre las lesiones precancerosas que probablemente progresen a cáncer y aquellas que no.

Los programas de cribado de enfermedades presentan un desafío en el sentido de que las pruebas usadas deben ser capaces de realizarse rápidamente, examinando de manera precisa y eficaz un gran número de individuos asintomáticos para detectar a aquellos pocos que exhiben indicaciones subclínicas de tener la enfermedad o una afección precursora. En otras palabras, el cribado de enfermedades es un ejercicio de detección de acontecimientos raros en el que la prueba usada debe ser lo suficientemente sensible como para detectar manifestaciones subclínicas de la enfermedad y lo suficientemente específica para diferenciar con precisión estas manifestaciones de manifestaciones similares resultantes de otras causas. Una complicación adicional, particularmente en el área de cribado de cáncer, es que una vez iniciada, la enfermedad no siempre evoluciona hasta el punto de volverse sintomática, sino que puede detenerse en algún momento o incluso volver a la normalidad.

El cribado de cáncer de cuello uterino y el seguimiento posterior de los resultados anómalos del cribado proporcionan el que es posiblemente el mejor ejemplo documentado del éxito del cribado de cáncer. Similar a la mayoría de las pruebas de cribado, el cribado del cáncer de cuello uterino se realiza en grandes poblaciones de pacientes asintomáticos con la intención de identificar a los pocos miembros de estas poblaciones que podrían beneficiarse del tratamiento u otra intervención apropiada. Dado que para identificar a los pocos individuos que exhiben la patología diana debe examinarse una gran cantidad de individuos asintomáticos, la logística y la economía desempeñan un papel crucial en la puesta en funcionamiento y en la operativa de los programas de cribado. En particular, la gran cantidad de individuos a detectar estipula que la logística de la recogida y prueba de muestras sea muy eficaz. Los altos costes asociados a la confirmación de un resultado de cribado anómalo y los costes aún más altos del tratamiento (si se confirma el resultado anómalo) también imponen requisitos estrictos en el proceso de cribado incluyendo que la prueba de cribado sea muy específica y que los costes de selección se minimicen.

Desde mediados de la década de 1940, el cribado de cáncer de cuello uterino se ha realizado mediante la prueba de Pap, en donde las células recogidas de cada individuo se examinan citológicamente para identificar aquellas muestras que contienen células que muestran las anomalías morfológicas que indican la presencia de displasia o cáncer. Los pacientes de los que se obtienen especímenes citológicamente anómalos, reciben un seguimiento, normalmente por el examen histológico de muestras de tejido obtenidas por biopsia, para confirmar la presencia de la anomalía y, si se confirma, para diagnosticar que la patología específica está presente. A su vez, este diagnóstico proporciona la base para planificar y administrar el tratamiento.

Actualmente, el cribado del cáncer de cuello uterino se basa en la evaluación morfológica de células epiteliales escamosas y, en algunos casos, de células endocervicales, obtenidas del cuello uterino. En la forma original de esta prueba estas eran células que se habían exfoliado del cuello uterino, pero desde finales de la década de 1940 se han obtenido raspando el cuello uterino con una espátula, con un dispositivo de cepillo o de escoba. La razón principal de este cambio en el método de recogida de muestras fue obtener una muestra "más limpia" rica en células epiteliales escamosas del cuello uterino que se evaluará morfológicamente. Hasta principios de la década de 1990, estas muestras se frotaban normalmente en un portaobjetos de microscopio en preparación para la evaluación citológica. Aunque este método de preparación de portaobjetos es simple y eficaz, los especímenes resultantes a menudo contienen grupos y agregaciones de células, mucosidad, bacterias, hongos, levaduras y células no epiteliales que pueden alterar el examen de las células epiteliales de interés clínico.

A finales de la década de 1990, los frotis comenzaron a desplazarse por preparaciones en "monocapa" (o "basadas en líquidos") que facilitan la evaluación de los especímenes dispersando mejor las células epiteliales, mientras se

elimina o se reduce significativamente la cantidad de mucosidad y el número de células no epiteliales en el portaobjetos mediante una etapa de purificación en el procedimiento de preparación del portaobjetos. En la actualidad estas preparaciones en monocapa, que están avaladas por las sociedades médicas y las autoridades nacionales de salud de todo el mundo, representan más del 80 % de los especímenes de cribado de cuello uterino en los Estados Unidos y Reino Unido y comprenden una fracción importante y creciente de los especímenes de cribado de cuello uterino en todo el mundo.

Las estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud indican que la tasa de incidencia del cáncer de cuello uterino varía según el país y generalmente está en el intervalo del 0,02 al 0,1 %. La prueba de Pap es, con diferencia, el método predominante usado en todo el mundo en el cribado del cáncer de cuello uterino. En este ensayo, las células epiteliales escamosas recogidas del cuello uterino se examinan citológicamente y cualquier anomalía morfológica observada en estas células se clasifica de acuerdo con los criterios aceptados internacionalmente (los criterios de Bethesda). Estas categorías son:

- (a) Dentro de los límites normales (WNL, por las siglas en inglés *Within Normal Limits*): no se observaron anomalías significativas
- (b) Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS, por las siglas del inglés *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*): una categoría utilizada principalmente en los EE.UU. para células que presentan anomalías morfológicas relativamente menores que no se incluyen en las otras clasificaciones.
- (c) Lesión escamosa interepitelial de grado bajo (LSIL o LGSIL, por las siglas del inglés *Low Grade Squamous Interepithelial Lesion*): anomalías morfológicas moderadas en consonancia con displasia. Las células que muestran cambios morfológicos en consonancia con infección vírica también pueden incluirse en esta categoría.
- (d) Lesión escamosa interepitelial de grado alto (HSIL o HGSIL, por las siglas del inglés *High Grade Squamous Interepithelial Lesion*): anomalías morfológicas displásicas graves. Este es el nivel en el que las normativas de cuidados generalmente prescriben una intervención médica agresiva.
- (e) Cáncer.

Aunque los números varían algo según la población de pacientes, una aproximación realista es que en los países desarrollados, el resultado de un programa de cribado de cáncer de cuello uterino consistirá en aproximadamente el 90 % de WNL; el 9 % de ASCUS + LSIL; el 0,9 % de HSIL y el 0,1 % de cáncer. Estas cifras indican que solo un pequeño porcentaje de las displasias de cuello uterino realmente evolucionan a cáncer de cuello uterino. Esto se apoya en la observación bien establecida de que la mayoría de las displasias se eliminan espontáneamente por el cuerpo sin la necesidad de una intervención terapéutica. Se necesita un medio para predecir de manera confiable qué displasias pueden evolucionar a cáncer para usar de manera óptima los escasos recursos médicos. También está bien establecido que cuando la biopsia se usa para confirmación, la sensibilidad (% de displasias detectadas) (Especificidad es el porcentaje de mamíferos correctamente identificados como tales; la tasa de falsos positivos es 1 - específicamente).

Desde una perspectiva funcional, una sensibilidad del 70 % significa que aproximadamente un tercio de los individuos en la población que se realiza la prueba de cribado que tienen displasia de cuello uterino o cáncer de cuello uterino no se detectan mediante la prueba de Pap. A partir de esto, es obvio que existe la necesidad de aumentar la sensibilidad de la prueba que se usa para el cribado del cáncer de cuello uterino. De manera similar, una especificidad del 70 % significa que aproximadamente un tercio de los casos clasificados por la prueba como que tienen displasia o cáncer no se pueden confirmar y generalmente se reclasifican como WNL. Además de los efectos emocionales de una clasificación tan errónea, estos resultados falsos positivos tienen un impacto económico significativo, ya que las pruebas de seguimiento necesarias para identificar los casos realmente positivos dentro de este grupo son mucho más costosas en términos de dinero y recursos médicos requeridos que el cribado inicial. Dadas las graves restricciones en la disponibilidad de recursos sanitarios en todo el mundo, gastar recursos en el seguimiento de un resultado de cribado falso positivo significa que se pueden examinar menos individuos y que hay menos recursos disponibles para el tratamiento de individuos que son verdaderamente positivos para la displasia o el cáncer. Existe la necesidad de mejorar la especificidad de la prueba de cribado del cáncer de cuello uterino.

Aunque la descripción anterior se centró en el cribado del cáncer de cuello uterino, estas y otras consideraciones y necesidades similares identificadas se aplican a los programas de cribado de otros tipos de cáncer tales como, pero no limitados a los de mama, próstata, pulmón y vejiga.

Los intentos anteriores para mejorar la sensibilidad y la especificidad se han centrado en el desarrollo de ensayos para la detección de "marcadores" que pueden correlacionarse con la presencia de displasia, métodos mejorados de evaluación morfológica, y el uso de indicadores sustitutos. Los marcadores son moléculas de la superficie celular o intracelulares cuyas concentraciones aumentan o disminuyen significativamente si se interrumpen los procesos celulares. Los marcadores que se han usado hasta la fecha han sido casi exclusivamente proteínas, pero ocasionalmente se ha explorado el uso de un pequeño número de otros tipos de moléculas tales como los lípidos y los oligonucleótidos. Aunque muchas de estas pruebas basadas en marcadores ofrecen una alta sensibilidad, sus especificidades tienden a ser limitadas debido al hecho de que estos marcadores son constituyentes normales de las células y desempeñan funciones en los procesos celulares normales y de rutina. Estos marcadores tampoco se

expresan de forma aislada, sino más bien como elementos de una red altamente interconectada de procesos celulares en donde los factores que causan un cambio en la expresión de un marcador pueden tener diversos efectos en la expresión de muchos otros marcadores. Las redes implicadas en el mantenimiento y la reparación celular de rutina han demostrado ser particularmente problemáticas a este respecto. Los enfoques basados en marcadores más fructíferos hasta la fecha se han centrado en la correlación de la expresión de múltiples marcadores en lugar de en la expresión de un solo marcador. En ocasiones, también se ha logrado un éxito limitado mediante la cuantificación precisa del nivel de expresión del marcador en células individuales. Además de los numerosos desafíos técnicos de realizar las mediciones cuantitativas necesarias, la variabilidad normal entre individuos e incluso dentro de la muestra hace que sea extremadamente desafiante determinar el verdadero fondo o nivel de referencia para la expresión del marcador que se necesita para determinar si un cambio medido en la expresión es significativo. Se aplican desafíos y limitaciones similares al uso de métodos mejorados de evaluación morfológica, la mayoría de los cuales se basan en diversos métodos de análisis automatizado de imágenes. Los procesos celulares reparativos y la necesidad de un control del proceso inusualmente estricto en la preparación y obtención de imágenes del espécimen son particularmente problemáticos y limitantes en este enfoque.

