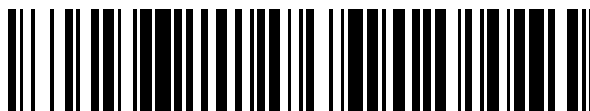


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 921 701**

51 Int. Cl.:

A61K 35/13 (2015.01)
A61K 35/22 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2017 PCT/US2017/045421**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018 WO18027091**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2017 E 17837731 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2022 EP 3493819**

54 Título: **Queratina 17 como un biomarcador para el cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

05.08.2016 US 201662371286 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.08.2022

73 Titular/es:

**THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE
UNIVERSITY OF NEW YORK (50.0%)
35 State Street
Albany NY 12207, US y
KDX DIAGNOSTICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SHROYER, KENNETH R.;
ESCOBAR-HOYOS, LUISA F. y
KIM, NAM**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 921 701 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

Queratina 17 como un biomarcador para el cáncer de vejiga

5 **Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere a un método para detectar la cantidad de queratina 17 en una muestra de orina obtenida de un sujeto. Los presentes métodos pueden utilizarse para diagnosticar el cáncer de vejiga en un sujeto.

10 **Antecedentes**

El cáncer de vejiga es la cuarta neoplasia maligna más común en hombres y constituye aproximadamente 5% de todos los nuevos cánceres diagnosticados en los Estados Unidos. Ver American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016). Aproximadamente la mitad de todos los cánceres de vejiga se identifican inicialmente en el revestimiento de la pared de la vejiga [es decir, el urotelio (asimismo conocido como epitelio de transición)] y se consideran cánceres no invasivos o *in situ*, o carcinoma urotelial (asimismo conocido como carcinoma de células transicionales). Ver Grossman, HB, *et al.* JAMA. 293:810-816, 2005. Aproximadamente 1 de cada 3 pacientes de cáncer de vejiga muestra invasión del cáncer en las capas musculares subyacentes de la pared de la vejiga. Los avances en las modalidades de tratamiento han conducido a un aumento de las tasas de supervivencia de los sujetos diagnosticados precozmente (es decir, cáncer de vejiga de estadio 0 o de estadio 1), con una tasa de supervivencia a cinco años media de los sujetos con diagnóstico precoz de entre 85% y 98% [American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016)]. A la inversa, los resultados de diagnóstico en estadio tardío ofrecen en un panorama mucho más sombrío, en el que los sujetos en los que se ha diagnosticado cáncer de vejiga en estadio II o en estadio III presentan una tasa de supervivencia a cinco años media de entre 45% y 65%. Ver Kaufman DS, *et al.* Lancet. (2009) 374:239-249; American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. Atlanta, Ga: American Cancer Society (2016) y Soloway MS. Urology. (2006) 67: 3-10, 1977.

Pilar Laguna *et al.* han caracterizado el fenotipo de queratina del urotelio de vejiga en pacientes con síndrome de vejiga dolorosa/cistitis intersticial (SVD/CI) utilizando un panel de 11 anticuerpos de la queratina que reconocen queratinas simples presentes en el epitelio columnar (queratinas 7, 8, 18 y 20) y queratinas asociadas a compartimientos de células basales de los epitelios escamosos (queratinas 5, 13, 14 y 17) ("Keratin Expression Profiling of Transitional Epithelium in the Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis", AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, US, (2006), vol. 125, n° 1).

Vita i Guelstein *et al.* han mostrado que CK-17 podría ser un marcador útil de progresión de los tumores urinarios ("Immunohistochemical localization of cytokeratin 17 in transitional cell carcinomas of the human urinary tract", VIRCHOWS ARCHIV. B. vol. 64, n° 1, (1993), páginas 1-5).

MacDonald *et al.* dan a conocer un método de detección de la expresión de la queratina 17 (K17) en un sujeto, que comprende obtener una muestra de orina del sujeto y detectar la expresión de K17 en la muestra mediante RT-PCR. ("Gene expression profile of urine sediment for the non-invasive diagnosis of bladder cancer", UROLOGY, (2007), vol. 70, n° 3, páginas 59-60).

Entre los métodos actuales para detectar el cáncer de vejiga se incluyen el análisis de orina (es decir, la detección de sangre en la orina) y se utiliza una diversidad de pruebas comerciales: Immunocyt™, NMP22 BladderChek®, la prueba BTastat® y el kit para cáncer de vejiga UroVysion®. Immunocyt™ examina la orina del sujeto para la presencia de mucina y antígeno carcinoembrionario (CEA). La prueba BladderChek® determina si una proteína específica, NMP22, se encuentra presente en la orina del sujeto. La prueba BTastat® está diseñada para detectar la proteína relacionada con el factor del complemento H humano (hCFHrp) como un biomarcador de cáncer, que es relativamente sensible para la detección de carcinoma urotelial de grado alto, aunque es generalmente incapaz de detectar las lesiones de grado bajo (es decir, los cánceres de vejiga de estadio 0-1), que son los que ofrecen la mejor probabilidad de curación. El kit para cáncer de vejiga UroVysion® somete a ensayo la aneuploidía de los cromosomas 3, 7 y 17, y la pérdida del locus 9p21 mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en especímenes de orina procedentes de sujetos con sospecha de que presentan cáncer de vejiga. Al igual que la prueba BTastat®, UroVysion® no puede detectar los tumores de grado bajo de la mucosa de la vejiga con eficacia, debido a que la mayoría de los tumores de grado bajo son diploides, por lo que la prueba presenta un resultado negativo en el kit para cáncer de vejiga UroVysion®.

De esta manera, existe una necesidad no satisfecha de identificación de un nuevo biomarcador diagnóstico que pueda utilizarse junto con los métodos de tratamiento existentes para determinar si un sujeto presenta o continúa presentando cáncer de vejiga, de manera que los pacientes que requieren tratamiento puedan ser identificados en un estadio precoz. Resultaría especialmente ventajoso que dicha metodología pudiese ser no invasiva y desplegarse en sistemas de ensayo diagnóstico del estado de la técnica capaces de ejecutar múltiples pruebas y/o múltiples muestras simultáneamente. Los métodos de la presente divulgación resuelven dichas necesidades no satisfechas y permiten un tratamiento más eficaz y mejores resultados clínicos y tiempo de supervivencia del

paciente que las pruebas actuales.

La queratina 17 (K17, KRT17 o citoqueratina 17), un miembro de la familia del citoesqueleto de filamentos intermedios, ha sido identificada como un biomarcador pronóstico y diagnóstico para determinados cánceres específicos, es decir, el cáncer pancreático y el cáncer de cuello uterino. Ver Escobar-Hoyos, L. F., *et al.* *Modern Pathology* (2014) 27(4):621-630. Sin embargo, la presente divulgación identifica que K17 no se sobreexpresa en todos los cánceres. Por ejemplo, la figura 1 muestra claramente que, aunque el nivel de K17 está elevado (se expresa a nivel elevado) en determinados cánceres, tales como el cáncer de cuello uterino y el cáncer pancreático, la K17 no se expresa a nivel elevado en muchos otros cánceres, tales como los cánceres de hígado, colon, riñón, cerebro y ganglios linfáticos. La expresión de K17 en el cáncer es generalmente específica de órgano y tipo tumoral. Especialmente, la presente divulgación identifica por primera vez que los niveles elevados de expresión de K17 pueden detectarse en tejido de la vejiga de sujetos con cáncer de vejiga, en comparación con los niveles de expresión de K17 determinados en muestras de tejido de vejiga y de orina de un sujeto sano, permitiendo ensayos diagnósticos fiables del cáncer de vejiga mediante la detección de K17.

