



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 922**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02716509 .1**

86 Fecha de presentación : **24.01.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1354210**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54 Título: **Método de diagnóstico del cáncer.**

30 Prioridad: **24.01.2001 SE 0100197**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **Fredrik Erlandsson
Strandvägen 53
115 23 Stockholm, SE
Anders Zetterberg**

72 Inventor/es: **Erlandsson, Fredrik y
Zetterberg, Anders**

74 Agente: **Aragonés Forner, Rafael Ángel**

ES 2 276 922 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 de diagnóstico del cáncer.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de lesiones cancerosas y precancerosas en muestras celulares e histológicas, y a la obtención de un pronóstico y de información predictiva cuando ya se ha diagnosticado un cáncer.

10 **Estado actual de la técnica**

El diagnóstico habitual del cáncer se basa en el análisis microscópico de muestras celulares e histológicas obtenidas a partir de tumores o de tejidos presuntamente tumorales. Se realiza una tinción histológica de modo que se puedan identificar las células individuales y los grupos de células. El diagnóstico habitual se basa en las propiedades morfológicas, es decir, en las alteraciones de la forma, el tamaño y las características de tinción de las células y en las irregularidades en las estructuras tisulares. El diagnóstico del cáncer se basa, por lo tanto en un análisis subjetivo de la desviación morfológica con respecto al tejido normal correspondiente.

20 Se requiere mucha formación y experiencia para alcanzar la destreza necesaria para realizar diagnósticos correctos con un nivel suficiente de seguridad. Los casos dudosos que se encuentran en el límite entre lesiones cancerosas y precancerosas, y entre lesiones precancerosas y lesiones no cancerosas, pueden suponer una dificultad incluso para los histopatólogos o citólogos con más experiencia. El problema resulta aún mayor debido a que hoy en día se detectan muchos tumores en sus fases iniciales y, por lo tanto, no presentan todavía unas características plenamente desarrolladas que sirvan como criterio para diagnosticar un cáncer. Otro aspecto del análisis morfológico es el análisis del grado malignidad del tumor (grado tumoral), sobre el que normalmente se basa la selección del tratamiento del tumor. Ello constituye un problema debido a que en muchos casos la morfología del tumor no refleja la auténtica malignidad del tumor. Teniendo esto presente resulta obvio unos nuevos procedimientos de diagnóstico y de análisis de la malignidad de un modo objetivo y cuantitativo constituirían un adelanto muy importante.

30 La transición de una célula normal a una célula cancerosa se denomina generalmente transformación y se debe a la alteración secuencial de diversos genes específicos de una célula normal. Durante la transformación la célula adquiere las propiedades de una célula cancerosa, concretamente invadir los tejidos circundantes y formar tumores derivados (metastatizar). Se han realizado avances muy importantes en el campo de la investigación experimental del cáncer en las dos últimas décadas. Se han identificado aproximadamente 50 genes de control que se pueden alterar en las células cancerosas (oncogenes). Algunos de dichos genes son hiperactivos en las células cancerosas, lo que produce una gran cantidad de señales de división celular. Otros genes de control con frecuencia se encuentran inactivos en las células cancerosas (genes oncoinhibidores). En las células normales los genes oncoinhibidores habitualmente equilibran las señales estimuladoras de la proliferación por parte de los oncogenes. No se ha identificado todavía una única alteración genética completamente específica del cáncer. Por lo tanto, nos hemos centrado en descubrir una combinación de propiedades, siendo dicha combinación por sí misma anormal en las células cancerosas.

45 Se han realizado avances importantes durante la última década en la investigación del ciclo celular, es decir, en la investigación sobre la coordinación entre la replicación del genoma y la división celular. Se han identificado los componentes centrales de los mecanismos del ciclo celular y se ha descubierto que se han conservado durante por lo menos mil millones de años de evolución. Los componentes resultan de importancia universal en las levaduras, las plantas y los animales. Se ha obtenido una visión general de los procesos implicados en el control del ciclo celular. Dos tipos principales de procesos bioquímicos regulan el ciclo celular. Uno de ellos es la fosforilación reversible, es decir, grupos fosfato que se enlazan o se separan de las proteínas de actuación, cambiando por lo tanto la estructura y la función de dichas proteínas. Dicho proceso se encuentra controlado mediante unas proteínas denominadas cinasas. Las cinasas principales en la regulación del ciclo celular son las denominadas cinasas ciclinodependientes (CDKs), cuya actividad se encuentra regulada por las proteínas ciclinas. El segundo proceso es la muy regulada síntesis y degradación de las proteínas ciclinas. Las dos ciclinas importantes en la presente solicitud son la ciclina E y la ciclina A.

55 Se ha supuesto previamente que el ciclo celular funciona del mismo modo en las células cancerosas que en las células normales y que es principalmente el mecanismo de control de la proliferación (la transmisión de las señales reguladoras de la proliferación que provienen del exterior celular dirigidas al genoma del núcleo celular) lo que resulta defectuoso. El sorprendente descubrimiento de que el propio ciclo celular se ve alterado en el cáncer rápidamente se ha convertido de una importancia relevante en la investigación del cáncer y es una causa posible de la inestabilidad cromosómica que se observa en las células cancerosas. Por lo tanto, tanto la proliferación descontrolada como la inestabilidad cromosómica de las células tumorales parecen estar provocadas por una regulación defectuosa del ciclo celular. Dicha nueva información sobre el ciclo celular y el control defectuoso del ciclo celular en las células tumorales presenta el potencial de ser utilizado en los diagnósticos futuros del cáncer.