Los desafíos y limitaciones descritos anteriormente han llevado a la exploración del uso de marcadores sustitutos para la detección de enfermedades cancerosas y precancerosas. Podría decirse que el mejor desarrollo de estos métodos es el uso de pruebas de VPH para el cribado del cáncer de cuello uterino. Este uso se basa en la fuerte correlación (> 90 %) que se ha observado entre la infección por una o más cepas de "alto riesgo" (oncogénicas) del virus HPV y HSIL/cáncer. El argumento presentado a favor de este enfoque es que debido a que el virus del VPH en sí, y las diversas proteínas y otras moléculas que produce en las células, son todos "extraños", las pruebas basadas en este enfoque no están sujetas a muchas de las limitaciones descritas anteriormente. Aunque existe una fuerte correlación entre la presencia de la infección por VPH por una o más cepas oncogénicas y la presencia de displasias hasta e incluyendo cáncer, también es bien sabido en la técnica que solo muy pocas infecciones de este tipo realmente evolucionan hasta HSIL y aún menos evolucionan a cáncer. Como consecuencia, aunque las pruebas de VPH son altamente sensibles, sus índices de falsos positivos se considera rutinariamente que están en el intervalo del 40-60 %. Algunos informes en la bibliografía han sugerido recientemente que esto es una consecuencia de que las displasias inducidas por el VPH que evolucionan a cáncer no siendo un resultado directo de la infección en sí misma, sino más bien siendo un reflejo de errores aleatorios relativamente raros que pueden ocurrir durante la propagación del virus dentro de una célula. Esto, a su vez, ha llevado a propuestas para utilizar el aumento de la expresión de las proteínas E6 y E7 del VPH que parece estar mejor correlacionada con HSIL y el cáncer como marcadores. Este enfoque, sin embargo, se topa con limitaciones similares a las descritas anteriormente, ya que la expresión de E6 y E7 es una parte normal del ciclo de vida del VPH y, por lo tanto, no es definitiva en sí misma para las células que evolucionarán a cáncer.

Ya en la década de 1850, se observó que los tumores en algunos pacientes con cáncer que adquirieron y después se recuperaron de ciertas infecciones potencialmente mortales, se encogieron o incluso desaparecieron por completo. También se observó que una parte sustancial, más del 50 % en algunos casos, de la masa de un tumor sólido estaba constituida por glóbulos blancos. Más recientemente, se determinó que estos linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) consisten principalmente en células T, células NK, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y otros de los tipos de células que comprenden el sistema inmunitario innato. Otra investigación ha demostrado que una función primaria de estas células es detectar, atacar y destruir células innecesarias, dañadas, extrañas, infectadas y de otra manera anómalas.

2. Aspectos relevantes del sistema inmunitario humano

Aunque la estructura del sistema inmunitario humano, su control y su relación con el cáncer, aún no se han entendido completamente, algunos puntos que pertenecen a la presente invención pueden resumirse como:

- (a) Las interacciones entre el sistema inmunitario y el cáncer son complejas y no se comprenden bien. Estas interacciones pueden abarcar desde que el sistema inmunitario ataque y destruya el cáncer hasta que entre en un estado en el que el cáncer se tolera o incluso se promueve activamente. También existe una gran y creciente cantidad de pruebas que demuestran que un cáncer en desarrollo puede modular la respuesta inmunitaria correspondiente por cualquiera de varios medios.
- (b) Las células displásicas de aparición reciente y las células de cáncer se detectan y se neutralizan o se destruyen inicialmente por las células T efectoras, las células NK, los macrófagos y otras células del sistema inmunitario innato. Esto se describe normalmente como una respuesta inflamatoria basándose en los tipos de citocinas que se producen.
- (c) Se puede generar una respuesta de células B (anticuerpo, humoral) al cáncer.
- (d) Si el cáncer se elimina de manera oportuna, la respuesta inmunitaria vuelve a su estado de vigilancia en reposo, dejando las células T y B de memoria sensibilizadas que pueden responder rápidamente si se detecta otro cáncer similar posteriormente.
- (e) Si el cáncer persiste y no se resuelve de manera oportuna, ciertas células del sistema inmunitario pueden sufrir cambios fenotípicos que reducen o aniquilan la respuesta inmunitaria en las proximidades del cáncer. Entre los desplazamientos que se han registrado:

La transición de las células T auxiliares del fenotipo Th1 (que expresa citocinas proinflamatorias y promueve una respuesta inmunitaria) al fenotipo Th2 (que expresa citocinas antiinflamatorias y suprime la respuesta inmunitaria).

5 Una parte de la población de células T adopta un fenotipo regulador (Treg) que puede suprimir localmente la respuesta inmunitaria innata. Se sabe menos sobre las células B reguladoras (Breg) que parecen generarse antes, o al mismo tiempo que las Treg, y suprimen localmente la respuesta inmunitaria.

Una parte de las transiciones de la población de macrófagos locales de Tipo M1 (agresivo) a Tipo M2 (tolerante).

10 Las células T auxiliares Th2, Treg, los macrófagos M2 y las Breg secretan citocinas antiinflamatorias que, además de suprimir localmente la respuesta inmunitaria local, puede promover la angiogénesis y otros aspectos favorables a la proliferación de tumores.

15 Las células cancerosas pueden expresar citocinas antiinflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, Interleucina-10 (IL-10). Algunas de estas citocinas, más notablemente IL-10, regulan negativamente la respuesta inmunitaria específica del cáncer al suprimir la producción de interferón gamma (IFN- γ), IL-2 e IL-12. Esto da como resultado un aumento de la producción de otras citocinas antiinflamatorias tales como IL-4 e IL-6, una exposición reducida de antígenos tumorales por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células tumorales, y la inhibición de la presentación de antígenos específicos del tumor por células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos.

20 Ciertas células del sistema inmunitario innato, más notablemente las células T y las células NK, examinan individualmente los marcadores de la superficie celular mostrados por las células que comprenden los tejidos en su vecindad para determinar su estado. La detección de una célula que muestra un conjunto anómalo de estos marcadores desencadena una respuesta citolítica y citotóxica de la célula T o NK que se dirige a destruir la célula anómala. Al mismo tiempo, estas células liberan diversas citocinas y quimiocinas que atraen a macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario innato al sitio y las activan para continuar la destrucción de la célula anómala y retirar los residuos resultantes. También se pueden liberar ciertos interferones y otras moléculas que interactúan directamente con la célula diana. La destrucción de una célula anómala, por lo tanto, generalmente ocurre de manera rápida y eficaz, pero en algunos casos no es suficiente para eliminar completamente una lesión.

25 Se considera, principalmente a partir de la investigación en la génesis de enfermedades autoinmunitarias, que una respuesta inmunitaria inflamatoria demasiado prolongada del tipo descrito anteriormente, puede dar como resultado que las células inmunitarias activadas dañen y posteriormente ataquen a las células normales cerca de la lesión original. Para prevenir este tipo de daños colaterales indeseables, se proporciona un medio altamente eficaz para terminar la respuesta inmunitaria inflamatoria y se activa cuando la célula diana se destruye o si la respuesta inflamatoria se prolonga excesivamente. Así como la fase de ataque de la respuesta inmunitaria está mediada en gran medida por citocinas proinflamatorias, la fase de terminación está mediada en gran medida por citocinas antiinflamatorias controlándose el equilibrio entre ellas mediante una compleja red de interacciones entre los diversos tipos de células inmunitarias presentes. Recientemente la investigación en el uso de células T, NK y dendríticas activadas como agentes terapéuticos contra el cáncer ha revelado que el equilibrio entre las citocinas pro y antiinflamatorias también puede modularse por las propias células diana. En particular, se ha descubierto que, en muchos casos, las células displásicas y cancerosas son capaces de expresar y liberar cantidades suficientes de citocinas antiinflamatorias para suprimir o terminar el ataque inmune sobre ellas y forzar localmente al sistema inmunitario innato a un estado quiescente. Se cree que la imposición de este estado inmunosuprimido local es necesaria y suficiente para permitir la evolución de la displasia o el cáncer.

30 El documento WO 02/42267 A2 desvela un método para detectar afecciones precancerosas en muestras de células y tejidos usando 5,10,16,20-tetraquis-(carboxifenil)-porfina. Mindiola et al. (Invest. Clin. 2008, 49 (4):533-545) desvelan que en lesiones premalignas del cuello uterino, el número de IL-2, receptor de IL-2 y células positivas de IL-10 aumenta. Punyani y Sathawane (Clin. Oral Invest. 2013, 17 (2):517-524) desvelan que el nivel salival de IL-8 está significativamente elevado en pacientes con carcinoma oral de células escamosas, pero no en pacientes premalignos.

55 **Sumario de la divulgación**

Los métodos se describen en el presente documento para aumentar la evaluación de muestras biológicas de sujetos sometidos a pruebas de cáncer. Además de los tipos de células que tradicionalmente se consideran en el cribado citológico basado en la morfología de los especímenes, los métodos desvelados en el presente documento añaden evaluaciones de ciertos tipos de células y citocinas que tradicionalmente se descartan o se ignoran durante la selección.

65 Las células diana son los tipos de células que se califican como "normales", "displásicas" o "cancerosas". Por ejemplo, las células epiteliales son generalmente las células diana para el cribado del cáncer de cuello uterino.

Entre los tipos de células que se eliminan, o se reducen sustancialmente en número, en las preparaciones de espécimen en monocapa están los linfocitos (células T y células B), neutrófilos, las células dendríticas y los macrófagos. Aunque estos tipos de células, si están presentes en grandes cantidades en especímenes de frotis, ocasionalmente se han registrado como indicadores de infecciones tales como vaginitis, históricamente se han ignorado con respecto a el cribado del cáncer de cuello uterino. Son estas células ignoradas histórica e intencionalmente y ciertas citocinas asociadas a ellas, las que son la base de los materiales y métodos desvelados que se reivindican en el presente documento.

Se desvelan métodos y composiciones para monitorizar el estado del sistema inmunitario innato en la región de donde se tomó la muestra biológica, para determinar si el sistema inmunitario se suprime localmente y, si es así, si esta supresión está siendo impuesta o reforzada por células displásicas o cancerosas. Varios posibles resultados generales, cada uno de los cuales conlleva un riesgo diferente de evolución, puede perverse:

1. Un estado normal está indicado por la ausencia de células displásicas/cancerosas y la ausencia de células que expresan citocinas antiinflamatorias.
2. Se sugiere una respuesta inmunitaria normal si están presentes células displásicas o cancerosas, pero ni las células inmunitarias ni las diana están expresando citocinas antiinflamatorias. Esto puede indicar un riesgo ligeramente elevado.
3. Se indica una respuesta inmunitaria suprimida si hay células inmunitarias que expresan citocinas antiinflamatorias. Si las células diana que están presentes son morfológicamente normales y no expresan citocinas antiinflamatorias, entonces se puede suponer que cualquier anomalía que desencadenó la respuesta inmunitaria se ha resuelto con éxito. Si, sin embargo, la presencia de células diana anómalas, ninguna de las cuales expresa citocinas antiinflamatorias, puede interpretarse como el sistema inmunitario entrando en un estado de reposo debido a que ha montado una respuesta demasiado prolongada, estos resultados pueden indicar un aumento moderado del riesgo de evolución.
4. La presencia de células diana e inmunes que expresan citocinas antiinflamatorias es una indicación de que el sistema inmunitario está siendo suprimido por la fuerza. Este estado indica un alto riesgo de evolución al cáncer.