La presente divulgación identifica y valida la utilidad de K17 como biomarcador diagnóstico del cáncer de vejiga y proporciona métodos altamente sensibles para detectar el cáncer de vejiga en un sujeto. Los métodos asimismo resultan ventajosos para la utilización en pacientes en los que se desconoce la incidencia previa de cáncer de vejiga para los que una prueba económica y no invasiva proporcionará un avance inesperado respecto a los diagnósticos existentes, que requieren procedimientos caros e invasivos para verificar que el paciente presenta cáncer de vejiga.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la expresión de queratina 17 (K17) en un sujeto, que comprende: obtener una muestra orina del sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga y detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en la que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17 y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende: obtener una muestra de orina del sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga; detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en la que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17 y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17, y diagnosticar que el sujeto presenta cáncer de vejiga en el caso de que se detecte una cantidad aumentada de K17 en la muestra en comparación con una muestra de control que es una muestra de orina análoga obtenida de un sujeto sin cáncer.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende: obtener una muestra de orina del sujeto y detectar la cantidad de proteína K17 en dicha muestra mediante la utilización de un método de detección cualitativo o cuantitativo, en el que la detección de la proteína K17 en dicha muestra indica que dicho sujeto presenta cáncer de vejiga.

Breve descripción de los dibujos y tablas

Figura 1: la expresión de la queratina 17 varía en diferentes tipos de cáncer. Datos de expresión de ARN, evaluados mediante minado de datos del Portal de datos TCGA del National Cancer Institute. El histograma muestra una representación a escala logarítmica de la expresión de K17 para determinados tipos de cáncer que presentan un nivel elevado de expresión de K17, tales como el cáncer de cuello uterino, el cáncer de vejiga y el cáncer pancreático. El gráfico muestra además que muchos tipos de cáncer, tales como los cánceres de colon, hígado, cerebro y linfático, expresan niveles relativamente bajos de K17.

Figura 2: localización inmunocitoquímica de K17 en muestras de citología urinaria. Puede observarse la expresión de queratina 17 mediante la detección de la K17 citoplasmática marcada (células más oscuras), mientras que otras células no cancerosas están desprovistas de marcaje de K17 (células no marcadas normales).

Figuras 3A-D: inmunocitoquímica urinaria de queratina 17. (a) tinción de K17 en células benignas raras, ampliación: 4x; (b) tinción de K17 en células benignas raras, ampliación: 40x; (c) tinción aumentada (2+) de K17, ampliación: 4x; (d) tinción aumentada (2+) de K17, ampliación: 20x. En casos raros, K17 se detectó a niveles bajos en células benignas procedentes de especímenes de citología urinaria normal (a, b), aunque la tinción de K17 era fuertemente positiva en las células uroteliales procedentes de sujetos con carcinoma urotelial (c, d).

Figuras 4A-D: inmunocitoquímica de queratina 17. (a, b) la mayoría de células escamosas y uroteliales normales (c, d) son negativas para K17, es decir, no muestran tinción de queratina 17.

Figuras 5A-D: histología de la vejiga. (a, b, d) solo se detecta tinción focal leve para K17 en la mucosa de vejiga benigna (c).

5 Figuras 6A-D: se detecta un nivel aumentado de K17 en todos los grados de tumor urotelial. (a) Neoplasma urotelial papilar de bajo potencial maligno; (b) carcinoma urotelial papilar de grado bajo, en transición desde la mucosa urotelial de control contigua; (c-d) carcinoma urotelial papilar de grado alto. El análisis inmunohistoquímico muestra una expresión de queratina 17 difusa y robusta en todas las células uroteliales anormales (es decir, tejido tumoral) (a, b), en el que el carcinoma urotelial de grado alto mostraba una expresión de K17 más focal (c, d).

10 Figuras 7A-D: inmunohistoquímica aumentada de la queratina 17 en carcinoma urotelial invasivo. (a) Carcinoma invasivo contiguo a mucosa urotelial no neoplásica; (b) carcinoma invasivo en tejido de vejiga blando perivesicular; (c) expresión de K17 en el frente invasivo del carcinoma; (d) invasión de la lámina propia por células tumorales. Todas las muestras de tejido sometidas a ensayo revelaron un nivel aumentado de expresión de queratina 17 en las células tumorales obtenidas de sujetos con carcinoma urotelial invasivo en comparación con tejido procedente de pacientes sanos.

15 Figuras 8A-B: detección de queratina 17 mediante la utilización de métodos de detección de microfluidos. Se analizaron muestras de (a) HeLa y (b) células C33. Los datos muestran que se detectan significativamente más células marcadas con K17 entre las células HeLa (90,4% son positiva para K17) que entre las células C33 (35,1% son positivas para K17). Estos datos muestran que la detección de K17 puede conseguirse eficientemente utilizando un dispositivo de microfluidos acoplado con métodos de inmunotinción de K17 y, de esta manera, los dispositivos de microfluidos, así como los métodos de detección y cuantificación de ARNm de K17, son medios adecuados para la práctica de los presentes métodos.

20 Figuras 8A-B: detección de queratina 17 mediante la utilización de métodos de detección de microfluidos. Se analizaron muestras de (a) HeLa y (b) células C33. Los datos muestran que se detectan significativamente más células marcadas con K17 entre las células HeLa (90,4% son positiva para K17) que entre las células C33 (35,1% son positivas para K17). Estos datos muestran que la detección de K17 puede conseguirse eficientemente utilizando un dispositivo de microfluidos acoplado con métodos de inmunotinción de K17 y, de esta manera, los dispositivos de microfluidos, así como los métodos de detección y cuantificación de ARNm de K17, son medios adecuados para la práctica de los presentes métodos.

25 Tabla 1: tinción con queratina 17 en mucosa urotelial de control y cánceres de vejiga uroteliales. Las puntuaciones medias de PathSQ para las muestras de control (benignas) y los cánceres de vejiga uroteliales de estadio temprano (PUNLMP, LG, HG) indican una diferencia significativa de expresión de K17 en las muestras de tejido de vejiga de control y las muestras de tejido de cáncer urotelial ($p < 0.001$).

30 Tabla 2: análisis inmunocitoquímico de la expresión de K17 en muestras de citología urinaria. Los datos comparan el diagnóstico clínico en muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga (positivas para neoplasia maligna) con el de pacientes que no presentan cáncer de vejiga (negativo para neoplasia maligna o con sospecha de neoplasia maligna). Dichos datos muestran la tinción positiva para K17 en todas las muestras obtenidas de sujetos con cáncer de vejiga (T3-T7). En contraste, las muestras de orina obtenidas de pacientes no cancerosos no mostraban marcaje de K17, incluso en donde se observaban niveles detectables de células de vejiga (N1, N7, N8).

35 Tabla 3: detección de la expresión de K17 mediante tinción inmunocitoquímica de células aisladas de la orina. La tabla 3 muestra los resultados de cuatro estudios independientes, para un total de 104 muestras de pacientes analizadas. Se analizaron treinta y nueve muestras de sujetos con cáncer de vejiga y 65 muestras de tejido benigno, utilizando los presentes métodos. Se muestra la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección de K17 para cada estudio. Los resultados muestran que los presentes métodos diagnósticos basados en K17 presentan una sensibilidad media de 93% y una especificidad de 91%.

40 Tabla 4: límite de detección del ELISA utilizado para la detección de proteína queratina 17 en un componente sin células de orina. La tabla 4 muestra los resultados del ensayo de K17 de patrones de K17 (proteína K17 recombinante) con media, desviación estándar y porcentaje de coeficiente (% CV) analizado mediante ELISA. El valor umbral para una señal positiva se determinó a partir de controles negativos (patrón de cero/sin proteína K17), de manera que una determinación positiva de K17 es 3 veces la desviación estándar de la media del control negativo (media de patrones de cero + $[3 \times \text{Desviación estándar de patrones de cero}]$).

45 Tabla 5: detección de proteína K17 en muestras de orina sin células procedentes de sujetos con cáncer de vejiga. La tabla 5 muestra datos del ensayo de 21 muestras de orina (6 cancerosas y 15 benignas/de control). Las muestras positivas para K17 presentan una densidad óptica (OD) media de por lo menos 0.081 y un% CV inferior a 20%. Los datos muestran que cuatro de los 6 cánceres y ninguna de las muestras benignas mostró un resultado positivo en el ensayo para K17.