65 El ciclo celular se divide en distintas fases en función de la replicación del genoma y la división celular. La fase de división celular, durante la que se dividen los cromosomas entre las dos nuevas células hija, se denomina fase M (mitosis). Entre cada fase M la célula copia su genoma mediante la síntesis del ADN (denominada también replicación

del ADN). La fase durante la que el ADN se copia se denomina fase S (fase de síntesis del ADN). Entre la fase M y la fase S se pueden identificar otras dos fases. La primera de ellas, es decir, el intervalo entre la fase M y la fase S, se denomina G_1 . El segundo intervalo, es decir, el intervalo entre la fase S y la fase M, se denomina G_2 . El ciclo celular completo, por lo tanto, comprende las fases M - G_1 - S - G_2 - M, véase figura 1. Una célula recién nacida con la división inicia su nuevo ciclo celular en la fase G_1 . Si decide dividirse de nuevo continúa con la fase G_1 y entra en la fase S, durante la que copia su ADN. Cuando se ha sintetizado una copia completa del genoma la célula pasa a la fase G_2 , durante la que se prepara para la mitosis (fase M). A continuación la célula entra en la fase M, durante la que se separan los cromosomas hacia cada una de las nuevas células hija que se han formado durante la división celular. Las células hija se encuentran de nuevo en la fase G_1 habiéndose completado el ciclo celular. Tanto las células normales como las células cancerosas pasan por las fases del ciclo celular descritas anteriormente.

La mayoría de las células de los organismos pluricelulares, por ejemplo del hombre, se encuentran en un estado latente (de reposo) denominado G_0 . Las células pueden permanecer en la fase G_0 durante largos períodos y entran en G_1 como respuesta a señales estimuladoras de la proliferación. En algunos tejidos prácticamente todas las células se encuentran en G_0 , por ejemplo en el tejido muscular o nervioso. Otros tejidos, por ejemplo, los tejidos intestinales, la piel, la médula ósea, los tejidos embrionarios y los tejidos tumorales, comprenden células tanto en G_0 como en el ciclo celular (fases G_1 , S, G_2 y M).

Se han realizado grandes esfuerzos para descubrir qué factores y procesos controlan el paso de una fase del ciclo celular a la siguiente, tal como el paso de la fase G_1 a la fase S. Se han identificado proteínas que se encuentran únicamente presentes en fases específicas del ciclo celular. Una de dichas proteínas es la ciclina E, que fue descubierta en 1991 por Lew *et al.*, véase Lew, D. J., Dulic, V., Reed, S. I., *Isolation of three novel human cyclins by rescue of G_1 cyclin (Cln) function in yeast* ("Aislamiento de tres nuevas ciclinas humanas mediante el rescate de la función de la ciclina G_1 (Cln) en levaduras"), *Cell* 66, páginas 1197 - 1206, 1991. La proteína ciclina E se expresa de un modo específico en el ciclo celular. Los estudios han demostrado que la ciclina E de las células normales se encuentra presente en el núcleo celular únicamente durante la última parte de la etapa G_1 y la primera parte de la etapa S. Otra proteína que guarda relación con la expresión específica del ciclo celular es la ciclina A, que aparece cuando la célula entra en la etapa S y permanece en el núcleo celular hasta la etapa M, véase Pines, J., Hunter, T., *Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B* ("La ciclina humana A es una proteína p60 asociada al adenovirus E1A y presenta un comportamiento distinto de la ciclina B"), *Nature* 346, páginas 760 - 763, 1990, y Erlandsson, F., Linnman, C., Ekholm, S., Bengtsson, E., Zetterberg, A., *A detailed investigation of cyclin A accumulation at the G_1/S border in normal and transformed cells* ("Investigación detallada de la acumulación de ciclina A en el límite G_1/S en células normales y transformadas"), *Experimental Cell Research* 259, páginas 86 - 95, 2000.

Se ha demostrado que la ciclina E se encuentra en unos niveles irregularmente elevados en algunos tumores y en estirpes celulares obtenidas a partir de tumores, véase Keyomarsi, K., Pardee, A. B. *Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells* ("Sobrexpresión excesiva de la ciclina y amplificación génica en células de cáncer de mama"), *Proc Natl Acad Sci*, EE. UU. 90, páginas 1112 - 1116, 1993. El nivel de ciclina E se determinó en las células en un cultivo sincronizado con las distintas etapas del ciclo celular. A pesar de que el ciclo celular se altera por la sincronización, los datos indican que la ciclina E se expresa no únicamente en la etapa G_1 en las células tumorales del cultivo. El presente método no se puede utilizar, sin embargo, para estudiar las pautas de expresión de la ciclina E en el ciclo celular de los tejidos tumorales. Se puede aplicar únicamente a células tumorales experimentales que se hacen proliferar en cultivos.

En el año 1994, Keyomarsi *et al.* demostraron que en los tumores se encontraban moléculas defectuosas de ciclina E y que la presencia de dichas moléculas defectuosas de ciclina E puede constituir una indicación de un mal pronóstico, véase Keyomarsi, K., O'Leary, N., Molnar, G., Lees, E., Fingert, H. J., Pardee, A. B., *Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer* ("La ciclina E, un indicador potencial de la prognosis del cáncer de mama"), *Cancer Research* 54, páginas 380 - 385, 1994. En dicho estudio se investigaron biopsias histológicas obtenidas a partir de cáncer humano. Keyomarsi *et al.* descubrieron que los tejidos tumorales comprendían más ciclina E que los tejidos circundantes normales. También descubrieron formas defectuosas de la molécula de la ciclina E en algunos tumores. Los autores proponen una relación entre la malignidad del tumor y los niveles de ciclina E y de ciclina E defectuosa en el tumor. Sin embargo, mediante el método utilizado no se pudo determinar si los niveles aumentados de ciclina E se debían simplemente a un mayor número de células que se encontraban en el ciclo celular en el tumor o se debían a una expresión anormal de la ciclina E. Los estudios se realizaron mediante el método bioquímico e inmunológico denominado "*western blot*". En dicho método se utiliza una muestra de tejido presuntamente tumoral, que comprende una mezcla de células normales en proliferación y latentes y células cancerosas. Se homogeneiza la muestra histológica y a continuación se aísla la mezcla proteica de la mezcla. Dicha mezcla proteica se pasa a continuación por un gel que separa las distintas proteínas en función de su tamaño y/o carga eléctrica. Posteriormente se señala la proteína de interés utilizando un anticuerpo específico para dicha proteína y se marca con un isótopo radiactivo o un color. El principal inconveniente de dicho método cuando se aplica a muestras presuntamente tumorales en un ámbito clínico es que no resulta posible determinar si la ciclina E detectada se origina a partir de las células normales o a partir de las células tumorales de la muestra histológica.