Aunque se puede obtener información clínicamente útil a partir de estas pruebas simplemente al observar si en un espécimen, alguna de las células está expresando una citocina antiinflamatoria, es más útil si las células que están presentes se clasifican como de tipo a un nivel que al menos diferencia entre las células diana y las células inmunitarias y, aún más útil, si las células displásicas y cancerosas se detectan morfológicamente y se clasifican opcionalmente.

Los especímenes citológicos se obtienen para fines de evaluación de riesgos, no para el diagnóstico clínico. Los especímenes usados en los procedimientos histológicos son cortes de tejido donde se confía considerablemente en la información contenida en las relaciones espaciales tridimensionales entre las células y los materiales intercelulares del tejido. Los especímenes citológicos, por otro lado, consisten en una disposición bidimensional de células dispersas en la que se han retirado el estroma y otros materiales intercelulares presentes en un espécimen histológico, y las relaciones espaciales entre las células restantes se han interrumpido intencionalmente. Debido a esta falta de material intercelular y la pérdida de relaciones espaciales, ambos de los cuales se consideran importantes en la clasificación y estadificación de las displasias y los cánceres, los especímenes citológicos generalmente se consideran inadecuados para su uso en la evaluación del riesgo de evolución de las células al cáncer. Los métodos desvelados en el presente documento se aumentan para aumentar el valor de los especímenes citológicos.

Un método para estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en un sujeto incluye:

- (a) detectar y clasificar células diana displásicas en una preparación citológica a partir de una muestra biológica del sujeto;
- (b) detectar y clasificar células T, células B, los macrófagos y/u otras células del sistema inmunitario innato como células no diana;
- (c) detectar la presencia de citocinas antiinflamatorias en células displásicas o no displásicas; y
- (d) estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en el sujeto en función de si al menos una citocina antiinflamatoria está presente en las células displásicas u otras detectadas en el espécimen, en donde
 - (i) la ausencia de células que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo normal de evolución;
 - (ii) la presencia de células no diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo ligeramente aumentado de evolución;
 - (iii) la presencia de células diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo moderadamente aumentado de evolución; y
 - (iv) la presencia tanto de células diana como de células no diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias, indica un riesgo mucho mayor de evolución.

Una citocina antiinflamatoria adecuada para la evaluación del riesgo es la IL-10.

Las células displásicas se tiñen con una o más tinciones fluorogénicas y se detectan y clasifican en función de la morfología celular.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la inmunotinción de IL-10 en una muestra de HSIL negativa a IL-10 (D1H) con unión a los anticuerpos Alexa-594® y Alexa-647®; (A) células normales y displásicas, diagrama de dispersión (la flecha señala las células teñidas de rojo); (B) células teñidas con Alexa-594® (verde) NSB; coeficiente de correlación R-G = 0,088; (C) células teñidas con Alexa-647® (rojo) NSB; coeficiente de correlación R-G = 0,67.

La Figura 2 es un diagrama de dispersión que muestra los resultados de la inmunotinción de IL-10 en una muestra de HSIL positiva para IL-10 (D6H) con unión a los anticuerpos Alexa-647® y Alexa-594®; células normales y displásicas (la flecha señala las células teñidas de rojo).

La Figura 3 muestra imágenes de pseudocolor de células: (A), (B) en donde la unión no específica se ilustró mediante imágenes separadas por color de la misma célula que muestran una correlación espacial pobre (<0,08) de la localización de los anticuerpos secundarios marcados (A) Alexa-594® (verde) y (B) Alexa-647® (rojo). El azul representa la tinción del núcleo celular por DAPI; (C), (D), (E) muestra la unión específica de (C) agrupación de HSIL positivo para IL-10; (D) agrupación HSIL - tinción 594; (E) agrupación HSIL - tinción 647; (F), (G), (H) muestra unión específica de (F) linfocitos IL-10; (G) linfocitos IL-10 - tinción 594; (H) linfocitos IL-10 - tinción 647.

Descripción detallada

1. Justificación clínica

Se desvela un método de uso de especímenes biológicos para predecir si un paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer.

En ausencia de cáncer, infección o daño celular que haya provocado una respuesta reparadora, las células en un espécimen citológico tendrán morfologías que están dentro de los límites normales, e indicadoras de una respuesta inmunitaria tales como la presencia de células T, células B y macrófagos será muy rara. De una manera similar, una célula sometida a reparación normal de daño no relacionado con el cáncer o una infección mostrará cambios morfológicos característicos del proceso de reparación y pueden estar presentes algunos macrófagos, pero las células T y las células B estarán ausentes. Sin embargo, si el cáncer, una afección precancerosa significativa, o una infección están presentes, la célula exhibirá cambios morfológicos distintivos y evidencia de una respuesta inmunitaria activa en forma de células T efectoras, células T auxiliares Th1, macrófagos M1 y posiblemente otras células efectoras del sistema inmunitario innato. Una respuesta inmunitaria abortada, por otro lado está marcada por displasia en combinación con células Treg y (posiblemente) células Breg, células T auxiliares Th2 y macrófagos M2, así como la producción de citocinas antiinflamatorias. Por tanto, la producción de una citocina antiinflamatoria, tales como IL-10, por estas células es una indicación de una respuesta inmunitaria abortada y es un indicador de que el ambiente local está en un estado inmunodeprimido que es permisivo de la evolución de la afección adversa.

Desde una perspectiva clínica, se considera que la detección de células cancerosas en un espécimen citológico justifica un seguimiento confirmatorio inmediato y una intervención agresiva, mientras que la respuesta a las células displásicas (precancerosas) en estos especímenes es más probable que se base en la evaluación del médico del riesgo de que la displasia evolucione a cáncer. A nivel mundial, las normas asistenciales estipulan, en gran medida, que la displasia de grado alto (HSIL) representa un alto riesgo de evolución y, por lo tanto, justifica una intervención inmediata, mientras que los grados menores de displasia representan riesgos más bajos y se responden en consecuencia. Esta evaluación de riesgos es, sin embargo, complicada por el hecho de que se sabe que una pequeña fracción de ASCUS y LSIL evoluciona y que una parte significativa de HSIL (60-90 % según algunas estimaciones) retrocede espontáneamente. Es por lo tanto deseable un medio para evaluar con mayor precisión en especímenes citológicos el riesgo de evolución en un sujeto de donde se obtuvo la muestra. La presencia de células de cualquier tipo, que secretan IL-10, es indicativo de que el paciente tiene un alto riesgo de evolución y es independiente del grado de displasia y otros factores de riesgo tales como la infección por una cepa de alto riesgo (oncogénica) del VPH.

Los métodos y las composiciones desvelados están destinados principalmente a la evaluación de riesgos basada en la evaluación de especímenes citológicos en un entorno de cribado de cáncer, pero también puede usarse con especímenes de biopsia y para fines de diagnóstico y gestión del paciente. Las preparaciones táctiles son una forma particularmente conveniente de espécimen de biopsia para este fin, pero también pueden usarse otras formas tales como cortes de tejido y tejidos dispersos. En la descripción a continuación se asumirá una muestra de citología de cuello uterino como la que se usa habitualmente en el cribado del cáncer de cuello uterino.

2. Un método para predecir el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer

Un método para predecir el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer incluye:

- (a) detección de citocinas;
- (b) identificación de displasia y células cancerosas; y
- (c) correlación de los resultados de (a) y (b) en una clasificación usada para las evaluaciones de riesgo.

5 Se usa una tinción morfológica en la detección de células displásicas y cancerosas y reactivos inmunológicos para la detección de citocinas. Para este fin pueden usarse tinciones cromáticas convencionales y reactivos inmunológicos marcados cromáticamente, pero una tinción nuclear o morfológica fluorescente en combinación con reactivos
10 inmunológicos marcados con fluorescencia es más conveniente para la mayoría de los fines. En particular, la tinción fluorescente facilita la tinción concurrente o secuencial de la misma célula para múltiples analitos, mientras que la tinción cromática a menudo requiere aplicar cada tinción a un espécimen diferente preparado a partir de la misma muestra. Realizar toda la tinción en el mismo espécimen simplifica enormemente la etapa de correlación y produce resultados sustancialmente más robustos.

15 Se describe un procedimiento convencional de tinción inmunológica de dos etapas con un anticuerpo secundario marcado, pero también pueden emplearse otros formatos, tales como uno que use un anticuerpo primario marcado. De manera similar, aunque este método se puede realizar usando técnicas de microscopía visual convencionales, la captura automatizada de imágenes en combinación con el análisis automatizado de estas imágenes capturadas es más conveniente y eficaz, particularmente cuando deben evaluarse grandes cantidades de especímenes, tales como
20 los que se encuentran en los programas de cribado.

DEFINICIONES

25 El cribado como se define en el presente documento es el examen de una muestra con la meta de **detectar** la presencia de una anomalía. Esto se traduce en la detección de células que son displásicas. La palabra funcional en esta definición es "detectar". No dice nada sobre cómo determinar el tipo específico o la causa de la displasia o lo que significa. Mucha de la confusión que rodea a este término proviene de la práctica común de presentar también un grado de displasia (ninguno, bajo, medio, alto) como parte de los resultados del cribado.

30 El **diagnóstico**, por otro lado, como se define en el presente documento no tiene nada que ver con la detección, sino que se centra en la **clasificación detallada** y la identificación de la causa subyacente de una anomalía ya detectada de acuerdo con, por ejemplo, el tipo específico, el grado y otras características. Como ejemplo, un resultado de cribado de cáncer de mama podría presentarse como hiperplasia atípica (el equivalente a una displasia de alto grado en otros tejidos), mientras que el diagnóstico correspondiente podría ser un carcinoma epitelial ductal invasivo en
35 estadio 3, caracterizado además siendo negativo o positivo para diversos marcadores de superficie celular tales como ER, PR y Her2Neu (la ausencia de estos tres indica que el cáncer diagnosticado es del tipo infame "triple negativo").

Ejemplos

40 Los métodos incluyen las siguientes etapas. Algunas de estas etapas pueden omitirse, combinarse o realizarse en un orden distinto al presentado dependiendo de los requisitos de cualquier uso particular de este método.

45 En algunos casos, puede ser deseable complementar esta invención mediante la adición de etapas en las cuales el espécimen se tiñe y se evalúa por la presencia de marcadores distintos de los incluidos dentro del alcance de esta invención:

1. Obtención de una muestra celular.

50 Se han ideado numerosos dispositivos y métodos de recogida de células y sus usos para la recogida de muestras celulares de tejidos, las secreciones corporales y otras fuentes anatómicas son bien conocidas en la técnica. Debido a la diversidad de tales dispositivos y métodos que están disponibles y porque cada uno de estos dispositivos o métodos a menudo está destinado a la recogida de células de algún sitio anatómico específico, una discusión detallada de tales dispositivos y métodos está más allá del alcance de esta descripción.