50 Tabla 6: juego de cebadores para la detección de ARNm de K17 mediante RT-PCR cuantitativa. La tabla 6 muestra parejas de cebadores ilustrativas para la utilización en la detección y/o cuantificación del ARNm de K17 mediante RT-PCR. Se diseñaron cebadores adecuados de la invención, tales como los ilustrados en la tabla 6, para generar productos que incluyesen intrones de K17, de manera que la amplificación por PCR de los productos del tamaño predicho se produjese únicamente si el ADNc generado a partir del ARNm de K17 se encontraba presente en la muestra.

Descripción detallada de la invención

Actualmente los marcadores diagnósticos (por ejemplo, los marcadores inmunohistoquímicos) de los cánceres de vejiga, específicamente los cánceres de vejiga de estadio temprano (por ejemplo, el cáncer urotelial) solo mejoran marginalmente la precisión diagnóstica respecto al estándar de oro de la visualización *in situ* y/o la biopsia, es decir, los procedimientos invasivos. A la inversa, la presente invención identifica, caracteriza y valida un nuevo biomarcador, la queratina 17 (K17), y proporciona nueva metodología con una precisión diagnóstica mejorada respecto a la tecnología actual, y resulta ventajosa para la utilización en la detección de los cánceres de vejiga de estadio temprano mediante la utilización de técnicas inmunocitológicas para el cribado de muestras de citología urinaria. La presente invención proporciona además métodos sin células para el diagnóstico de un sujeto con cáncer de vejiga mediante la detección de los niveles de proteína K17 en las muestras de orina, incluyendo las muestras de orina sin células.

Terminología

El término "péptido" o "proteína" tal como se utiliza en la presente divulgación se refiere a una serie lineal de residuos aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de residuos aminoácidos contiguos. Según la invención, la proteína es la queratina 17 (K17).

La expresión "ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una o más bases nucleotídicas de cualquier tipo, incluyendo las formas de cadena sencilla o de doble cadena. En un aspecto de la presente divulgación, un ácido nucleico es ADN y en otro aspecto el ácido nucleico es ARN, tal como ARNm. En la práctica de los métodos de la presente divulgación, el ácido nucleico analizado (por ejemplo, ARN de K17) mediante el presente método se origina en una o más muestras. Sin embargo, los métodos que implican ácidos nucleicos no están comprendidos en las reivindicaciones.

Los términos "citoqueratina 17", "queratina 17", "KRT17" y "K17" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a la queratina humana, queratina, gen 4 citoesquelético de tipo II situado en el cromosoma 17, tal como se indica en el número de acceso NG_008625 o un producto del mismo, que codifica la queratina 17 de la cadena de filamento intermedio de tipo I. Incluido dentro del significado pretendido de K17 están los transcritos de ARNm de la secuencia de ADNc de la queratina 17 tal como se indica en el número de acceso NM_000422, y las proteínas traducidas a partir del mismo, incluyendo, por ejemplo, la queratina, proteína citoesquelética de tipo 1, 17 tal como se indica en el número de acceso NP_000413 u homólogos de la misma.

El término "sujeto", "sujeto de ensayo" o "paciente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a cualquier mamífero. En una forma de realización, el sujeto es un candidato para el diagnóstico de cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma urotelial) o un individuo con una lesión precancerosa, tal como neoplasia urotelial. En determinadas formas de realización, se ha diagnosticado que el sujeto presenta cáncer de vejiga y el sujeto es un candidato al tratamiento del mismo. Los métodos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica en cualquier sujeto mamífero que presente un riesgo de desarrollar cáncer o que se haya diagnosticado que presenta cáncer. En particular, los métodos descritos en la presente memoria resultan más útiles en la práctica en seres humanos.

Una "muestra biológica", "muestra de ensayo" o "muestra o muestras" tal como se utilizan en la presente divulgación pueden obtenerse de cualquier manera conocida por el experto en la materia. Según la presente divulgación, las muestras pueden obtenerse de cualquier parte de un sujeto, incluyendo el tejido de vejiga, de orina o de una combinación de los mismos. En determinados aspectos de la divulgación, la muestra es una biopsia de tejido, tejido fresco o tejido vivo extraído de la vejiga del sujeto. En aspectos específicos de la divulgación, la muestra es una colección de células de la pared de la vejiga, tal como, el epitelio de transición, tejido conectivo, tejido muscular o tejido adiposo de la vejiga. En otros aspectos de la divulgación, la muestra se procesa antes de la utilización en los métodos dados a conocer. Por ejemplo, una muestra de tejido fijada en formalina e incluida en parafina, aislada de un sujeto, resulta útil en los métodos de la presente divulgación debido a que la fijación con formalina y la inclusión en parafina resultan beneficiosos para la conservación histológica y el diagnóstico de especímenes clínicos de tejido, y los tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina se encuentran más fácilmente disponibles en grandes cantidades que los tejidos frescos o congelados. Según la invención, la muestra es de orina. En algunas formas de realización, se recolectan células de la orina mediante centrifugación o mediante filtración, y las células recolectadas se utilizan para los ensayos. El experto en la materia procurará garantizar que las muestras se recolectan, se procesan y se someten a un ensayo de una manera que evite la degradación evitable de proteínas K17, que puede variar según el ensayo que deba utilizarse. En formas de realización específicas, la muestra es un volumen de orina obtenido de un sujeto, en la que la orina puede presentar o no una cantidad detectable de células (es decir, la muestra puede estar libre o no de células). En determinadas formas de realización, la muestra es una muestra de orina libre de células que contiene proteína K17.

Una "muestra de control", "muestra no cancerosa" o "muestra normal" tal como se utiliza en la presente memoria es una muestra que no muestra niveles elevados de K17 y/o muestra niveles nulos de K17 o niveles reducidos de K17 (en la que "reducidos" es respecto a un patrón u otro valor conocido que es indicativo de cáncer). En

determinadas formas de realización, una muestra de control no contiene células cancerosas (por ejemplo, componentes de tejido benigno, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, mucosa de vejiga normal, células mucosales de vejiga benignas y otras células no cancerosas del urotelio o epitelio de transición de la vejiga). En una forma de realización específica, una muestra de control o normal es una muestra procedente de tejido benigno que no muestra tinción o expresión de K17. Entre los ejemplos no limitativos de muestras de control para la utilización en la presente divulgación se incluyen extractos de tejido no canceroso, márgenes quirúrgicos extraídos del sujeto, células aisladas que es conocido que presentan niveles normales o reducidos de K17, o muestras benignas o de orina obtenidas de otros individuos sanos. En una forma de realización, la muestra de control es orina humana de individuos sanos o un sustituto de orina formulada con o sin cantidades predeterminadas de proteína K17. En otras formas de realización determinadas, la muestra de control es una muestra de citología urinaria obtenida de un sujeto sano (es decir, de un paciente libre de cáncer). En formas de realización específicas, la muestra de control es un volumen sin células de orina obtenido de un sujeto, en el que la orina no presenta una cantidad detectable de proteína K17. En otras formas de realización, la muestra de control es un volumen sin células de orina obtenido de un sujeto, en el que la muestra de orina libre de células presenta una cantidad conocida de proteína K17 detectable.