Se han realizado diversos estudios más sobre la utilización de los niveles de ciclina E en muestras histológicas como herramienta de diagnóstico durante los últimos cinco años. Las investigaciones se realizaron utilizando tanto las técnicas de inmunotransferencia (*western blot*), que tal como se ha descrito anteriormente determinan el nivel de

proteína total en la muestra, como basándose en técnicas inmunohistoquímicas, mediante las que se puede determinar la frecuencia de células del tejido tumoral que contienen ciclina E. El principal inconveniente de la técnica de inmunotransferencia (*western blot*) es que no puede distinguir si un nivel elevado de ciclina E en la muestra tumoral es el resultado de una sobreexpresión o de una alteración del ciclo celular. Además, no se puede utilizar para detectar un número reducido de células cancerosas en una población grande de células normales, lo que habitualmente ocurre con las muestras histológicas clínicas. A fin de obtener una muestra que comprenda únicamente células tumorales algunos equipos de investigación han utilizado técnicas de microdissección para obtener una muestra parcialmente purificada que comprenda principalmente células tumorales. Sin embargo, la microdissección es un procedimiento muy pesado y se basa en procedimientos de diagnóstico morfológico. Una técnica eficaz de diagnóstico se ha de poder aplicar incluso a muestras de las que aún se desconoce si comprenden células tumorales. Las distintas variaciones de la técnica de inmunotransferencia (*western blot*) resultan científicamente muy interesantes, pero los procedimientos generalmente requieren mucho tiempo y la inmunotransferencia (*western blot*) es una técnica demasiado contundente para que resulte posible utilizarla en diagnósticos clínicos.

Un modo alternativo de investigar la presencia de ciclina E es mediante la utilización de procedimientos de tinción inmunohistoquímica. En dichos procedimientos se incubaba la muestra con anticuerpos contra la ciclina E que se pueden teñir. Posteriormente las células de la muestra que contienen ciclina E se pueden detectar utilizando un microscopio. Un número aumentado de células de la muestra que comprenden ciclina E podría tanto representar un número aumentado de células en 1 proliferación, es decir, que se encuentran en el ciclo celular, como reflejar una alteración del ciclo celular en relación con la expresión de la ciclina E, es decir, que se expresa la ciclina en fases del ciclo celular distintas de la etapa G₁. No resulta posible distinguir entre dichas dos alternativas analizando únicamente la ciclina E sin conocer la situación del ciclo celular de las células que contienen ciclina E. Se han realizado intentos de conseguir información sobre la proliferación tiñendo una muestra paralela en relación con otro marcador del ciclo celular tal como la ciclina A (véase Dutta, A., Chandra, R., Leiter, L. M., Lester, S. 1995 *Cyclins as markers of tumour proliferation: Immunocytochemical studies in breast cancer* ("Las ciclinas como marcadores de la proliferación tumoral: Estudios inmunocitoquímicos en el cáncer de mama"). *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 92, páginas 5386 - 5390). Ello puede proporcionar una información adicional sobre la actividad proliferativa del tumor, pero la información sobre alteraciones del ciclo celular en relación con las pautas de expresión de la ciclina E se puede obtener únicamente combinando la tinción de la ciclina E con la tinción de un marcador del ciclo celular en las células individuales, tal como se propone a continuación.

Sumario de la invención

La invención que se presenta en la presente solicitud se basa en el hecho de que la ciclina E se regula irregularmente en el ciclo celular de las células cancerosas, es decir, la ciclina E se encuentra presente en fases del ciclo celular incorrectas. En las células normales, la ciclina E se encuentra únicamente presente en el núcleo celular durante la etapa G₁ tardía y en la etapa S temprana, mientras que en las células cancerosas aparece durante toda la etapa S e incluso en la etapa G₂. Ello ha supuesto la posibilidad de desarrollar un procedimiento de diagnóstico basado en la presencia anormal de la ciclina E en las últimas etapas del ciclo celular (S tardía y G₂) de las células cancerosas.

La presente invención, por lo tanto, se refiere a un método de análisis del cáncer en el que la presencia de una o más proteínas del tipo de la ciclina E y sustancias posteriores a la etapa G₁ seleccionadas de entre la ciclina A, el PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y la bromo desoxiuridina, en una misma célula, constituye una indicación de una enfermedad relacionada con el cáncer. La presente invención se refiere asimismo a un método para analizar el grado de malignidad detectando la cantidad de células que comprenden tanto proteínas del tipo de la ciclina E como sustancias posteriores a la etapa G₁.