55 Cualquier dispositivo o método que sea capaz de recoger un número suficiente de células diana puede usarse en la práctica de la presente invención. Entre 1000 y 5000 células es generalmente suficiente, pero es preferible un número mayor, particularmente en los casos en que se espera que las células diana comprendan solo un pequeño subconjunto del total de células recogidas y/o cuando se anticipa una pérdida significativa de células durante la
60 preparación de un espécimen de la muestra.

También pueden utilizarse métodos estadísticos convencionales para estimar el número de células requeridas para alcanzar un nivel particular de confianza estadística en el resultado de la prueba dado un valor aproximado para la tasa de incidencia de la patología de interés de la enfermedad en la población que se está analizando. Además de proporcionar un número suficiente de células diana, el dispositivo y el método de recogida preferentemente causan poco o ningún daño a las células recogidas, minimiza la recogida de sustancias potencialmente interferentes tales

como mucosidad y glóbulos rojos y satisface diversos criterios funcionales relacionados con la facilidad de uso, la consistencia, la invasividad, el costo y factores similares. Las células diana que son adecuadas para uso en la práctica de esta invención son de origen epitelial. Como los dispositivos y métodos de recogida disponibles generalmente no son altamente selectivos en cuanto al tipo de célula recogida, las células no diana, que pueden ser

5 de origen epitelial o no epitelial, también están presentes en la muestra recogida. La clase de células no diana que es relevante para la práctica de esta invención son los linfocitos, que comprenden células T, células B, neutrófilos, macrófagos, células supresoras derivadas de mieloides y otras células del sistema inmunológico.

En una realización preferida, las células epiteliales de cuello uterino pueden recogerse usando una espátula o escoba de cuello uterino para raspar o causar abrasión a dichas células de la superficie del cuello uterino. En otra realización preferida, se emplea un dispositivo de vacío para hacer que los conductos de la leche en el tejido mamario expresen un fluido (fluido de aspirado de pezón) que contiene células epiteliales ductales que se recogen por absorción en un material absorbente, por filtración a través de un filtro de membrana o por sedimentación. De manera similar, en otras realizaciones preferidas, pero no limitantes, las células de la vejiga pueden recogerse de la orina o de lavados de la vejiga por filtración o sedimentación; las células pulmonares pueden recogerse del esputo; las células de la piel pueden recogerse usando cualquiera de diversos dispositivos raspadores o adhesivos y las células de los tejidos que no son directamente accesibles externamente pueden recogerse mediante aspiración con aguja fina (FNA). En algunos casos, pueden estar disponibles muestras de tejido obtenidas de manera incidental a un procedimiento quirúrgico. En tales casos, las células pueden recuperarse del tejido mediante la dispersión del

10 tejido en un medio fluido o, preferentemente, mediante el método de preparación por contacto, en donde la superficie del tejido se pone en contacto momentáneo con la superficie de un portaobjetos de microscopio que se ha recubierto previamente con un material tal como poli-L-lisina al que se adhieren preferentemente las células. Las muestras recogidas mediante estos métodos y mediante otros métodos similares, comprenden mezclas de células diana y no diana.

Dado que las células recogidas generalmente son inestables y hay un retraso de tiempo potencialmente significativo entre el momento en que se recogen las células y cuando se preparan como especímenes para su evaluación, se prefiere que las células recién recogidas se conserven o se fijen inmediatamente después de la recogida. Numerosas formulaciones de conservantes y fijadores e igualmente numerosos métodos para su uso son bien conocidos en la técnica. Para los fines de esta invención, el conservante o fijador preferido está basado en alcohol o puede ser alternativamente un disolvente orgánico tal como acetona o éter. Los alcoholes adecuados incluyen metanol, etanol e isopropanol puro o más comúnmente en una solución acuosa tamponada en la que la concentración de alcohol está entre el 15 y el 80 %. Los conservantes a base de alcohol adecuados pueden contener adicionalmente agentes mucolíticos y otros agentes modificadores, mientras que los fijadores a base de alcohol a menudo también contienen un polímero como Carbowax o polietilenglicol. En algunas circunstancias, un fijador de reticulación, como los que comprenden formaldehído, formalina o glutaraldehído se pueden usar en la práctica de esta invención, pero tales fijadores no son preferidos ya que las reacciones de reticulación que ocurren en tales fijadores pueden bloquear, oscurecer o dañar los epítomos que se detectarán en la etapa de inmunotinción de esta invención.

2. Preparación de una muestra citológica a partir de la muestra celular.

La preparación de una muestra citológica requiere que las células recogidas se transfieran a un portaobjetos de microscopio y después se tiñan de una manera que resalte las características celulares y los constituyentes de interés.

Numerosos dispositivos y métodos para la deposición de células en un portaobjetos de microscopio son bien conocidos en la técnica y se pueden usar en la práctica de esta invención. El método preferido es uno que minimiza el número de grupos de células en el portaobjetos, el grado de superposición entre las células adyacentes en el portaobjetos y la pérdida de las células y el daño causado a las células durante el proceso de transferencia. Un método preferido de este tipo es la citocentrifugación en donde las células contenidas en una suspensión celular se depositan en un portaobjetos de microscopio bajo la influencia de un campo centrífugo (gravitacional). Una limitación de este método es que contaminantes tales como la mucosidad y los glóbulos rojos que pueden estar presentes en la muestra de células, pueden depositarse en el portaobjetos de manera que bloquee la visión de células diana y no diana. En tales casos, es apropiado el uso de un conservante celular (véase anteriormente) que contenga agentes mucolíticos adecuados y/u otros agentes líticos selectivos. Como alternativa, la eliminación de constituyentes de muestra no deseados mediante cualquiera de diversos métodos de filtración o centrifugación en gradiente se practica ampliamente en la técnica. Tales separaciones son parte integral de varios métodos ampliamente utilizados en los que se usa un filtro de membrana para transferir células al portaobjetos. Los métodos que utilizan o incorporan separación celular pueden usarse en la práctica de esta invención siempre que el método de separación no dé lugar a un grado inaceptable de pérdida de células diana o no diana.

3. Tratamiento de la muestra citológica con una o más tinciones morfológicas.

Como las células son visualmente transparentes, es necesario tratar las células de una manera que establezca un contraste detectable entre las estructuras celulares y otros constituyentes de interés y sus alrededores. Este

contraste se crea tiñendo las células con diversos reactivos. Las tinciones más comúnmente utilizadas en la evaluación de especímenes citológicos son las tinciones cromáticas tales como la hematoxilina, que tiñe el ADN y la eosina, que tiñe diversos constituyentes del citoplasma. Si bien estas tinciones se pueden usar por separado, se usan más comúnmente en una combinación que a menudo se denomina tinción H&E. En algunos casos, la tiónina se sustituye por hematoxilina y/u otras tinciones se combinan con H&E para propósitos particulares. Estas tinciones morfológicas convencionales se pueden usar en la práctica de esta invención si esta tinción morfológica se realiza después del procedimiento de tinción inmunológica descrito a continuación y se proporciona un medio tal como el registro de las ubicaciones e identidades de las células diana y no diana relevantes identificadas morfológicamente. para permitir la correlación de estos resultados morfológicos con los resultados obtenidos del proceso de tinción inmunológica descrito a continuación.

La práctica de los métodos desvelados y reivindicados se facilita enormemente si las tinciones morfológicas cromáticas tales como H&E descritas anteriormente se reemplazan con tinciones morfológicas fluorescentes o fluorogénicas tales como DAPI, POPRO y similares. Las ventajas de la tinción fluorescente sobre la tinción cromática, especialmente cuando se deben realizar mediciones cuantitativas de esta tinción, son bien conocidas en la técnica. Dos de estas ventajas que son particularmente pertinentes para la presente invención son que el amplio intervalo de concentraciones de constituyentes celulares presentes en las células se acomoda más fácilmente en fluorescencia y las tinciones morfológicas fluorescentes y fluorogénicas son más compatibles con los métodos de inmunotinción fluorescentes que la mayoría de las tinciones cromáticas. En el contexto de este último punto, cabe señalar que la tinción cromática de eosina tiene una emisión fluorescente que puede abrumar las emisiones de la mayoría de los fluoróforos que se usan comúnmente en los procedimientos de inmunotinción. Por estas razones, el uso de tinciones morfológicas fluorescentes o fluorogénicas es fuertemente preferido en la práctica de esta invención. Estas manchas fluorescentes y sus métodos de uso son bien conocidos en la técnica.

En ciertos casos, puede ser conveniente o deseable emplear un tipo de tinción o tinciones inmunológicas selectivas de tipo celular para detectar específicamente células diana o no diana de interés. Los ejemplos de dicha tinción selectiva incluyen el uso de una inmunotinción que comprende un anticuerpo 19 primario anti-citoqueratina para detección de células epiteliales ductales en una muestra que comprende fluido de aspirado de pezón, o el uso de un anticuerpo anti-CD4 o anti-CD8 para la detección y la identificación de clases específicas de células T. Tales métodos y procedimientos de tinción selectiva son bien conocidos en la técnica.

4. Detección, identificación y clasificación de cualquier célula y otros objetos que puedan estar presentes en la muestra citológica en función de la morfología y detección de la presencia de células diana que tienen características indicativas de displasia, cáncer, infección u otra patología basándose en la morfología celular.

Los métodos y criterios para la identificación morfológica y clasificación de células de diversos tejidos son bien conocidos y establecidos en la técnica. La identificación y clasificación de las células epiteliales diana y de las células no diana del sistema inmunitario, tales como células T, células B, neutrófilos, macrófagos y células supresoras derivadas de mieloides se realizan en la práctica de esta invención. Otros tipos de células generalmente pueden ignorarse. La identificación y clasificación celular se realiza tradicionalmente mediante la evaluación visual de la morfología celular, pero también se puede lograr beneficiosamente mediante el análisis automatizado de imágenes de células capturadas electrónicamente.

5. Tratamiento del espécimen citológico con una o más tinciones inmunológicas y detección de la presencia de una o más citocinas antiinflamatorias.

Desde que se introdujo esta técnica por primera vez en la década de 1950, se han desarrollado numerosos métodos para la inmunotinción de muestras celulares con el fin de detectar y cuantificar opcionalmente componentes celulares específicos. De estos, los formatos "secundarios marcados" y ELISA son actualmente los métodos dominantes empleados en el laboratorio de citología. El formato "secundarios marcados" es el método de inmunotinción preferido en la práctica de esta invención. Este formato utiliza un anticuerpo primario no marcado que se une específicamente al constituyente celular de interés en combinación con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia que se une específicamente a la porción Fc del anticuerpo primario. Los formatos que utilizan anticuerpos primarios marcados con fluorescencia también se pueden usar eficazmente, pero puede resultar en niveles de señal más bajos y puede requerir un etiquetado personalizado del anticuerpo.