El término "aumentar" o "superior" o "elevado" se refiere a por lo menos más que la cantidad relativa de una entidad identificada (tal como la expresión o cantidades de K17), medida o analizada en una muestra de control. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un aumento de 50% respecto a una muestra de control, o un aumento de por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000% o superior respecto a una muestra de control negativo. En unas formas de realización específicas, la expresión de K17 indicativa de que un sujeto presenta cáncer de vejiga incluye un aumento de por lo menos 1 vez, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 13 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces o superior, respecto al nivel de expresión de K17 mostrado por una muestra de control. Un "nivel aumentado de expresión de K17" tal como se utiliza en la presente divulgación se refiere a un aumento de la cantidad de proteína K17 presente en una célula, organismo o muestra respecto a un nivel de control o normal de expresión de K17 o según se ha medido en una muestra de referencia o que ha fijado un estándar. En determinadas formas de realización, la detección de cualquier cantidad de K17 en una muestra es un aumento respecto al nivel en un control. En determinadas formas de realización específicas, el nivel aumentado de expresión de K17 que corresponde a cáncer de vejiga se ejemplifica mediante la presencia de expresión de K17 por lo menos 1 vez, 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 13 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces o más aumentado respecto al nivel de expresión de K17 mostrado por una muestra de control o que ha fijado un estándar.

El término "reducido" o "reducción" se refiere a por lo menos inferior a la cantidad relativa de una entidad identificada, medida o analizada en una muestra de control o fijada por un estándar.

La expresión "cáncer de vejiga" tal como se utiliza en la presente memoria incluye neoplasias malignas en las células o tejido de la vejiga. El cáncer de vejiga incluye, por ejemplo, neoplasias malignas en una capa celular denominada urotelio o epitelio de transición, que reviste el interior del uréter, vejiga, uretra y partes de los riñones. En casos específicos, el cáncer de vejiga incluye la presencia de células cancerosas en el tejido conectivo, músculo o capa adiposa de la pared de la vejiga. El cáncer de vejiga de la presente divulgación puede ser invasivo o no invasivo, cáncer papilar o plano, de la vejiga. Los "carcinomas papilares" se ejemplifican por delgadas proyecciones en forma de dedos que crecen desde la superficie interna de la vejiga hacia el centro hueco de la misma. Los tumores papilares que crecen hacia el centro de la vejiga sin crecer hacia el interior de las capas más profundas de tejido de la pared de la vejiga son cánceres de vejiga papilares no invasivos. En determinadas formas de realización, el cáncer de vejiga es un neoplasma papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP). En otros casos, el cáncer de vejiga es carcinoma papilar urotelial de grado bajo (de crecimiento lento) (LG) o carcinoma papilar urotelial de grado alto (HG). En otras formas de realización, el cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial de transición. Los "carcinomas planos" son cánceres de vejiga que no crecen hacia la parte hueca de la vejiga y principalmente sustituyen el epitelio de transición de la pared de la vejiga. En determinadas formas de realización, el cáncer de vejiga es un carcinoma plano no invasivo o un carcinoma plano *in situ* (CIS). En otras formas de realización, el cáncer de vejiga es carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas o sarcoma de la pared de la vejiga. Puede asignarse un "grado a los cánceres de vejiga detectables utilizando los métodos de la presente divulgación, tales como cánceres de grado bajo o de grado alto. Un "cáncer de vejiga de grado bajo" está compuesto de células uroteliales que presentan la apariencia de células uroteliales de vejiga normales o de control y generalmente presentan un pronóstico bueno o positivo de respuesta al tratamiento. Un "cáncer de vejiga de grado alto" es un subgrupo mal diferenciado o no diferenciado de células de vejiga que pueden discernirse del tejido normal o de control. Los cánceres de vejiga de grado alto generalmente son más invasivos y presentan un mal pronóstico en comparación con el de un cáncer de grado bajo.

Métodos

La presente divulgación describe métodos para utilizar la queratina 17 como un biomarcador de cáncer de vejiga. En la presente memoria, se detecta la expresión de ARN o de proteína de K17 mediante inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, ensayos de proteínas en solución o en fase solución (por ejemplo, ELISA, microfluídica, citometría de flujo, espectrometría de masas) según la presente divulgación, en secciones de tejido

microdisseccionadas obtenidas a partir de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina o, según la presente invención, muestras de citología urinaria para diversas categorías diagnósticas (es decir, mucosa de vejiga no cancerosa, neoplasma papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP), carcinoma papilar urotelial de grado bajo (LG) y carcinoma papilar urotelial de grado alto (HG) o carcinoma urotelial-de transición (“transitional-urothelial carcinoma”). Los datos muestran que K17 mostraba una diferencia de 30 veces de la expresión entre el control (benigno) y las muestras de PUNLMP; una diferencia de 15 veces de expresión entre las muestras de control y las de cáncer de vejiga LG, y una diferencia de 13 veces en la expresión de K17 entre las muestras de control y de cáncer de vejiga de HG. Por lo tanto, la presente divulgación muestra que la expresión de K17 puede medirse y utilizarse como un biomarcador diagnóstico para el diagnóstico del cáncer de vejiga.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar la expresión de queratina 17 (K17) en un sujeto, que comprende: obtener una muestra orina del sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga y detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en la que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17 y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17.

Una forma de realización de la presente invención proporciona un método para diagnosticar que un sujeto presenta cáncer de vejiga, que incluye obtener una muestra de ensayo de orina de un sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga y detectar el nivel de expresión de K17 en la muestra, de manera que un nivel aumentado de expresión de K17 en la muestra, en comparación con el de una muestra de control, que es una muestra de orina análoga obtenida de un sujeto libre de cáncer, identifica que el sujeto presenta cáncer de vejiga. En una forma de realización específica, el nivel de expresión de K17 se determina mediante inmunoensayo que detecta la presencia de proteína K17 de una manera cualitativa o cuantitativa.

En determinadas formas de realización, se determina la expresión de K17 mediante la detección de la unión entre K17 y un anticuerpo anti-K17 en una muestra. En una forma de realización de la presente divulgación, se obtiene una muestra biológica (es decir, una muestra de ensayo o una muestra de control) del sujeto en cuestión. Puede recolectarse una muestra biológica, que puede utilizarse de acuerdo con los presentes métodos, mediante una diversidad de medios conocidos por el experto ordinario en la materia. Entre los ejemplos no limitativos de técnicas de recolección de muestras para la utilización en los métodos actuales se incluyen la biopsia aspirativa con aguja fina, la biopsia por escisión quirúrgica, la biopsia endoscópica y la biopsia de escisión. En otras formas de realización, los niveles de K17 pueden detectarse en una muestra de orina obtenida de un sujeto que se sospecha que presenta cáncer, y la muestra de orina se somete a ensayo para determinar la cantidad de proteína K17 en la muestra. En determinadas formas de realización, las muestras de orina pueden analizarse para la presencia de células o tratarse de manera que se recolectan las células de la orina durante el ensayo. Sin embargo, en diversas otras formas de realización las muestras se procesan de una manera que no es dependiente de si las células se encuentran presentes. En formas de realización específicas, la expresión de K17 puede detectarse en una muestra de orina procedente de un paciente de cáncer de vejiga que se encuentra libre de células o incluso de una parte libre de células de orina vaciada. En otras formas de realización, la muestra es una muestra de orina vaciada que contiene una cantidad detectable (número) de células. Al proporcionar al médico la detección de cáncer de vejiga en una muestra de orina vaciada con un elevado grado de sensibilidad (pocos falsos negativos) y elevada precisión (pocos falsos positivos) a bajo coste, los presentes métodos proporcionan un beneficio sobre los diagnósticos actuales.