Descripción de la presente invención

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento por el que resulta posible diagnosticar un cáncer en una muestra histológica determinando en las células individuales si se produce una expresión irregular en el ciclo celular de "proteínas del tipo de la ciclina E". Ello significa que las "proteínas del tipo de la ciclina E" se encuentran presentes en las últimas etapas del ciclo celular, es decir, que las "proteínas del tipo de la ciclina E" permanecen durante la mayor parte de la etapa S y/o se encuentran presentes durante la etapa G₂. El presente método se basa, por lo tanto, en el conocimiento que las células normales degradan sus "proteínas del tipo de la ciclina E" en la etapa S temprana y únicamente los núcleos de las células cancerosas contienen "proteínas del tipo de la ciclina E" durante toda la etapa S, e incluso a veces en la etapa G₂. Dicho método es una combinación de dos determinaciones realizadas en la misma célula mediante, por ejemplo, una técnica inmunohistoquímica, combinándose la determinación del nivel de "proteínas del tipo de la ciclina E" en células individuales con la 1 determinación de la situación del ciclo celular (G₁, S o G₂) de cada una de las células analizadas. Si aparecen "proteínas del tipo de la ciclina E" en la etapa S tardía y/o en la etapa G₂ en un número elevado de células de la muestra celular o histológica analizada, entonces se trata de células cancerosas. La información en relación con el porcentaje de células que se encuentran en la etapa S tardía o en la etapa G₂ que contienen "proteínas del tipo de la ciclina E" no resulta únicamente útil para realizar un diagnóstico preciso, sino que resulta valioso para el pronóstico, es decir, puede proporcionar información de la malignidad de las células tumorales. Esto es cierto debido a que es probable que una población de células tumorales con 0 más células con una regulación irregular del ciclo celular es más maligna que una población de células tumorales con un control menos irregular del ciclo celular. El conocimiento del grado de malignidad del tumor individual resulta muy importante en la selección del tipo de tratamiento.

A lo largo de la presente memoria las “proteínas del tipo de la ciclina E” se definen como la proteína E (tanto las moléculas de ciclina E defectuosas como normales) así como otras proteínas que de un modo similar a la ciclina E se eliminan del núcleo celular en la etapa S temprana, pero permanecen un período más largo en las células cancerosas. Por lo tanto, las “proteínas del tipo de la ciclina E” se encuentran presentes en el núcleo celular de las células normales únicamente durante la etapa G₁ y la primera parte de la etapa S. Dichas “proteínas del tipo de la ciclina E” comprenden principalmente dos isoformas de ciclina E, denominadas ciclina E1 y ciclina E2. Las pautas de expresión de la ciclina E en las células normales y tumorales se ilustran en la Figura 2. Otros ejemplos de dichas “proteínas del tipo de la ciclina E” son formas mutadas de ciclina E con unos pesos moleculares de 42 y 35 kDa descritas por Keyomarsi, tal como se ha mencionado anteriormente, y otras proteínas no relacionadas con la ciclina E, pero con unas pautas de expresión similares a las de la ciclina E en las células normales y cancerosas.

Los niveles de las “proteínas del tipo de la ciclina E” se determinan en cada célula individual mediante una técnica de inmunohistoquímica. Véase Brandtzaeg, P., Halstensen, T. S., Huitfeldt, H. S., y Valnes, K. N. (1997) *Immunohistochemistry: A practical approach 2* (“Inmunohistoquímica: un enfoque práctico 2”). Editores Johnstone, A. P. y Turner, M. W., IRL, Oxford, páginas 71 - 130, para un examen excelente de muchos de los diversos métodos inmunohistoquímicos disponibles. Las células individuales que contienen “proteínas del tipo de la ciclina E” se pueden detectar tanto en muestras histológicas como en células en suspensión utilizando un microscopio o un citómetro de flujo. Las pautas de expresión de las “proteínas del tipo de la ciclina E” durante el ciclo celular se pueden realizar teóricamente de distintos modos. En Gong, J. *et al.* (1994) *Cancer Research* 54 (16), páginas 4285 - 4288, se utiliza la cantidad de ADN de cada célula para determinar la situación del ciclo celular junto con la determinación de los niveles de ciclina E. Sin embargo, un factor extremadamente limitante de su procedimiento es que la cantidad de ADN de la célula se puede utilizar únicamente como marcador de la situación del ciclo celular cuando se analizan células estrictamente diploides, es decir, células con 46 cromosomas en las que una célula en fase G₁ presenta 2c unidades relativas de ADN (aproximadamente 6 pg de ADN) y una célula en fase G₂ presenta 4c unidades relativas de ADN. Las células que se encuentran en la etapa S por lo tanto presentan unas unidades relativas de ADN comprendidas entre 2c y 4c, ya que se encuentran copiando su ADN. El problema consiste en que las células tumorales son con frecuencia aneuploides, es decir, que no presentan exactamente 46 cromosomas y, por lo tanto, no contienen exactamente 2c unidades de ADN en la fase G₁. Además, el grado de aneuploidía de una población de células tumorales con frecuencia varía considerablemente y las células que se encuentran en la etapa G₁ pueden presentar un contenido en ADN comprendido entre 1,5c y > 6c en un único tumor (véase, por ejemplo, Forsslund *et al.*, *Cancer*, 15 de octubre de 1996, 78(8), páginas 1748 - 55 o Auer G. *et al.*, *Anal Quant Cytol Histol*, mayo de 1987; 9(2), páginas 138 - 46). Ello naturalmente hace imposible aplicar el método descrito por Gong *et al.* en una amplia mayoría de los tumores humanos y es el principal motivo por el que el trabajo presentado por Gong *et al.* no es relevante en la presente solicitud. En cambio hemos desarrollado un método para determinar la situación del ciclo celular que es independiente del contenido en ADN. Nuestro método se basa en el análisis del contenido de un marcador específico del ciclo celular mediante la tinción de una sustancia que se encuentra únicamente presente durante la etapa S y/o la etapa G₂ en las células cancerosas. Las proteínas que se encuentran únicamente presentes en la célula o en el núcleo celular exclusivamente durante la etapa S y/o la etapa G₂ se denominan en la presente memoria “sustancias posteriores a la etapa G₁”. Las “sustancias posteriores a la etapa G₁” que se utilizan según la presente invención son la ciclina 3 A, el PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y la bromo desoxiuridina (BrdU) en poblaciones celulares a las que contienen BrdU.