Los anticuerpos primarios monoclonales que se unen fuertemente y específicamente a las citocinas antiinflamatorias TNF- β /I/II, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13 e IL-19, ya sea de forma individual o en combinación, se prefieren para su uso en esta invención. De estos, la IL-10 ha demostrado ser la más generalmente aplicable a el cribado de displasias que probablemente progresen en varios tejidos, mientras que las otras citocinas antiinflamatorias tales como la IL-19 parecen ser más específicas de los tejidos. Por lo tanto, la citocina diana o la combinación de citocinas se determina mejor en función del tejido a partir del cual se obtuvo la muestra de células a analizar. Todas las moléculas de anticuerpos monoclonales producidas por un clon particular son idénticas, pero es bien conocido en la técnica que las especificidades y afinidades de estos anticuerpos pueden variar ampliamente entre los clones. Por lo tanto, incluso si se utilizan anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado, el rendimiento de esta invención dependerá de los anticuerpos particulares y los clones correspondientes seleccionados. Debido a las

concentraciones relativamente bajas de citocinas antiinflamatorias que están presentes en las muestras usadas en esta invención y la amplificación de señal relativamente baja disponible en el formato de ensayo secundario marcado, los anticuerpos primarios monoclonales preferidos deben tener afinidades en el intervalo nanomolar bajo, o preferentemente en el intervalo picomolar bajo a medio en combinación con al menos una especificidad moderadamente alta para la citocina diana particular.

El anticuerpo secundario marcado es un anticuerpo generado en una especie distinta de la especie del anticuerpo primario que se une específicamente a la porción Fc del anticuerpo primario seleccionado y al cual se unen varias moléculas de fluoróforo. Los anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia adecuados están disponibles en el mercado de numerosas fuentes o pueden prepararse mediante métodos que son bien conocidos en la técnica. Una desventaja de los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos es que exhiben una cierta cantidad de unión no específica, lo que hace que la detección de acontecimientos raros sea problemática. En la presente invención, esto se supera mediante el uso de anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos de diferentes clases estructurales y, por lo tanto, diferentes propiedades de unión no específicas. Algunos ejemplos de tales tintes son Alexa Fluor 594® y Alexa Fluor 647®.

La inmunotinción de la muestra se lleva a cabo de la manera bien conocida en la técnica, tratando la muestra con el anticuerpo monoclonal primario seleccionado o anticuerpos específicos para las citocinas antiinflamatorias diana; retirando el anticuerpo primario no unido mediante lavado; tratando el espécimen con una mezcla que consiste en partes aproximadamente iguales de anticuerpo secundario marcado con el primer y segundo fluoróforos; retirando el anticuerpo secundario no unido mediante lavado; y protegiendo el portaobjetos teñido mediante la aplicación de un cubreobjetos.

Los resultados de la inmunotinción se evalúan examinando el espécimen teñido con un microscopio de fluorescencia que se ha configurado para utilizar longitudes de onda de excitación y emisión que son compatibles con el primer y segundo fluoróforos empleados. Esta evaluación se puede hacer visualmente o preferentemente mediante un sistema automatizado de captura y análisis de imágenes. El propósito de esta evaluación es identificar esas células, si las hay, presentes en el espécimen donde la tinción con el anticuerpo marcado con el primer fluoróforo coincide espacialmente con la tinción con el anticuerpo marcado con el segundo fluoróforo. Este procedimiento permite la detección y compensación de la unión no específica del anticuerpo secundario marcado a las células, que si no se corrige podría dar resultados falsos positivos. En términos generales, si solo uno u otro de los anticuerpos secundarios marcados se unen en una ubicación particular en una célula, se puede suponer que esta unión no es específica, pero que si ambos anticuerpos marcados se unen en la misma ubicación, se puede suponer que la unión es específica y, por lo tanto, un verdadero indicador de la presencia de la citocina antiinflamatoria diana.

6. Evaluación del riesgo relativo de que las células diana identificadas de esta manera evolucionen a una patología más adversa basándose en la detección de la presencia de una o más citocinas antiinflamatorias en alguna parte de las células que comprenden las muestras citológicas.

Para estimar el riesgo de evolución es necesario clasificar cada célula diana y célula no diana, en donde el procedimiento de inmunotinción de la etapa 5 indica que se expresa la citocina antiinflamatoria diana, en términos de su tipo y, si es aplicable, su grado de anomalía morfológica. Como la inmunotinción y tinción morfológica se realizan en el mismo espécimen, las células inmunoteñidas detectadas en la etapa 5 pueden identificarse y clasificarse según la información morfológica correspondiente a la misma célula que se obtuvo en las etapas 3 y 4. Esta correlación se puede realizar manualmente, pero se realiza más convenientemente usando un sistema automatizado de análisis de imágenes. También es útil, pero no es necesario en la práctica de esta invención, para identificar cualquier célula diana morfológicamente anómala no teñida y cualquier célula no teñida del sistema inmunitario que pueda estar presente.

El riesgo de evolución puede estratificarse según la información anterior. Estos riesgos de evolución son relativos al riesgo correspondiente normalmente asociado a una célula diana del mismo tipo que exhibe características morfológicas similares, pero que no expresa una citocina inflamatoria.

Un ejemplo de los resultados obtenidos por el procedimiento anterior se resume en la Tabla 1. Cada muestra se recogió como parte del examen de Papanicoláu (Pap) habitual de mujeres para detectar la presencia de cáncer de cuello uterino o durante el seguimiento de mujeres que tuvieron un resultado de cribado anómalo anterior. Estas muestras se tomaron del cuello uterino utilizando una espátula de cuello uterino, a veces en combinación con un cepillo endocervical y conservado en un conservante a base de metanol disponible en el mercado (ThinPrep®). Una porción de cada muestra se preparó como un espécimen citológico; teñido utilizando la tinción de Pap; y evaluado morfológicamente por varios citólogos capacitados de acuerdo con normativas y criterios aceptados internacionalmente. Los resultados de estas evaluaciones citológicas convencionales de esta parte de la muestra se registran en la columna "Citología" de la Tabla 1, que está organizada por un diagnóstico citológico cada vez más adverso, y comprende los diagnósticos de referencia oficiales para estas muestras. El estado del VPH también se proporciona cuando está disponible como una infección por una cepa del virus del VPH de alto riesgo (HR, oncogénico) se considera una causa primaria del cáncer de cuello uterino. La infección o coinfección por cepas de VPH de bajo riesgo (LR, no oncogénicas) también se observan cuando están disponibles.

Se preparó una segunda porción de cada muestra que comprendía aproximadamente 5000 células totales mediante citocentrifugación; teñidas utilizando POPRO; inmunoteñidas usando un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-IL-10 en combinación con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo marcados con Alexa Fluor 594® y Alexa Fluor 647®. La evaluación morfológica, la captura de datos y el análisis de datos se realizaron visualmente utilizando un microscopio de fluorescencia disponible en el mercado (Olympus BX-50) y utilizando un sistema automatizado de captura y análisis de imágenes a medida. La correlación entre la tinción de IL-10 y la clasificación morfológica se muestra en las columnas "HSIL" y "Grupo HSIL" en la Tabla 1. En este estudio en particular, se usó un umbral de registro de HSIL ya que este nivel de anomalía morfológica a menudo se considera el umbral para iniciar un seguimiento agresivo del paciente. Los grupos HSIL y HSIL se presentan por separado, ya que los grupos HSIL a menudo se consideran un resultado más adverso que el HSIL en células aisladas. La columna "Evaluación de riesgos" identifica la clasificación o clasificaciones morfológicas de cualquier IL-10 que exprese células epiteliales escamosas y el correspondiente nivel estimado de riesgo de que el paciente probablemente progrese a una patología más adversa que la indicada en la columna "Citología".

La muestra 10 en la Tabla 1 indica la capacidad de esta invención para detectar la presencia de células anómalas en una muestra nominalmente "normal". En este caso específico, se encontraron HSIL aisladas positivas para IL-10 como un grupo de HSIL positivas para IL-10. Así, aunque esta muestra fue declarada normal por la citología convencional, este paciente debe considerarse como de alto riesgo de evolución a cáncer.

La muestra 15 en la Tabla 1 está clasificada como ASCUS por citología convencional. ASCUS es una categoría que se usa predominantemente en los EE.UU. que representa la presencia de células escamosas que exhiben anomalías morfológicas que no se encuentran dentro de las categorías tradicionales de LSIL, HSIL o cáncer. Se cree que al menos una fracción de las muestras reportadas como ASCUS representan errores de recogida de muestras en los cuales la muestra se recogió en un área adyacente a, en lugar de incluir, una lesión que, si se toma la muestra correctamente, devolverá un diagnóstico de LSIL o superior. Como una porción significativa de los resultados anómalos reportados durante el cribado de Pap para el cáncer de cuello uterino se clasifican como ASCUS, es deseable un método para identificar ese subconjunto de muestras de ASCUS que son clínicamente significativas. Se encontró que esta muestra en particular contenía células que expresan IL-10 que, tras la evaluación morfológica, se encontró que eran grupos de HSIL o HSIL y que, por lo tanto, se debería considerar que el paciente tiene un alto riesgo de evolución.

Bajo el Sistema Bethesda para la clasificación de células en el cribado de cáncer de cuello uterino, LSIL (muestras 16-42 en la Tabla 1) es una categoría heterogénea que incluye ambas células que muestran los cambios morfológicos asociados con la displasia de bajo grado y células que muestran los cambios morfológicos asociados a la infección de las células por virus tales como el VPH. Es bien sabido en la técnica que una fracción significativa, más del 90 % por muchas estimaciones, de las células clasificadas como LSIL volverán espontáneamente a la normalidad a lo largo del tiempo, mientras que el resto evolucionará a HSIL. Como es el caso de ASCUS, estas consideraciones indican que es deseable un medio para identificar ese subconjunto de muestras de LSIL que es probable que evolucione. Las muestras de LSIL 16 - 34 en la Tabla 1 no contienen células epiteliales escamosas que expresan IL-10 y, por lo tanto, no se considera que tengan un mayor riesgo de evolución, mientras que las muestras de LSIL 35-42 son positivas para la evolución de IL-10 y se encontró que contenían HSIL y/o grupos HSIL tras reexaminación. Es interesante observar que las células que se clasificaron morfológicamente como LSIL no expresaron IL-10. Otro factor a destacar es que algunas de estas muestras de LSIL, incluida la muestra 41, que se consideró con un alto riesgo de evolución, dio negativo para la presencia de infección por VPH de alto riesgo. Este tipo de observación tiene implicaciones para el uso propuesto de las pruebas de VPH como el medio principal de cribado de cáncer de cuello uterino.

Como es el caso de LSIL, se sabe que una cierta parte de los casos clasificados como HSIL vuelven a ser normales mientras que los casos restantes evolucionan a cáncer. Esta parte de los casos que regresan espontáneamente se ha estimado diversamente estando entre el 30 y el 60 %. La falta de expresión de IL-10 registrada para las muestras 43-47 sugiere que es probable que estas muestras retrocedan mientras que las muestras 48-63 expresan IL-10 y es probable que evolucionen si no se tratan.