En algunas formas de realización, el método incluye una muestra de control, que puede obtenerse de tejido no canceroso o de la orina de un sujeto que no presenta cáncer. Tal como se muestra en las figuras 3A-B y 4C-D, una muestra de control puede incluir orina vaciada que contiene una cantidad detectable de células uroteliales benignas. En otras formas de realización, una muestra de control es orina vaciada que contiene una cantidad detectable de células escamosas normales, tal como se muestra en las figuras 4A-B. En todavía otras formas de realización, una muestra de control (no cancerosa) puede incluir tejido mucosal de vejiga (figuras 5A-B y D) o tejido mucosal de vejiga benigno (figura 5C), que no muestra tinción de la queratina 17. En otras formas de realización, la muestra de control puede ser un control positivo, tal como una muestra que se obtiene de un sujeto que es conocido que presenta cáncer de vejiga que muestra un nivel aumentado (fuerte) de tinción de K17. Por ejemplo, una muestra de control positivo es una orina vaciada que contiene una cantidad detectable de células de carcinoma urotelial, tal como se muestra en las figuras 3C-D que muestran cantidades fuertes (aumentadas) de expresión de queratina 17. En todavía otras formas de realización, una muestra de control positivo (cancerosa) incluye tejido obtenido del sujeto que presenta neoplasma urotelial papilar de bajo potencial maligno (figura 6A), carcinoma urotelial de grado bajo (figura 6B), carcinoma papilar urotelial de grado alto (figuras 6C-D o carcinoma urotelial invasivo (figuras 7A-D). Con independencia del tipo de células o tejidos utilizado como muestra de control positivo, dichas células deben mostrar un nivel aumentado de expresión de K17. Además, y particularmente en formas de realización de alto rendimiento de la presente divulgación, los presentes métodos se despliegan con equipos automatizados y analíticas controladas por ordenador, de manera que o bien no hay control, o el control será un líquido o material formulado o incluso un valor predeterminado fijado por un usuario o fabricante de instrumento.

Aunque el cáncer de vejiga puede resultar en la presencia de células de cáncer en la orina, es un aspecto inesperado de la presente divulgación que la cantidad de K17 en muestras de orina libres de células procedentes

de pacientes de cáncer resulta suficiente para permitir que dichas muestras se distingan de las muestras normales (no cancerosas). Además, debido a que las etapas de control de calidad y de recolección celular de los ensayos celulares son caros, la implementación de dicha forma de realización de la presente divulgación reducirá significativamente los costes asociados a las actuales pruebas invasivas. De esta manera, en algunas formas de realización, la muestra es orina, que no incluye una cantidad detectable de células, es decir, una muestra libre de células. Para dichas formas de realización específicas, la muestra de control puede ser una muestra de orina libre de células que contiene una cantidad previamente determinada (conocida) de proteína o ARN de K17, en la que la cantidad puede ser nula o puede ser una cantidad inferior a los límites de detección. En algunas formas de realización, la muestra de orina libre de células contiene una cantidad detectable de proteína o ARN de K17 (por ejemplo, una muestra procedente de un paciente de cáncer de vejiga o una muestra de control). En otras formas de realización, la muestra de orina libre de células no contiene una cantidad detectable de proteína o ARN de K17 (muestra de control negativo o muestra de un sujeto que no presenta cáncer de vejiga). En las formas de realización en las que los métodos puestos en práctica analizan la expresión de la queratina 17 en una parte libre de células de orina vaciada, una muestra de control puede ser una muestra líquida (por ejemplo, orina) que incluye una cantidad conocida de proteína K17 (que puede ser nula, en un control negativo) o una cantidad conocida de células de vejiga normales procedentes de un paciente sano. En otras formas de realización, una muestra de control puede ser un control positivo, tal como una muestra líquida (por ejemplo, orina) que incluye una cantidad conocida de proteína K17 procedente de un sujeto que es conocido que presenta cáncer de vejiga, o en una cantidad que sería más alta de lo esperado si el sujeto no presentase cáncer de vejiga.

En determinadas formas de realización, la muestra obtenida de un sujeto se utiliza directamente sin tratamientos o procesamientos preliminares, tales como la congelación instantánea. En determinadas formas de realización de la invención, las muestras pueden almacenarse antes de la utilización. De esta manera, los presentes métodos diagnósticos pueden aplicarse utilizando múltiples métodos de preparación, incluyendo la preparación para la utilización en instrumentos de tinción inmunohistoquímica (por ejemplo, instrumentos de tinción automáticos), tales como el instrumento de tinción automático Link (Dako), Discovery XT y BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc.), el instrumento de tinción automático Leica[®] ST5010 XL, el instrumento de tinción múltiple Leica[®] ST5020 (Leica Biosystems Nussloch GmbH), el instrumento de tinción automático Link 48 (Agilent), y el instrumento de tinción automático Lab Vision[™] 360-2D, instrumento de tinción automático Lab Vision[™] 480s (Thermo Fisher Scientific[™]).

Según la invención, la muestra utilizada en los presentes métodos es orina obtenida de un sujeto. En determinadas formas de realización, la muestra de orina incluye una cantidad detectable de células que pueden someterse a ensayo y analizarse para la expresión de K17. En algunas formas de realización, las células son de la pared de la vejiga del sujeto. En formas de realización específicas, la muestra contiene una cantidad detectable de células que expresan K17.

En una forma de realización preferida del primer aspecto de la invención, los métodos comprenden además el procesamiento de la muestra de orina, en el que el procesamiento comprende aislar las células de la muestra, la lisis de las células aisladas en una solución de lisis que comprende urea, y aislar proteínas de la solución de lisis.

En otra forma de realización preferida del primer aspecto de la invención, la pluralidad de células de vejiga son células de epitelio de transición, células de tejido conectivo, células musculares, células adiposas o una combinación de las mismas.

Tras obtener una muestra adecuada, el nivel de expresión de K17 en la muestra puede determinarse utilizando diversas técnicas conocidas por el experto ordinario en la materia. En determinadas formas de realización de la presente divulgación, los niveles de expresión de K17 pueden medirse mediante: inmunohistoquímica (IHQ), qRT-PCR, transferencia Northern, transferencia Western, ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), análisis de micromatrices o espectrometría de masas. En formas de realización específicas, se detecta K17 mediante un ensayo de proteínas en fase solución (por ejemplo, ELISA, microfluídica o citometría de flujo). En una forma de realización específica, la expresión de K17 se determina mediante tinción inmunohistoquímica de una muestra de orina que incluye una cantidad detectable de células de vejiga. En otras formas de realización, la expresión de K17 se determina mediante la detección de células marcadas fluorescentemente mediante citometría de flujo o métodos de detección a base de microfluidos. En formas de realización específicas, las células marcadas fluorescentemente expresan queratina 17. En algunas formas de realización, el nivel de expresión de K17 se determina mediante la detección de la presencia de proteína K17 en la muestra. En algunas formas de realización, cualquier cantidad de proteína K17 detectada en la muestra correlaciona con un diagnóstico de cáncer de vejiga. En otras formas de realización, la cantidad de proteína K17 en una muestra debe exceder la cantidad presente en una muestra de control.

Puede utilizarse cualquier tipo de anticuerpo contra el antígeno K17, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpo monoclonal de ratón [E3] anti-K17 humano, anticuerpos policlonales contra K17 humano, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal contra un dominio de proteína K17 de mamífero o epítipo del mismo. Asimismo resultan aplicables los fragmentos quiméricos, de cadena sencilla, Fc, Fab, Fab' y Fab2 de moléculas de inmunoglobulina, y una biblioteca de expresión de Fab contra la proteína K17. Entre los anticuerpos a los que se hace referencia se

incluyen todas las clases, subclases y tipo e inmunoglobulinas, e incluye además moléculas de hapteno (por ejemplo, ácidos nucleicos o polímeros) que se unen a la proteína K17.

5 En determinadas formas de realización, tras la incubación con el anticuerpo primario, se procesan las muestras mediante un método indirecto de inmunoperoxidasa basado en avidina-biotina, utilizando anticuerpos secundarios biotinilados, desarrollados y contrateñidos con hematoxilina. A continuación, los portaobjetos pueden analizarse para la expresión de K17.