La tinción simultánea de las “proteínas del tipo de la ciclina E” y las “sustancias posteriores a la etapa G₁” permite obtener imágenes citométricas o realizar determinaciones de los niveles de las “proteínas del tipo de la ciclina E” y las “sustancias posteriores a la etapa G₁” por citometría de flujo en los mismos núcleos celulares. Las imágenes o las determinaciones realizadas por citometría de flujo se pueden analizar utilizando principalmente distintos métodos. Se pueden segmentar las imágenes, por ejemplo, con umbrales de escala de grises simple, mediante la clasificación según la máxima probabilidad o mediante algoritmos *Watershed*. Véase Gonzales, R. C., Woods, R. E., 1993, *Digital Image Processing*, Addison-Wesley, Nueva York, capítulo 7, para un examen de los métodos de segmentación de imágenes más disponibles en la actualidad. La clasificación de las células analizadas en células con tinción positiva o negativa en relación con cada tinción se puede realizar también utilizando una amplia variedad de métodos fácilmente disponibles, tales como la clasificación de Bayes, la clasificación basada en redes neurales, la clasificación que nosotros presentamos en Erlandsson, F., Linnman, C., Ekholm, S., Bengtsson, E., Zetterberg, A., 2000, *Exp Cell Res* 259, páginas 86 - 95, o cualquier otro método fiable con el que se puedan dividir las células en negativas y positivas. Véase Gonzales, R. C., Woods, R. E., 1993, *Digital Image Processing*, Addison-Wesley, Nueva York, capítulo 9, para un examen de algunos de los métodos de clasificación más conocidos. Además, la clasificación no resulta siempre necesaria, sino que en su lugar se pueden utilizar directamente en el análisis estadístico los valores reales obtenidos que representan la intensidad de tinción en cada célula. Al calcular la correlación entre el nivel obtenido de “proteínas del tipo de la ciclina E” y de “sustancias posteriores a la etapa G₁” resulta posible distinguir las poblaciones de células normales de las poblaciones de células cancerosas, y las poblaciones celulares menos malignas de las poblaciones celulares más malignas. Los citómetros de flujo se encuentran equipados habitualmente con software que contiene los algoritmos adecuados para el análisis de las intensidades de tinción obtenidas. Finalmente se puede realizar el análisis de las muestras teñidas manualmente por parte de un observador que simplemente cuenta las células y decide subjetivamente mediante un análisis visual si una célula contiene “proteínas del tipo de la ciclina E” y/o “sustancias posteriores a la etapa G₁”.

Mediante el análisis estadístico de si aparecen “proteínas del tipo de la ciclina E” y “sustancias posteriores a la etapa G₁” en un porcentaje aumentado de células de la población se puede decidir si se encuentran células cancerosas en la muestra analizada y el grado de malignidad de las células cancerosas. El porcentaje de células que se encuentran

en la etapa S o en la etapa G₂ que contienen ciclina E es elevado en las células cancerosas con un grado de malignidad elevado y reducido en las poblaciones células normales, en general superior al 40% en tumores con un grado de malignidad elevado e inferior al 10% en tejidos normales. Los porcentajes exactos varían en función del tipo de tumor, el procedimiento de obtención de la muestra y los procedimientos de tinción y análisis utilizados. Dichas variables se han de determinar con antelación, antes de utilizar el método de un modo sistemático. Una ventaja importante de la presente invención es que significa un método que resulta independiente de la proliferación del tejido analizado. En cambio, el método depende del porcentaje de células que son positivas simultáneamente en relación con las “proteínas del tipo de la ciclina E” y las “sustancias posteriores a la etapa G₁” y, por lo tanto, determina la presencia de células con una regulación irregular del ciclo celular.

Una ventaja importante de nuestro método es que permite una determinación objetiva y cuantitativa de si el cáncer se encuentra presente o no. Por lo tanto, el presente método se puede desarrollar como una prueba para el cáncer automatizada y rápida con una gran capacidad. Otra ventaja adicional es la elevada sensibilidad del presente método, es decir, resulta suficiente para detectar incluso un número muy reducido de células en la etapa S con “proteínas del tipo de la ciclina E”. Además, la muestra no se destruye durante el análisis cuando se realiza tal como se ha descrito en la presente memoria, lo que hace posible investigar casos de interés especial mediante un análisis microscópico tradicional, con el que se pueden examinar células que se encuentran en la etapa S o en la etapa G₂ que contengan “proteínas del tipo de la ciclina E”. Dichas propiedades, que resultan adecuadas para la automatización y la alta sensibilidad, hacen que el presente método resulte ideal para una identificación sistemática. Un ejemplo lo constituye los estudios citológicos cervicouterinos, en los que se ha de detectar un pequeño número de células alteradas.

Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra una representación esquemática del ciclo celular y sus fases.

La Figura 2 ilustra la pauta de expresión de la ciclina E y de la ciclina A durante el ciclo celular de una célula normal (superior) y de una célula cancerosa (inferior). Obsérvese que la ciclina E y la ciclina A se expresan de un modo secuencial en la célula normal, mientras que las pautas de expresión la ciclina E y de la ciclina A se superponen, es decir, la ciclina E y la ciclina A se expresan simultáneamente durante la fase S en la célula cancerosa.

La Figura 3 ilustra la distribución de la expresión de la ciclina E y de la ciclina A en un epitelio cervicouterino normal. Cada punto representa una célula individual. Compárese con la Figura 2.

La Figura 4 ilustra la distribución de la expresión de la ciclina E y de la ciclina A en un tumor canceroso cervicouterino que presenta un grado de malignidad menor, encontrándose la paciente todavía viva y en buen estado 6 años después del tratamiento. Cada punto representa una célula individual. Compárese con la Figuras 2 y 3.