Además de la realización descrita anteriormente, las etapas pueden variar dependiendo de los requisitos de una aplicación específica. Por ejemplo, el orden de las etapas 4/5 y 6 se puede invertir o, si se usa una tinción morfológica fluorescente o fluorogénica, estas etapas se pueden combinar en una sola etapa. De manera similar, la tinción morfológica y la evaluación se pueden realizar solo en aquellas muestras en las que se observan pruebas de inmunotinción para la presencia de citocinas antiinflamatorias o la tinción y evaluación morfológica se pueden eliminar por completo y la presencia o ausencia de tinción para una citocina antiinflamatoria puede tomado como indicador de si se requiere un seguimiento adicional. Esta invención también se puede extender realizando la tinción y la evaluación de la presencia de marcadores adicionales como el PD-1, PD-L1, CTLA-4, p-16 y Ki-67 para obtener información adicional sobre un espécimen en particular.

7. Obtener una muestra adecuada.

En el caso de cribado de cáncer de cuello, esta muestra tradicionalmente comprende principalmente células epiteliales que se obtienen del cuello uterino mediante raspado o cepillado, pero también contiene otros tipos de células que están presentes en el tejido muestreado.

5 8. Preparar una muestra citológica a partir de la muestra.

Las muestras de citología para el cribado del cáncer de cuello uterino se preparan tradicionalmente usando el dispositivo de recogida de células para frotar físicamente las células recogidas en un portaobjetos de microscopio. Las muestras preparadas de esta manera se pueden usar con la advertencia de que algunas células de interés pueden estar incrustadas en grupos o agrupaciones u ocultas y, por lo tanto, no se pueden evaluar fácilmente.

El método de "monocapa" o "a base de líquido" para la preparación de espécimen se introdujo en gran medida para abordar los problemas de oscurecimiento inherentes a las preparaciones de tipo frotis. En estos métodos, las células recogidas se lavan del dispositivo de recogida de células en un medio líquido, formando así una suspensión celular. Las células contenidas en esta suspensión después se depositan en un portaobjetos de microscopio por cualquiera de varios medios establecidos.

La captura de las células suspendidas en la superficie de un filtro de membrana, seguido de colocar el filtro con células capturadas en un portaobjetos de microscopio, o transferir las células capturadas del filtro a un portaobjetos de microscopio, incluye una de las dos clases principales de tales métodos que son de uso generalizado. Los especímenes preparados de esta manera pueden usarse siempre que se use un filtro adecuado. Los filtros más comúnmente usados en la preparación de muestras para el cribado del cáncer de cuello uterino están diseñados para capturar, en la superficie del filtro, las células epiteliales que tradicionalmente se evalúan, mientras se permiten otros tipos de células que pueden estar presentes en la muestra, incluyendo células T, macrófagos y otros tipos empleados en la práctica de esta invención, para pasar a través del filtro y en un envase de residuos. A menos que un filtro tenga poros más pequeños y sea capaz de capturar células T, macrófagos y otros tipos de células empleadas en la práctica de este método usado, los números de estas células en las muestras resultantes se reducirán significativamente en relación con sus números en la muestra original.

El otro método comúnmente practicado para preparar muestras a partir de suspensiones celulares se basa en el asentamiento de las células en la suspensión en un portaobjetos de microscopio en presencia de un campo gravitatorio. Los métodos en los que este asentamiento se produce en un campo 1xG y métodos en los que este campo se aumenta a varios cientos de xG, por ejemplo, por centrifugación (por ejemplo, un CytoSpin®) se emplean comúnmente y pueden usarse. Sin embargo, la versión específica del método de asentamiento que ha recibido aprobación reguladora para su uso en la preparación de muestras para el cribado del cáncer de cuello uterino requiere que la muestra se separe en una fracción de células epiteliales y una fracción que contenga los otros tipos de células presentes en la muestra, y que solo la fracción de células epiteliales se depositará en el portaobjetos para la evaluación citológica. Como en el caso del método de filtración descrito anteriormente, los números de células T, macrófagos y otros tipos de células que están presentes en un portaobjetos preparado por este método aprobado se reducirán significativamente en relación con sus números en la muestra original. Por esta razón, en la práctica de esta invención se prefiere que se omita el fraccionamiento de la muestra antes de la deposición. Como alternativa, las fracciones que contienen el epitelio y otros tipos de células se pueden recuperar y evaluar por separado.

9. Detectar y, opcionalmente, clasificar las células displásicas y/o cancerosas que puedan estar presentes en el espécimen.

La morfología basada en la detección y la clasificación citológica de células displásicas y cancerosas se lleva a cabo de acuerdo con las prácticas y normativas aceptadas internacionalmente. En estas prácticas, la detección y la clasificación se facilita al teñir el espécimen antes del examen. La tinción de Pap se usa comúnmente en el cribado de especímenes de citología de cuello uterino, mientras que la H&E con o sin varias contratinciones se usa normalmente con otros tipos de especímenes. Pueden usarse estas y otras tinciones.

La clasificación citológica presentada se aplica tradicionalmente a todo el espécimen. Se puede utilizar un resultado a nivel de espécimen, pero es preferible que cada célula detectada en el espécimen se clasifique individualmente. Un sistema automatizado de captura y análisis de imágenes es un medio conveniente para proporcionar esta función.

Los resultados de esta clasificación se presentan de acuerdo con cualquiera de varios sistemas estandarizados de nomenclatura. Las principales categorías de informes en el sistema de nomenclatura de Bethesda y las prácticas de seguimiento correspondientes son:

Dentro de los límites normales (WNL, normalmente también incluye reactivo y reparador)

- No se justifica seguimiento o intervención.

Displasia de bajo grado (LSIL)

- Entre el 90 y el 95 % de todos los LSIL vuelven espontáneamente a WNL a medida que el sistema inmunitario elimina la lesión. Las normativas locales de atención generalmente no recomiendan un seguimiento que no sea un intervalo acortado entre las detecciones, a menos que haya otros factores de riesgo presentes.

Displasia de alto grado (HSIL)

- Las normativas de cuidados dictan la intervención terapéutica si se confirma HSIL con una biopsia. Entre el 60 y el 90 % de todas las HSIL se eliminan espontáneamente por el sistema inmunitario y el equilibrio evoluciona hacia el cáncer.

Cáncer (CA)

- Intervención terapéutica inmediata si se confirma CA mediante biopsia.

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS - reconocido en algunos países)

- La gran mayoría de los hallazgos de ASCUS se determinan ser benignos en el seguimiento, pero un pequeño porcentaje es sugerente o indicativo de HSIL o CA. El seguimiento generalmente se determina caso por caso.

Como puede verse a partir de lo anterior, aunque la presente invención se puede aplicar a especímenes en cualquiera de estas categorías, es más beneficioso cuando se aplica a muestras que están clasificadas como HSIL o ASCUS basándose en la morfología y a muestras LSIL si hay otros factores de riesgo presentes.

10. Detectar la presencia de una citocina antiinflamatoria en cualquiera de las células displásicas, células T reguladoras, células B reguladoras y macrófagos M2 en el espécimen.

La interleucina 10 (IL-10) es la citocina antiinflamatoria preferida para el presente método porque la IL-10 juega un papel central en la terminación de la respuesta inmunitaria local y se ha demostrado, al menos en algunos cánceres, estar implicada en otros acontecimientos de evolución, tales como la supresión de la apoptosis y la reducción de la presentación de antígenos tumorales en el complejo MHC-I. También pueden usarse otras citocinas antiinflamatorias tales como TNF- β . La detección de estas citocinas se realiza más convenientemente por inmunotinción. Se puede usar cualquier método convencional de inmunotinción. El formato de inmunotinción preferido utiliza un anticuerpo primario no marcado en combinación con un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Los formatos que utilizan anticuerpos primarios marcados con fluorescencia también se pueden usar eficazmente, pero puede resultar en niveles de señal más bajos y puede requerir un etiquetado personalizado del anticuerpo.

11. Evaluar el riesgo de que la displasia en el paciente del que se obtuvo la muestra evolucione a cáncer.

Se supone que las muestras evaluadas por este método incluyen predominantemente HSIL más subconjuntos seleccionados de LSIL y ASCUS en los que el paciente tiene factores de riesgo clásicos adicionales reconocidos tales como antecedentes familiares o personales de cáncer, exposición a DES, o una infección persistente por un virus oncogénico (tales como una cepa de alto riesgo de VPH).

La presencia de una citocina antiinflamatoria, tales como IL-10, en cualquier célula del espécimen puede tomarse como evidencia de que la respuesta inmunitaria local está siendo o ha sido terminada. Si la expresión de una citocina antiinflamatoria tales como la IL-10 no se detecta en las células displásicas en el espécimen, es razonable suponer que esta terminación es una respuesta normal a la estimulación prolongada del sistema inmunitario. Como la displasia sigue presente, existe un riesgo moderado de evolución.

La presencia de células displásicas que expresan una citocina antiinflamatoria tal como la IL-10, puede tomarse como evidencia de que la respuesta inmunitaria local está siendo activamente suprimida y que por tanto el paciente tiene un alto riesgo de evolucionar hacia el cáncer, especialmente si las células reguladoras también están presentes.

Análisis

No es inusual que las células que expresan una citocina antiinflamatoria tales como la IL-10 sean raras, incluso en especímenes que están clasificados como HSIL y cáncer basándose en la morfología. Esto se debe en gran parte al uso de los métodos tradicionales de recogida de células que generalmente recogen células T, macrófagos y otras células del sistema inmunitario solo incidentalmente a la recogida del tipo de célula diana. Debido a que a menudo es deseable, incluso necesario, emplear muestras recogidas usando estos métodos tradicionales para producir el método descrito y reivindicado en el presente documento, es necesario optimizar los reactivos de inmunotinción y los métodos para maximizar la detección de los tipos de células diana. Una amplia diversidad de técnicas de optimización están bien establecidas en la técnica y pueden usarse. Sin embargo, se sabe que los fluoróforos tales

como los usados en la práctica de la presente invención, tienen tendencias a unirse de forma no específica a los constituyentes celulares de una manera que no se controla eficazmente mediante técnicas de optimización convencionales. Por este motivo, otro aspecto de la presente invención está dirigido a mitigar los efectos de esta unión no específica sobre la sensibilidad de la prueba.

5 La unión no específica en inmunoensayos se aborda mediante el uso de diversas combinaciones de agentes bloqueantes, detergentes, agentes caotrópicos y otros aditivos. Aunque estos métodos son generalmente eficaces para limitar o suprimir la mayoría de los tipos de uniones no específicas, su eficacia para mitigar la unión no específica de fluoróforos a constituyentes celulares no es adecuada para la práctica de esta invención. Por lo tanto, 10 el presente método utiliza tinción doble correlacionada para abordar esta deficiencia.