10 En determinadas formas de realización, la expresión de queratina se cuantifica mediante el método PathSQ, un sistema de puntuación semicuantitativa manual, que cuantifica el porcentaje de células fuertemente teñidas, sin conocimiento de los datos clínicos correspondientes. En todavía otra forma de realización, los portaobjetos pueden puntuarse con el software de procesamiento de imágenes basado en Java Image J 1.46 del National Institutes of Health utilizando el plugin de desconvolución de color de DAB-hematoxilina (DAB-H). Ver Schneider CA, *et al.*, Nat methods. (2012) 9:671-5

15 Tal como se muestra en la tabla 1 de la presente solicitud, según la divulgación, se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico de K17 en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina. En la presente memoria, se diseccionaron mediante microscopía de captura láser muestras de mucosa de vejiga normal (muestra de control), muestras de carcinoma papilar urotelial PUNLMP, LG y muestras de ensayo de carcinoma papilar urotelial HG procedentes de secciones de tejido teñidas con hematoxilina y eosina, y se recolectaron las células de la pared de la vejiga de cada categoría diagnóstica. Las muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina según la divulgación a continuación se procesaron utilizando un método indirecto de inmunoperoxidasa. Específicamente, según la divulgación, a continuación, se incubaron las muestras con cócteles de proteasa para facilitar la dirección inversa a la reticulación de las proteínas. Después de la incubación, a temperatura elevada (superior a 50°C), las muestras de tejido se desparafinaron y rehidrataron. A continuación, se llevó a cabo la recuperación del antígeno en tampón de citrato en una cámara de recuperación. Se bloqueó la peroxidasa endógena y las muestras se marcaron mediante incubación con un anticuerpo específico para K17. Tras la incubación del anticuerpo primario, se añadieron anticuerpos secundarios, y las muestras se revelaron y contrateñieron con hematoxilina. Los controles negativos de muestras de tejido de control se procesaron utilizando un método equivalente.

20 En un aspecto específico de la divulgación, las tinciones inmunohistoquímicas para K17 en muestras de control negativo (benignas) y muestras de cáncer de vejiga (carcinoma urotelial de transición PUNLMP, LG, HG) se puntuaron mediante PathSQ, un sistema de puntuación semicuantitativo manual, que cuantifica el porcentaje de células fuertemente teñidas [cancerosas], en ciego respecto a los datos clínicos, y calcula el factor de aumento de los niveles de expresión de K17 respecto a una muestra de control. Ver la figura 3C-D. Para la biopsia de tejidos, la puntuación de PathSQ debe ser de por lo menos 5%. En otras formas de realización, la puntuación de PathSQ es de entre 5% y 99%, de entre 10% y 90%, de entre 20% y 80%, de entre 30% y 70%, o de entre 40% y 60%. En otras formas de realización, el experto ordinario en la materia podrá determinar la puntuación de PathSQ de una muestra que corresponde a la presencia de cáncer.

25 En un aspecto específico de la divulgación, la detección de la proteína K17 se lleva a cabo mediante micromatrices de tejido. Por ejemplo, según la divulgación, puede obtenerse tejido que contiene mucosa de vejiga normal, PUNLMP, LG, HG o células de cáncer de vejiga urotelial de transición, a partir de bloques de parafina e introducirse en bloques de micromatrices de tejidos. En determinados aspectos de la divulgación, pueden utilizarse otras fuentes de células de cáncer de vejiga a modo de muestras de ensayo. Según la invención, las muestras de orina que contienen células de pared de vejiga o muestras de orina que no contienen células pero que contienen proteínas y/o ARNm derivado de células de pared de vejiga son muestras de ensayo ideales. Las muestras de control para la utilización en la determinación del factor de aumento de K17 en una muestra respecto a una muestra de control pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de muestras comerciales de micromatrices de tejidos, tales como las obtenidas de HISTO-Array™. Los portaobjetos de micromatrices de tejidos para la utilización en los métodos actuales a continuación pueden procesarse, es decir, desparafinarse en xileno y rehidratarse utilizando un alcohol. En determinadas formas de realización, las muestras pueden procesarse adicionalmente mediante: incubación con un tampón de citrato, aplicando peróxido de hidrógeno para bloquear la peroxidasa endógena, o mediante tratamiento de la muestra con suero para bloquear la unión no específica (por ejemplo, suero bovino, humano, de burro o de caballo). Las muestras se marcan adicionalmente mediante incubación con anticuerpos primarios contra K17.

30 En algunas formas de realización y tal como se muestra en las figuras 2, 3A-D a 5A-D y en las tablas 2 y 3 de la presente invención, puede determinarse la expresión de K17 a partir de una muestra de citología urinaria mediante análisis inmunocitoquímico de una cantidad detectable de células. En la presente memoria, se recogieron muestras de orina vaciada de un sujeto en cuestión y se aislaron las células de vejiga de la muestra mediante técnicas conocidas por el experto ordinario en la materia, tales como la centrifugación o la filtración. A continuación, las células de vejiga aisladas se fijaron a portaobjetos, se marcaron para K17 utilizando métodos inmunocitoquímicos rutinarios, se contrateñieron para hematoxilina y se puntuaron mediante microscopía para la expresión de K17 en muestras de orina tanto de ensayo como de control.

Por ejemplo, las figuras 2 y 3A y B muestran la tinción para queratina 17 en muestras de control obtenidas de células aisladas de la orina vaciada que se ha obtenido de un sujeto sano (no canceroso). Estas células muestran niveles bajos ("niveles de control") de tinción de K17. En comparación, las figuras 3C-D muestran una fuerte tinción de queratina 17 en las células uroteliales obtenidas de la orina vaciada de un sujeto que presenta cáncer de vejiga (carcinoma urotelial). Se encuentran ejemplos adicionales de niveles de control negativo de expresión de queratina 17 en las figuras 4A-D y 5A-D, que ilustran células uroteliales escamosas sanas (figura 4A-B) y células uroteliales sanas, no cancerosas (figuras 4C-D), así como mucosa de vejiga no cancerosa (figuras 5A, B y D) y tejido mucosal de vejiga benigno (figura 5C).

En otro aspecto de la presente divulgación, que no se encuentra comprendido en las reivindicaciones adjuntas, la expresión de ARNm de K17 puede determinarse mediante la utilización de PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) en un formato cualitativo, y mediante RT-PCR cuantitativa. Más específicamente, puede extraerse el ARN total de una muestra utilizando un reactivo de Trizol. A continuación, puede llevarse a cabo la PCR de transcriptasa inversa utilizando métodos conocidos por el experto ordinario en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse 1 µg de ARN como molde para la síntesis de ADNc, y a continuación pueden mezclarse los moldes de ADNc con cebadores específicos génicos (es decir, secuencias de cebador 5'-3' directos y secuencias 3'-5' inversas) para el ARNm de K17. Se muestran ejemplos de cebadores de K17 en la tabla 6. Asimismo pueden añadirse secuencias de sonda para la detección (por ejemplo, se conocen de la técnica TaqMan™ de Applied Biosystems y SYBR® Green de Thermo Fisher Scientific Systems, y resultan útiles para dicho propósito). A continuación, puede llevarse a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real de cada muestra y los datos obtenidos pueden normalizarse respecto a niveles de control de expresión de ARNm de K17 tal como se obtienen en una muestra de control o normal (es decir, mucosa de vejiga benigna). Ver, por ejemplo, Schmittgen y Livak, Nature Protocols (2008) 3: 1101-1108, 1977. Asimismo pueden utilizarse para detectar ARNm de K17 o, de otro modo, para cuantificar la expresión de ARNm de K17, otras tecnologías de detección de ácidos nucleicos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), la amplificación por círculo rodante, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación dependiente de helicasa, la amplificación por ramificación, o el ADN ramificado.