La Figura 5 ilustra la distribución de la expresión de la ciclina E y de la ciclina A en un tumor canceroso cervicouterino que presenta un grado de malignidad elevado, habiendo fallecido la paciente antes de 3 años tras el tratamiento primario. Cada punto representa una célula individual. Compárese con la Figuras 2, 3 y 4.

Descripción de una aplicación

A continuación se presentan un par de ejemplos del método descrito según la presente invención y respaldados por las figuras. En los ejemplos posteriores se utiliza la ciclina E como ejemplo de “proteína del tipo de la ciclina E” y la ciclina A se utiliza como ejemplo de “sustancia posterior a la etapa G₁”.

La tarea consiste en utilizar el método según la presente invención para determinar el nivel de ciclina E en las células individuales analizadas, determinando al mismo tiempo la situación del ciclo celular de cada célula individual analizada. En un ejemplo se utiliza la técnica inmunohistoquímica de doble tinción para teñir las células obtenidas a partir de biopsias de carcinoma cervicouterino de pacientes que todavía no se han sometido a tratamiento. No se presentan diferencias técnicas importantes entre realizar el presente procedimiento en las células en un cultivo monocapa, o en una muestra citológica, o en células de cortes de una muestra histológica. Manipulándolos de un modo sistemático, es decir, fijándolos con formaldehído e incluyéndolos con parafina, se estudiaron los cortes histológicos obtenidos de pacientes con carcinoma cervicouterino a fin de realizar un análisis de la pauta de expresión de la ciclina E *in vivo*. Los cortes histológicos se realizaron con un espesor de 0,4 μm . Se incubaron los cortes durante la noche a 47°C para que se adhirieran al portaobjetos para el microscopio Superfrost Plus de Menzler Gläser. Se almacenaron los cortes a -20°C y se extrajo la parafina paso a paso en una serie de alcoholes de graduación progresiva antes de proceder con la tinción. La recuperación antigénica se realizó al cocer dos veces los cortes durante 5 minutos en una disolución amortiguadora de citrato a un pH de 6.0 utilizando un horno microondas.

Se tiñeron los cortes histológicos utilizando el anticuerpo monoclonal de la ciclina E (HE12) y un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la ciclina A (H-432) obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron comprendían un anticuerpo anti conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y un anticuerpo anti ratón conjugado con el fluorocromo Cy3 obtenidos de Jackson ImmunoResearch. Se realizaron las siguientes etapas a temperatura ambiente excepto cuando se indique lo contrario. Antes de teñir los cortes se lavaron en una disolución amortiguadora de lavado (NaCl 0,3 mM y Tween 20 al 0,02% en una disolución amortiguadora que comprendía Tris-HCl 0,05 mM a un pH de 7,6) durante 10 minutos y a continuación se realizó

ES 2 276 922 T3

una incubación durante 15 minutos en una disolución amortiguadora de bloqueo (seroalbúmina bovina al 1% y Tween 20 al 0,5% disuelto en PBS) para bloquear los enlaces no específicos de los anticuerpos primarios. De este modo se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en una disolución amortiguadora de bloqueo durante 48 horas a 4°C. Se eliminaron los anticuerpos que no se habían enlazado o aquellos con enlaces no específicos realizando 3 veces durante 15 minutos un lavado exhaustivo en una disolución amortiguadora de lavado.

Para bloquear los enlaces no específicos de los anticuerpos secundarios se incubaron los cubreobjetos con suero de asno al 4% diluido en una disolución amortiguadora de bloqueo durante 30 minutos. Los anticuerpos secundarios, diluidos en suero de asno al 4%, se añadieron durante una incubación realizada durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron 3 veces durante 15 minutos las preparaciones en una disolución amortiguadora de lavado.

Finalmente se realizó el montaje de las preparaciones para el microscopio de fluorescencia en un medio de montaje Vectashield que comprendía DAPI (4'6-diamidino-fenilindol, H-1200 obtenido en Vector Laboratories Inc). El DAPI se une con el ADN y permite la identificación de los núcleos celulares individuales de la muestra. Con ello se llegó a un número final de fluoróforos utilizados en el experimento de tres: el FITC para la ciclina A, el Cy3 para la ciclina E y DAPI para el ADN.

Cuando se ilumina o se excita cada fluoróforo, utilizando luz de una determinada longitud de onda, responde emitiendo luz, se produce fluorescencia, en otra longitud de onda específica. Resulta posible determinar el nivel de fluorescencia emitido por cada fluoróforo utilizando un microscopio equipado con filtros lumínicos intercambiables de excitación y emisión y una cámara. De este modo se puede realizar una determinación semicuantitativa de la concentración de ciclina E y de ciclina A en cada núcleo celular.

Todas las muestras microscópicas teñidas se encuentran acompañadas por un control negativo que consiste en una muestra microscópica idéntica en relación con el tipo celular, fijación y período de almacenaje. Los controles negativos se sometieron al mismo procedimiento de tinción, excluyendo únicamente los anticuerpos primarios y utilizando en su lugar la disolución amortiguadora de bloqueo. Todos los controles negativos presentaron un nivel muy bajo de tinción nuclear no específica en comparación con las muestras microscópicas teñidas.

Las imágenes de los tumores se obtuvieron utilizando un objetivo de inmersión Zeiss Plan-Neofluoar de 63x en un sistema Delta Vision, producido por Applied Precision Inc, Issaquah, WA. El sistema consiste en una lámpara de mercurio con un sistema de iluminación de fibra óptica, una óptica de microscopio convencional, filtros selectivos para excitación y emisión, y una cámara refrigerada de dispositivo de transferencia de carga (CCD) obtenida en Photometrics Ltd, Tucson, AZ. Las imágenes captadas presentaron una resolución de 0,2 μm . La segmentación de imágenes y la obtención de datos se realizó utilizando el software de proceso de imágenes IMP, y las determinaciones de la intensidad de tinción se analizaron utilizando los programas Matlab o Excel. Se analizaron entre 800 y 3000 células en cada muestra.