El formato de inmunotinción descrito previamente que incluye un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado se usa en esta descripción. Además, se supone que la etiqueta es un fluoróforo 15 seleccionado de la serie Alexa® ampliamente utilizada. Cuando se usa en las pruebas del presente método, se puede observar fácilmente que diferentes miembros de la serie Alexa® exhiben diferentes patrones de unión no específica al material celular. Por lo tanto, el patrón de tinción observado incluye la superposición de la tinción específica del analito diana y la unión no específica del fluoróforo al material celular. Si se usa un fluoróforo diferente como marcador, el patrón de tinción específico del analito seguirá siendo el mismo mientras que el patrón debido a 20 la unión no específica del fluoróforo cambiará. Esta consistencia en la tinción específica del analito en combinación con la variabilidad en la tinción no específica del fluoróforo proporciona un método para minimizar el efecto de la unión no específica del fluoróforo sobre el resultado analítico.

La tinción doble correlacionada utiliza dos alícuotas del mismo anticuerpo secundario, uno de los cuales está 25 marcado con un primer fluoróforo y el segundo está marcado con un segundo fluoróforo. A modo de ejemplo, la primera alícuota está marcada con Alexa-647®, que tiene una emisión fluorescente en la región espectral infrarroja cercana, y la segunda está marcada con Alexa-594® que tiene una emisión fluorescente en la región espectral roja. Estos dos anticuerpos secundarios marcados se combinan antes de su uso.

Como se ha descrito anteriormente, el espécimen se trata primero con un anticuerpo primario no marcado que se 30 une específicamente al analito de interés. El espécimen se trata después con los anticuerpos secundarios marcados combinados y las imágenes de la muestra se capturan en las regiones espectrales roja e infrarroja. Estas imágenes en rojo e infrarrojo se correlacionan para identificar aquellas regiones del espécimen en donde está presente el analito.

35 Si, para un área determinada, se detecta una señal baja tanto en la imagen roja como en la infrarroja, no se ha producido ninguna tinción en la ubicación correspondiente en la muestra y el analito diana no está presente en esa ubicación.

40 Si, para un área determinada, se detecta una señal alta tanto en la imagen roja como en la infrarroja, y las señales están correlacionadas, la ubicación correspondiente en la muestra se ha teñido selectivamente y el analito está presente en esa ubicación.

45 Si, para un área determinada, se detecta una señal alta en la imagen roja o infrarroja, pero no en ambos, la ubicación correspondiente en el espécimen se tiñó de manera no específica y el analito no está presente en esa ubicación.

La Figura 1 es un diagrama de dispersión que muestra los resultados de la inmunotinción de IL-10 de una muestra 50 de HSIL negativa para IL-10. Los reactivos de detección consisten en un anticuerpo primario específico para IL-10 y una mezcla que consiste en un anticuerpo secundario marcado con Alexa-594® (fluorescencia verde) y el mismo anticuerpo secundario marcado con Alexa-647® (fluorescencia roja). 1(B): Las células muestran una baja correlación espacial (coeficiente de correlación R-G = 0,088) entre la fluorescencia roja y la verde, lo que indica una unión no específica de los anticuerpos secundarios. La fluorescencia predominantemente roja indica que estas células se unen no específicamente al anticuerpo secundario marcado con Alexa-647® con preferencia sobre el anticuerpo secundario marcado con Alexa-594®. Figura 1(A): Células morfológicamente normales y anómalas que exhiben una 55 alta correlación espacial (coeficiente de correlación R-G > 0,9) entre la fluorescencia roja y la verde. Esto indica que ambos anticuerpos secundarios marcados están unidos específicamente. Las bajas intensidades de fluorescencia en esta región indican que poca o ninguna IL-10 está presente en morfológicamente normal (cuadrados negros) o displásicos (cuadrados rojos). Figura 1(C): Las células exhiben una baja correlación espacial (coeficiente de correlación R-G = 0,67) entre la fluorescencia roja y la verde, lo que indica una unión no específica de los anticuerpos secundarios. La fluorescencia predominantemente verde indica que estas células se unen de forma no específica al anticuerpo secundario marcado con Alexa-594® preferentemente sobre el anticuerpo secundario 60 marcado con Alexa-647®.

65 La Figura 2 es un diagrama de dispersión que muestra los resultados de la inmunotinción de IL-10 de una muestra de HSIL positiva para IL-10. La tinción de estas células y su interpretación son como se describe en la leyenda de la Figura 1. Las células que presentan intensidades de fluorescencia tanto roja como verde indican una fuerte

producción de IL-10 y una alta correlación espacial (coeficiente de correlación R-G > 0,9) entre la fluorescencia roja y verde, lo que indica que la unión de los anticuerpos secundarios es específica.

- 5 La Figura 3 muestra imágenes separadas por color de la misma célula que muestran una fuerte correlación espacial (> 0,90) de la localización de los anticuerpos secundarios marcados con Alexa-594® (verde) y Alexa-647® (rojo). El azul representa la tinción del núcleo celular por DAPI. La emisión roja y verde co-localizada aparece como amarilla en esta imagen. Las imágenes separadas por color de la misma célula muestran una fuerte correlación espacial (> 0,90) de la localización de los anticuerpos secundarios marcados con Alexa-594® (verde) y Alexa-647® (rojo). El azul representa la tinción del núcleo celular por DAPI. La emisión roja y verde co-localizada aparece como amarilla en esta imagen. Las células IL-10 negativas en este conjunto de imágenes están indicadas por núcleos azules en un entorno verde (unión no específica del anticuerpo secundario marcado con Alexa 594).
- 10

Tabla 1

Muestra	Citología	Estado de VPH	HSIL positivos para IL-10	Grupos de HSIL positivos para IL-10	Displasias encontradas y evaluación de riesgos
1	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
2	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
3	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
4	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
5	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
6	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
7	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
8	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
9	Normal	Desconocido	Negativa	Negativa	Riesgo normal
10	Normal	Desconocido	Positiva	Positiva	HSIL. Alto riesgo de evolución
11	ASCUS	Positiva	Negativa	Negativa	Riesgo normal
12	ASCUS	Negativa	Negativa	Negativa	Riesgo normal
13	ASCUS	Negativa	Negativa	Negativa	Riesgo normal
14	ASCUS	Positiva	Negativa	Negativa	Riesgo normal
15	ASCUS	Positiva	Positiva	Positiva	HSIL. Alto riesgo de evolución
16	LSIL	Positiva	Negativa	Negativa	Riesgo normal
17	LSIL	Positiva	Negativa	Negativa	Riesgo normal
18	LSIL	Positiva	Negativa	Negativa	Riesgo normal
19	LSIL	LR Positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
20	LSIL	Negativa	Negativa	Negativa	Riesgo normal
21	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
22	LSIL	HR, LR Positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
23	LSIL	HR, LR Positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
24	LSIL	LR Positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
25	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
26	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
27	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
28	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
29	LSIL	Negativa	Negativa	Negativa	Riesgo normal
30	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
31	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
32	LSIL	HR, LR Positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
33	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
34	LSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo normal
35	LSIL	HR positivo	Negativa	Positiva	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
36	LSIL	Positiva	Positiva	Negativa	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
37	LSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
38	LSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución

ES 2 735 994 T3

(continuación)

Muestra	Citología	Estado de VPH	HSIL positivos para IL-10	Grupos de HSIL positivos para IL-10	Displasias encontradas y evaluación de riesgos
39	LSIL	HR, LR Positivo	Positiva	Negativa	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
40	LSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
41	LSIL	Negativa	Positiva	Positiva	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
42	LSIL	HR, LR Positivo	Positiva	Positiva	LSIL-HSIL. Alto riesgo de evolución
43	HSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo moderado de evolución
44	HSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo moderado de evolución
45	HSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo moderado de evolución
46	HSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo moderado de evolución
47	HSIL	HR positivo	Negativa	Negativa	Riesgo moderado de evolución
48	HSIL	Positiva	Negativa	Positiva	Alto riesgo de evolución
49	HSIL	Desconocido	Negativa	Positiva	Alto riesgo de evolución
50	HSIL	HR positivo	Negativa	Positiva	Alto riesgo de evolución
51	HSIL	Desconocido	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
52	HSIL	Desconocido	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
53	HSIL	Desconocido	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
54	HSIL	Desconocido	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
55	HSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
56	HSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
57	HSIL	HR positivo	Positiva	Negativa	Alto riesgo de evolución
58	HSIL	Positiva	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución
59	HSIL	Desconocido	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución
60	HSIL	Desconocido	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución
61	HSIL	Desconocido	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución
62	HSIL	HR positivo	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución
63	HSIL	HR positivo	Positiva	Positiva	Alto riesgo de evolución

REIVINDICACIONES

1. Un método para estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en un sujeto, comprendiendo el método:
- 5 (a) detectar y clasificar células diana displásicas en una preparación citológica a partir de una muestra biológica del sujeto, en donde las células diana son células epiteliales;
- (b) detectar y clasificar células T, células B, macrófagos y/u otras células del sistema inmunitario innato como células no diana;
- 10 (c) detectar la presencia de citocinas antiinflamatorias en células displásicas o no displásicas; y
- (d) estimar el riesgo de que la displasia evolucione a cáncer en el sujeto en función de si al menos una citocina antiinflamatoria está presente en las células displásicas o en otras detectadas en el espécimen, en donde
- (i) la ausencia de células que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo normal de evolución;
- 15 (ii) la presencia de células no diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo ligeramente aumentado de evolución;
- (iii) la presencia de células diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias indica un riesgo moderadamente aumentado de evolución; y
- 20 (iv) la presencia tanto de células diana como de células no diana que exhiben cantidades detectables de una o más citocinas antiinflamatorias, indica un riesgo mucho mayor de evolución.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las citocinas antiinflamatorias se seleccionan del grupo que consiste en TGF-beta 1 y 2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13 e IL-19.
- 25 3. El método de la reivindicación 2, en donde la citocina antiinflamatoria es IL-10.
4. El método de la reivindicación 1, en donde las células displásicas se tiñen con una o más tinciones fluorogénicas y se detectan y clasifican en función de la morfología celular.