En otras formas de realización, en las que se detecta la proteína K17, pueden ponerse en práctica los métodos de la presente invención utilizando ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) para determinar la expresión de K17 en la muestra. Además, puede utilizarse la espectrometría de masas y los ensayos de detección de proteínas de flujo lateral para detectar y cuantificar los niveles de expresión de K17 en una muestra. Por ejemplo, tal como se muestra en las tablas 4 y 5, puede prepararse una muestra, tal como orina vaciada, mediante centrifugación a fin de aislar las células de vejiga presentes en la muestra. En determinadas formas de realización, tales como métodos de diagnóstico libres de células, la parte libre de células de la muestra de ensayo de orina puede aislarse y examinarse para la expresión de proteína K17 utilizando un sistema ELISA. Para un método de detección basado en ELISA libre de células, se recubre una placa de microtitulación con una solución de recubrimiento que incluye un anticuerpo antiqueratina 17, tal como anticuerpo monoclonal E3 de K17, y se incuba. A continuación, la placa de microtitulación puede bloquearse para evitar la unión no específica de proteína K17. A continuación, se añade una cantidad predeterminada de una muestra de ensayo a cada pocillo de la placa de microtitulación y se incuba. A continuación, se añade a cada pocillo una solución de detección que contiene anticuerpos de K17 marcados con un marcador detectable, tal como una peroxidasa (por ejemplo, anticuerpo monoclonal 2D10 marcado con peroxidasa) y se incuba. En determinadas formas de realización, los pocillos pueden lavarse antes de añadir un sustrato de detección que es capaz de reaccionar con el marcador detectable para emitir una señal. Tras la incubación, se lee cada placa mediante la emisión de una longitud de onda detectable de luz, tal como 450 nm, y se determina la cantidad de proteína queratina 17 en la muestra. En determinadas formas de realización, a continuación pueden compararse muestras de control, por ejemplo, se someten a ensayo calibradores en serie y a continuación puede compararse la cantidad de proteína k17 en la muestra de ensayo con la observada en los controles a fin de determinar si un sujeto presenta cáncer de vejiga, mediante inferencia a partir de la cantidad de proteína K17 detectada, en la que un diagnóstico de cáncer correlaciona con cantidades detectadas que excedan de las cantidades de control o patrones.

En una forma de realización, los métodos de la presente invención pueden ponerse en práctica mediante la utilización de citometría de flujo. En una forma de realización de la presente invención, se proporciona un sistema de citometría de flujo de microfluidos que puede detectar células marcadas utilizando etiquetas detectables para detectar y/o cuantificar la proteína K17, por ejemplo, para determinar la expresión o niveles de expresión de K17 en una muestra. Tal como se ejemplifica en las figuras 8A-B, se obtiene y se prepara una muestra que contiene células, según la invención, tal como orina vaciada o una muestra de tejido de vejiga. En determinadas formas de realización, la muestra de orina se procesa o se prepara mediante la fijación de las células en metanol y el aislamiento de las células fijadas, mediante centrifugación. En algunas formas de realización, las células se suspenden en solución tampón de fosfato (PBS) y se ponen en contacto con un anticuerpo antiqueratina 17 (tal como anticuerpo monoclonal E3 de K17 (Abcam) y se incuban para permitir la unión a K17 presente en la muestra). A continuación, la muestra puede lavarse a fin de limitar la unión no específica. A continuación, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo secundario que incluye un marcador detectable, tal como ficoeritrina, y se incuba para permitir la unión específica a K17 marcado en la muestra. A continuación, la muestra se suspende en líquido

y se divide en alícuotas en un cartucho. A continuación, el cartucho puede leerse en un sistema de detección de microfluidos, tal como el sistema Moxi Go (Orflo Technologies Inc.) para determinar la cantidad de K17 presente en la muestra.

5 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende: obtener una muestra de orina del sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga; detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en la que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17 y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17, y diagnosticar que el sujeto presenta cáncer de vejiga en el caso de que se detecte una cantidad
10 aumentada de K17 en la muestra en comparación con una muestra de control que es una muestra de orina análoga obtenida de un sujeto sin cáncer.

En determinadas formas de realización, se someten a ensayo muestras de control, por ejemplo muestras de referencia, de la misma manera, y se compara la cantidad de proteína K17 en la muestra de ensayo con la cantidad en los controles a fin de determinar si un sujeto presenta cáncer de vejiga. En otras formas de realización, cualquier
15 cantidad de K17 detectada en una muestra de ensayo superior a una cantidad estándar prefijada correlaciona con niveles aumentados de expresión de K17 y, de esta manera, con el diagnóstico de cáncer de vejiga.

En una forma de realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial seleccionado de entre el grupo que consiste en neoplasia papilar de bajo potencial maligno, carcinoma papilar urotelial de grado bajo, carcinoma papilar urotelial de grado alto y carcinoma urotelial de transición.
20

En otra forma de realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, el anticuerpo anti-K17 es un anticuerpo monoclonal de ratón anti-K17.
25

En otra forma de realización preferida del segundo aspecto de la presente invención, la expresión de K17 en la muestra se detecta mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en inmunohistoquímica, micromatrices, análisis inmunocitoquímico, transferencia western, citometría de flujo, detección por microfluidica y ELISA.
30

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende: obtener una muestra de orina del sujeto y detectar la cantidad de proteína o ARNm de K17 en dicha muestra mediante la utilización de un método de detección cualitativo o cuantitativo, en el que la detección de la proteína o ARNm de K17 en dicha muestra indica que dicho sujeto presenta cáncer de vejiga.
35

En una forma de realización del tercer aspecto de la presente invención, la cantidad de proteína K17 en una muestra se compara con una cantidad de control de K17 presente en una célula de vejiga normal o en una célula no cancerosa (o una muestra de tejido u orina, o muestra celular derivada de cualquiera de ellas) o con la cantidad de proteína K17 en una muestra de control. La comparación puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia para la detección y cuantificación de una proteína. En una forma de realización específica, la cantidad de expresión de K17 indicativa de que un sujeto presenta cáncer de vejiga incluye, aunque sin limitación, un aumento de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000% o superior respecto a la cantidad de expresión en una muestra de control.
40

En otras formas de realización, la expresión de K17 es indicativa de que un sujeto que presenta cáncer de vejiga incluye un aumento de por lo menos 1 vez, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 13 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces o superior, respecto a la cantidad de expresión de K17 mostrada por una muestra de control. En determinadas formas de realización específicas, la expresión de K17 medida mediante PathSQ que corresponde con cáncer de vejiga de estadio temprano en un sujeto se ejemplifica mediante tinción de K17 en un espécimen que muestra un aumento de la expresión de K17 de 10 a 60 veces respecto a la tinción en una muestra de control (benigna). En otras formas de realización, el cáncer de vejiga de estadio temprano en un sujeto se ejemplifica mediante la tinción de K17 en un espécimen de ensayo que muestra un aumento de la expresión de K17 de 13 a 30 veces respecto a la tinción en una muestra de control. En una forma de realización específica, el cáncer de vejiga de estadio temprano en un sujeto se ejemplifica mediante la tinción de K17 en un espécimen de ensayo que muestra un aumento de la expresión de aproximadamente 13 veces, de aproximadamente 15 veces o de aproximadamente 30 veces respecto a la tinción en una muestra de control. En formas de realización preferidas de la presente divulgación, un espécimen de ensayo que muestra expresión de K17 con una puntuación de PathSQ superior a 30 indica que el sujeto presenta una lesión que es igual o superior a neoplasma papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP). En formas de realización en las que la muestra de ensayo muestra expresión de K17 con una puntuación de PathSQ de entre 30 y 35, el sujeto presenta carcinoma papilar urotelial de grado bajo (LG). En formas de realización en las que la muestra de ensayo muestra expresión de K17 con una puntuación de PathSQ de 29 o inferior, el sujeto presenta carcinoma papilar urotelial de grado alto (HG). En una forma de realización específica en la que la muestra de ensayo muestra una expresión de K17 con una puntuación de PathSQ de entre 12 y 46, el sujeto presenta cáncer de vejiga.
45
50
55
60
65

En todavía otras formas de realización, la expresión de K17 indicativa de que un sujeto presenta cáncer de vejiga incluye una lectura de densidad óptica de una muestra de ensayo de por lo menos 0.065, de por lo menos 0.070, de por lo menos 0.075, de por lo menos 0.080, de por lo menos 0.081, de por lo menos 0.085, de por lo menos 0.090 o superior. En determinadas formas de realización, la expresión de K17 indicativa de que un sujeto presenta cáncer de vejiga incluye una lectura de densidad óptica de una muestra de ensayo de entre 0.065 y 0.2, de entre 0.065 y 0.1, de entre 0.075 y 0.2, de entre 0.075 y 0.1, de entre 0.08 y 0.2, de entre 0.08 y 0.15, de entre 0.08 y 0.1, o de entre 0.08 y 0.09, inclusive. En formas de realización específicas, la expresión de K17 indicativa de que un sujeto presenta cáncer de vejiga incluye una lectura de densidad óptica de una muestra de ensayo de 0.065, 0.066, 0.067, 0.068, 0.069, 0.070, 0.071, 0.072, 0.073, 0.074, 0.075, 0.076, 0.077, 0.078, 0.079, 0.080, 0.081, 0.082, 0.083, 0.084, 0.085, 0.086, 0.087, 0.088, 0.089, 0.090, 0.091, 0.092, 0.093, 0.094, 0.095, 0.096, 0.097, 0.098, 0.099, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28, 0.29, 0.30 o superior.