El análisis de las imágenes se inició eliminando la fluorescencia de fondo de las imágenes. A continuación se utilizaron las imágenes del DAPI para realizar una segmentación, durante la que se definió cada núcleo celular individual de las imágenes. A continuación se aplicaron las máscaras creadas durante la segmentación a las imágenes del FITC (ciclina A) y del Cy3 (ciclina E), y de este modo se pudo calcular la fluorescencia emitida por cada uno de dichos fluoróforos en cada célula individual. Obsérvese que la tinción del ADN con DAP se utilizó exclusivamente para definir los núcleos celulares y no se encontraba implicada en la determinación de la situación del ciclo celular.

Ahora se podía determinar qué células analizadas se encontraban en la etapa S o en la etapa G₂ utilizando el contenido en ciclina A como marcador de dichas células. Las Figuras 3, 4 y 5 ilustran los resultados principales. Los diagramas ilustran la distribución de la ciclina A y la ciclina E obtenidas de tres muestras histológicas distintas. La Figura 3 ilustra el caso de un epitelio cervicouterino normal, la Figura 4 ilustra el caso de un tumor con un grado menor de malignidad (la paciente todavía está viva 6 años tras el tratamiento), y la Figura 5 ilustra el caso de un tumor que presenta un grado de malignidad elevado, (la paciente falleció antes de 3 años tras el tratamiento).

Los diagramas ilustrados en las Figuras 3 a 5 demuestran claramente la diferencia de cómo los niveles de ciclina E y de ciclina A se encuentran relacionados en cada uno de los tres casos. Las células de carcinomas cervicouterinos con un contenido elevado en ciclina A (es decir, células que se encuentran en la etapa S o en la etapa G₂) contienen claramente más ciclina E que las células normales de epitelio cervicouterino. Cuanto mayor es la malignidad de las células tumorales más irregular es la pauta de expresión de la ciclina. Un porcentaje muy elevado de células en la etapa S y en la etapa G₂ presentan unos niveles elevados de ciclina E. El presente procedimiento, que hace posible detectar claramente diferencias en las pautas de expresión de la ciclina a lo largo del ciclo celular, constituye la esencia de la presente invención.

El presente método tiene el potencial de convertirse rápidamente en muy útil en diagnósticos sistemáticos en un futuro próximo debido a que las irregularidades descritas anteriormente son tan evidentes en las células cancerosas y debido a que el presente método resultan muy sencillos de implementar. Si el presente método se redefine más puede resultar posible detectar una única o solamente unas pocas células cancerosas de una población celular que consista en varios millones de células, ya que las células que contienen tanto unos niveles elevados de ciclina E como unos niveles elevados de ciclina A simplemente parece que no existen en las poblaciones celulares normales. El presente

ES 2 276 922 T3

método puede resultar también muy útil en determinaciones del grado de malignidad de tumores. El presente método resulta muy sencillo de automatizar y se puede combinar fácilmente con técnicas tradicionales de diagnóstico, ya que las muestras se pueden teñir utilizando por ejemplo la tinción tradicional de hematoxilina - eosina después de haberse sometido a un análisis según la presente invención. El histopatólogo o el citólogo que analiza una muestra que se ha tratado de dicho modo puede elegir centrar su atención en las células que presentan las irregularidades detectadas en el ciclo celular.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar irregularidades en la regulación del ciclo celular en células individuales para diagnosticar lesiones cancerosas o precancerosas en muestras celulares e histológicas o para realizar un pronóstico de un determinado tipo de cáncer, **caracterizado** porque comprende las etapas de:
- detectar la ciclina E en células separadas de la muestra
 - detectar sustancias posteriores a la etapa G₁ seleccionadas de entre la ciclina A, el PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) y la bromo desoxiuridina en células separadas de la muestra
 - identificar las células que tienen ciclina E en el núcleo celular
 - identificar las células que se encuentren en la fase S o en la fase G₂ basándose en su contenido en sustancias posteriores a la etapa G₁ y
 - por lo que una cantidad aumentada de células que tienen un contenido aumentado de ciclina E en el núcleo celular al mismo tiempo que las mismas células se encuentran en la fase S o en la Fase G₂ es una indicación de la presencia en la muestra de células que tienen una regulación irregular del ciclo celular, lo que constituye un valor de diagnóstico y de pronóstico en el cáncer.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección de la ciclina E se realiza mediante la tinción de la proteína.
3. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la tinción de la ciclina E seleccionada se realiza mediante un anticuerpo dirigido contra la ciclina E seleccionada.
4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la determinación del contenido de sustancias posteriores a la etapa G₁ se realiza mediante la tinción de las mismas.
5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la tinción de una sustancia posterior a la etapa G₁ se realiza mediante un anticuerpo dirigido contra la sustancia posterior a la etapa G₁ seleccionada.
6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la ciclina A se selecciona como sustancia posterior a la etapa G₁.
7. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque las células que se tiñen para
- a) el contenido de ciclina E y
 - b) el contenido de sustancias posteriores a la etapa G₁
- se tiñen utilizando dos colores distintos, uno específico de a) y el otro específico de b)
8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque las células se iluminan y las células de tipo a) y b) se identifican porque cada tipo celular emite o absorbe respectivamente luz con una longitud de onda típica y específica.
9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque se obtiene una indicación de la cantidad de ciclina E y de sustancias posteriores a la etapa G₁ en cada célula individual analizando la intensidad lumínica o la absorción lumínica correspondiente a las células coloreadas del tipo a) y b) respectivamente.
10. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque se identifica el núcleo de las células tiñendo la muestra con un color que es específico del núcleo celular, por lo que el núcleo celular cuando se ilumina emite o alternativamente absorbe luz de una longitud de onda específica del color utilizado.
11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la luz emitida o absorbida por la muestra se fotografía o se detecta mediante una cámara de dispositivo de transferencia de carga (CCD) con un filtro adaptado para separar la luz que proviene del núcleo celular y la luz que proviene de las células teñidas del tipo a) y del tipo b), obteniéndose los datos relacionados con la intensidad lumínica de cada longitud de onda de cada núcleo celular de un programa informático de análisis de imágenes, proporcionando una determinación del contenido de tanto la ciclina E como de las sustancias posteriores a la etapa G₁ de cada núcleo celular.
12. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque se realiza un análisis citométrico de flujo de muestra proporcionando el contenido en ciclina E y en sustancias posteriores a la etapa G₁ de cada núcleo celular.
13. Método según las reivindicaciones 11 ó 12, **caracterizado** porque la información de que una muestra contiene una cantidad aumentada de ciclina E en la fase S y/o en la fase G₂ es una indicación de que la muestra comprende células con una regulación irregular del ciclo celular, lo que constituye un valor de diagnóstico y de pronóstico en el cáncer.