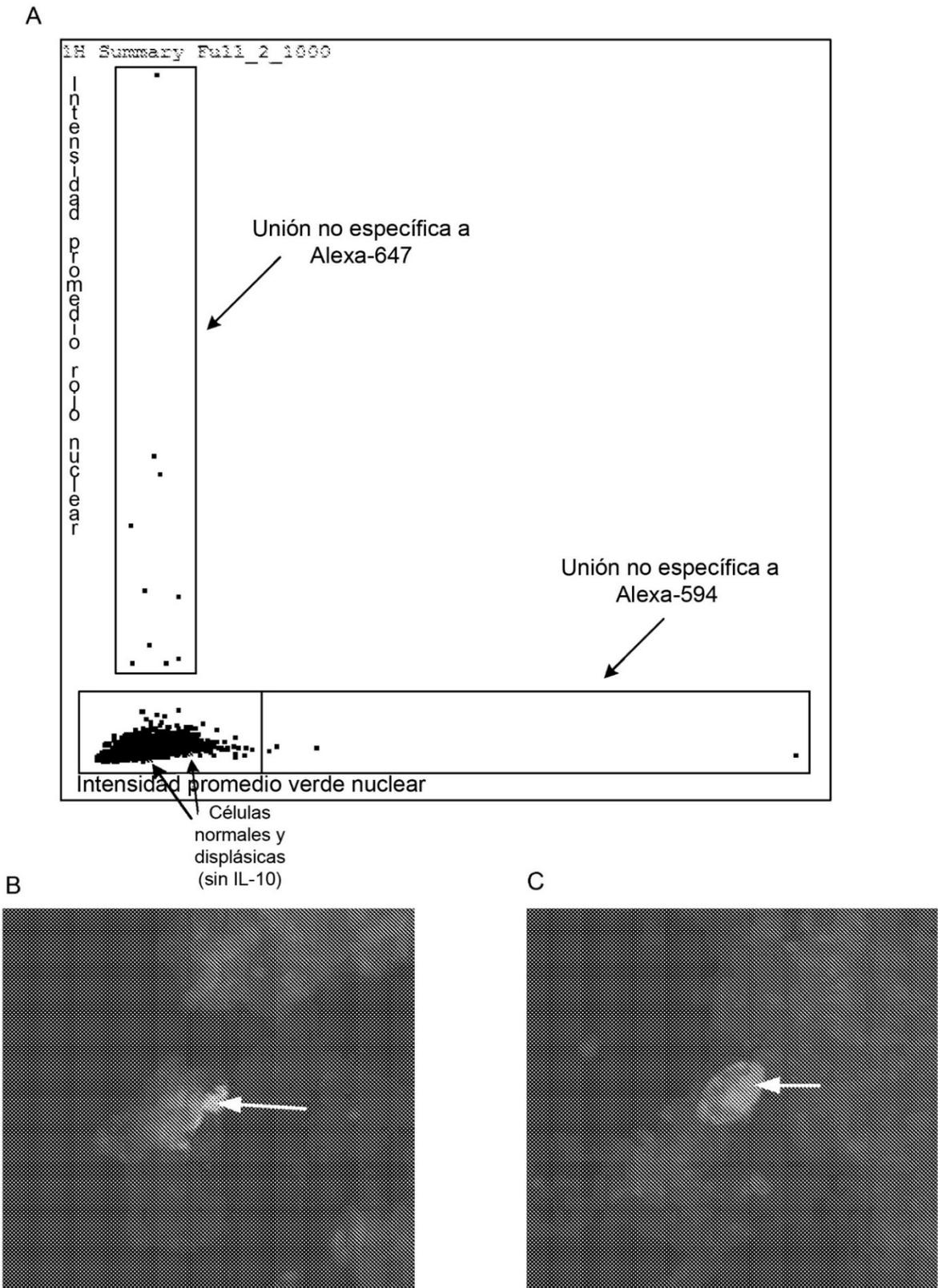


FIG. 1

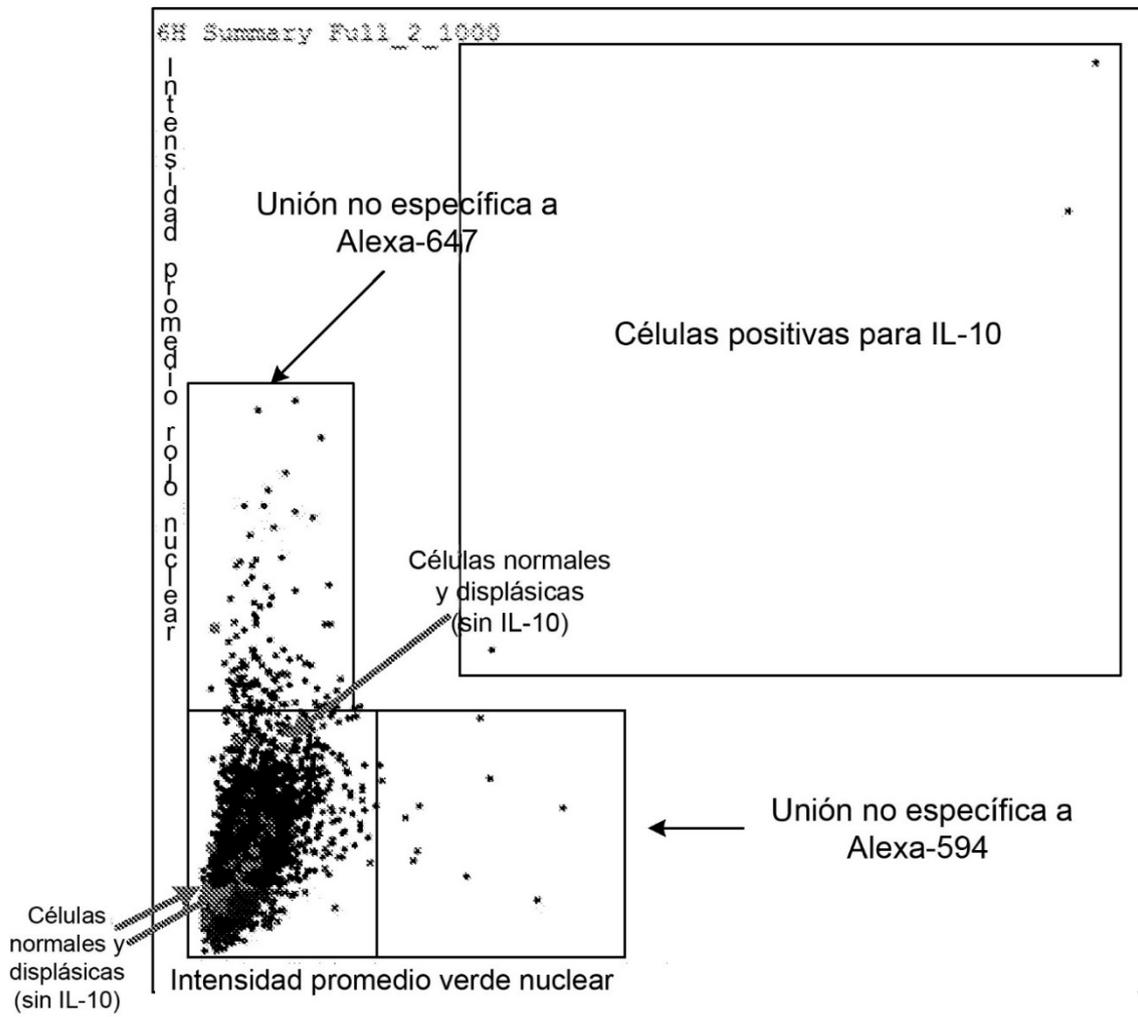


FIG. 2

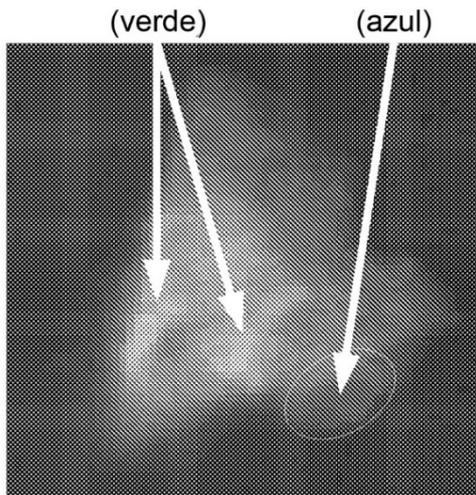


FIG. 3A

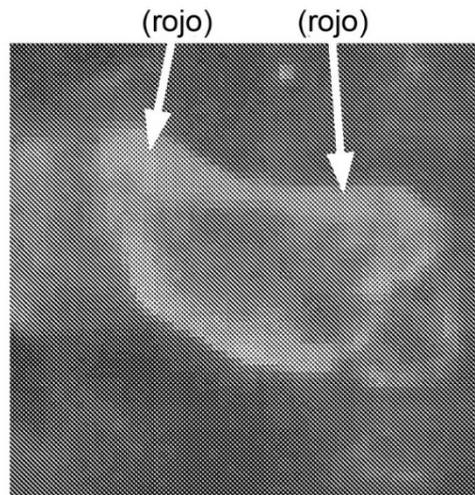


FIG. 3B

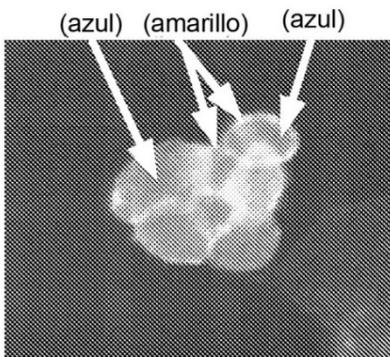


FIG. 3C

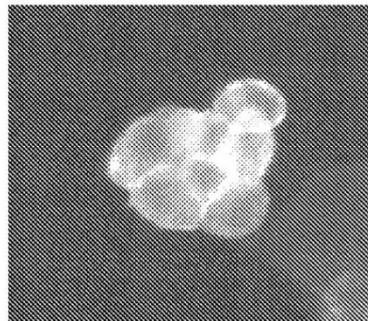


FIG. 3D

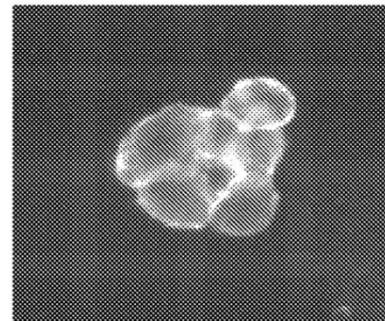


FIG. 3E

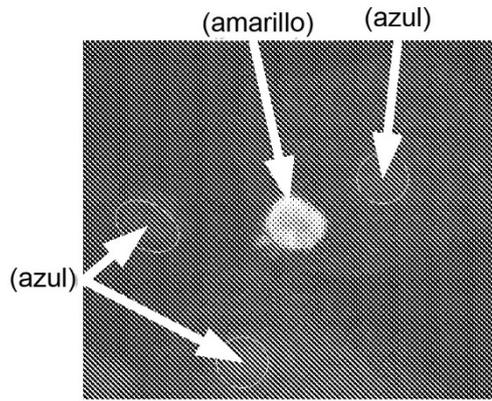


FIG. 3F

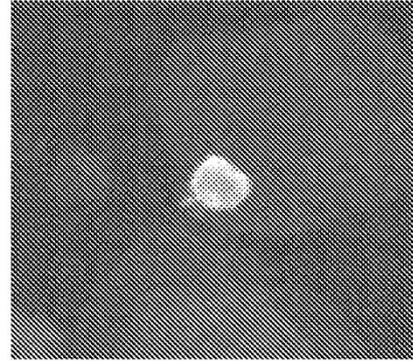


FIG. 3G

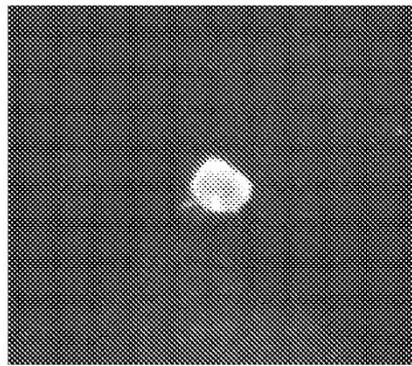


FIG. 3H