Fig. 1

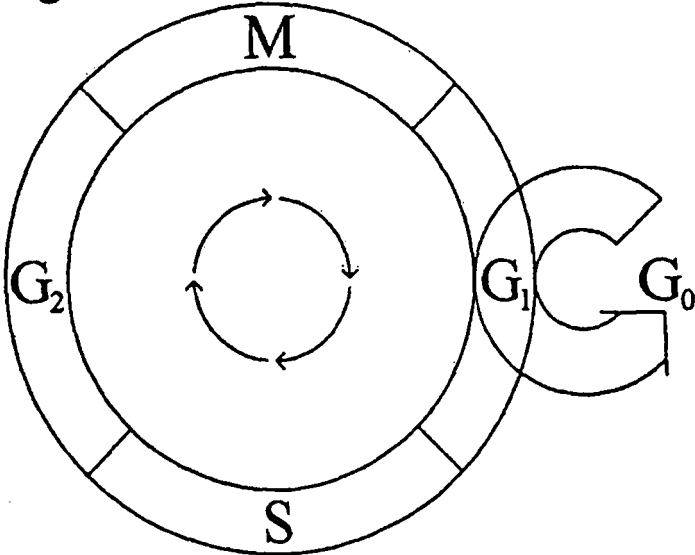
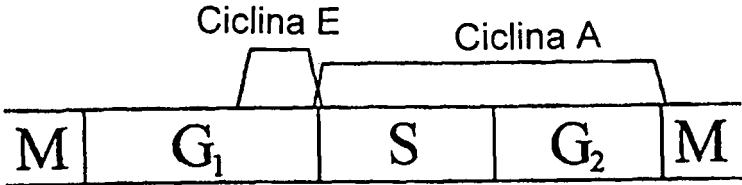


Fig. 2

Normal



Cáncer

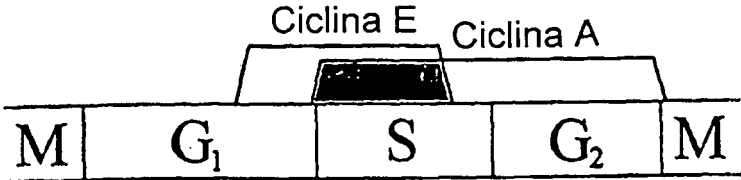


Fig. 3

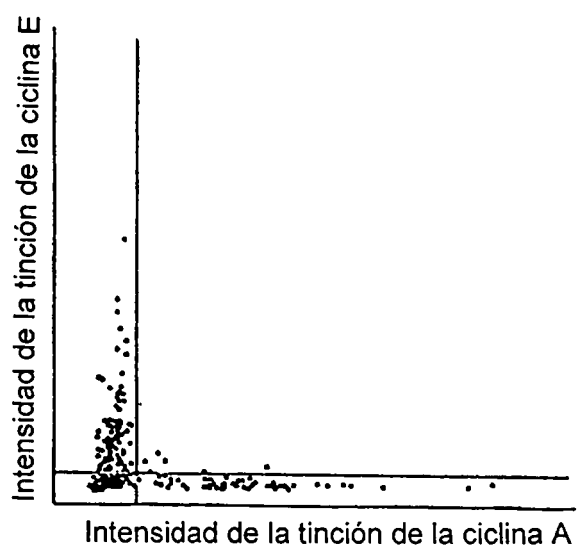


Fig. 4

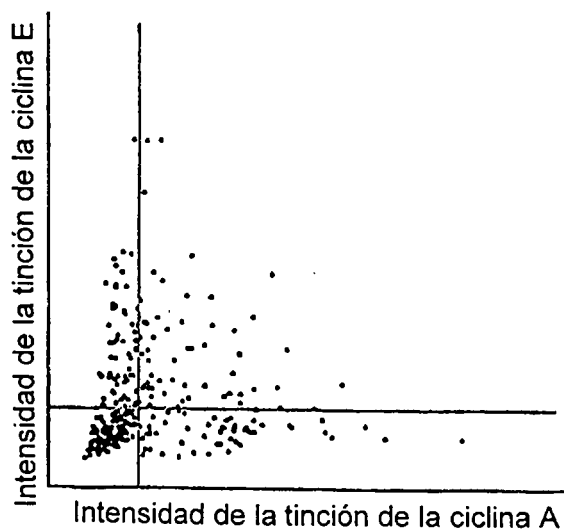


Fig. 5