En una forma de realización del tercer aspecto de la presente invención, el cáncer de vejiga es carcinoma urotelial seleccionado de entre el grupo que consiste en neoplasia papilar de bajo potencial maligno, carcinoma papilar urotelial de grado bajo, carcinoma papilar urotelial de grado alto y carcinoma urotelial de transición.

Los presentes métodos asimismo pueden utilizarse para diagnosticar la presencia de otras enfermedades mediadas por K17. De esta manera, los métodos de la presente divulgación no pretenden estar limitados a la descripción anteriormente proporcionada o a los ejemplos a continuación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Los estudios llevados a cabo incluían el análisis de 84 bloques de tejido quirúrgico fijados con formalina e incluidos en parafina (tabla 1). Todos los bloques de tejido quirúrgico se obtuvieron de sujetos (pacientes) con sospecha de cáncer de vejiga. Dichos casos de estudio comprendían las categorías diagnósticas siguientes: urotelio benigno (n=12), neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP) (n=9), carcinoma papilar urotelial de grado bajo (n=23), carcinoma papilar urotelial de grado alto (n=14) y carcinoma urotelial/de transición (n=26). En determinados casos se seleccionó un bloque tejido tras la revisión histológica por un patólogo (DCM) o secciones teñidas con hematoxilina-eosina de resección transuretral (TURBT), biopsia de vejiga o especímenes de cistectomía a fin de confirmar que el tejido diagnóstico tal como se había informado originalmente estaba adecuadamente representado en los bloques de tejido restantes. Los casos que presentaban una cantidad insuficiente de tejido residual o en las que no pudo conservarse tejido diagnóstico para el uso clínico futuro no fueron incluidos en el estudio. El cáncer de vejiga se clasificó según: (i) estadio clínico de acuerdo con Edge SB y Compton CC, *Annals of Surgical Oncology*. (2010) 17:1471-4; y (ii) grado del tumor (tabla 1).

Inmunohistoquímica. Se llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico mediante un método indirecto de inmunoperoxidasa, tal como se ha indicado anteriormente en L. Escobar-Hoyos *et al.*, *Cancer Res*. 2015 sept. 1; 75 (17):3650-62). Brevemente, tras la incubación a 60°C, se desparafinaron secciones de tejido en xileno y se rehidrataron en alcohol. La recuperación de antígenos se llevó a cabo en tampón de citrato a 120°C durante 10 minutos en una cámara de recuperación. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3% y se marcaron secciones durante la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón [E3] anti-K17 humana (Abcam®) o Ki-67 (clon MIB-1, dilución 1:100, DAKO, Carpintería, CA, EE. UU.) para cánceres de vejiga. Otros anticuerpos para la utilización en los presentes métodos, que se unen y marcan K17, incluyendo el anticuerpo anticitoqueratina 17 [EP1623]-marcador citoesquelético ab109725 (Abcam®), anticuerpo monoclonal de conejo de queratina 17 (D73C7) (Cell Signaling Technology®), anticuerpo policlonal (IgG) de cobaya de K17 humana LS-C22650 (LifeSpan BioSciences, Inc.), anticuerpo policlonal de conejo de la queratina 17 orb22505 (Biorbyt). Tras la aplicación del anticuerpo primario, se añadieron a la muestra anticuerpos secundarios de caballo biotinilados (kit R.T.U. Vectastain ABC; Vector Laboratories). El revelado se llevó a cabo con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Dako) y se contratiñó con hematoxilina. Se llevaron a cabo controles negativos en todas las tandas utilizando una concentración equivalente de una inmunoglobulina de subclase correspondiente. Las tinciones inmunohistoquímicas para K17 en el cáncer de vejiga se puntuaron mediante PathSQ, un sistema de puntuación semicuantitativo manual que cuantifica el porcentaje de células tumorales fuertemente teñidas, en ciego a los datos clínicos correspondientes. PathSQ se basa en la proporción de células tumorales con tinción fuerte (es decir, 2+). La tinción de Ki-67 se puntuó como porcentaje de células tumorales con tinción nuclear positiva.

Detección de K17 mediante microfluídica. Además de la inmunotinción de muestras de citología urinaria, las células positivas para K17 en orina pudieron detectarse mediante la aplicación de citometría de flujo o un sistema de microfluidos que puede detectar las células marcadas mediante etiquetas fluorescentes. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema Moxi Go (Orflo Technologies Inc.) que utiliza un cartucho de microfluidos desechable y un lector que puede contar el número de células basándose en el tamaño (método de Coulter) y la señal de fluorescencia (ficoeritrina). La detección de las células positivas para K17 utilizando un dispositivo de microfluidos Moxi Go (Orflo Technologies Inc.) se sometió a ensayo utilizando células positivas para K17 (HeLa) y negativas para K17 (C33) como controles. Las células (aproximadamente 1×10^5 células) se fijaron en metanol al 70% durante

1 hora, se sedimentaron ("pelleted") mediante centrifugación a 1000g durante 5 minutos y después se lavaron con 1 ml de 1X PBS. A continuación, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 100 µl de solución tampón de fosfato (PBS). A continuación, se mezclaron 50 µl de células con 50 µl de anticuerpo de queratina 17 (E3, Abcam) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se sedimentaron las células y se lavaron una vez con 1 ml de PBS y se sedimentaron nuevamente. A continuación, las células se sedimentaron en 50 µl de anticuerpo antirratón marcado con ficoeritrina (PE) (dilución 1:100 en PBS, Abcam) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS y finalmente se resuspendieron en 500 µl de PBS. Las células marcadas se leyeron en un instrumento de microfluidos Moxi Go mediante la adición de 75 µl de cada una de las muestras al cartucho de microfluidos y lectura del mismo en el instrumento.

Detección de K17 mediante ELISA. La proteína queratina 17, en el componente sin células de la orina, se sometió a ensayo mediante ELISA de muestras de orina vaciada. La orina vaciada se centrifugó a 1000g durante 5 min para sedimentar las células. Tras la centrifugación, la parte líquida sin células de la orina se decantó y se utilizó para los ensayos en el ELISA de K17. Para el ELISA, se recubrió una placa de microtitulación de alta unión con 100 µl de solución de recubrimiento de K17 en cada pocillo utilizando anticuerpo monoclonal E3 de K17 a una concentración de 2 µg/ml en 1X PBS (Nordic MUBio, Systeren, Países Bajos) y se incubó a 4°C durante la noche. A continuación, se bloqueó cada placa con 200 µl de tampón de bloqueo (solución de bloqueo PBS SuperBlock, ThermoFisher Scientific) en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora.

Las muestras se sometieron a ensayo mediante la adición de 100 µl de muestra de orina a cada pocillo con 100 µl de tampón de ensayo (suero bovino al 10% en 1X PBS) por duplicado y se incubó a Ta durante 1 hora. Las muestras se sometieron a ensayo con calibradores de K17 (proteína recombinante queratina 17, Abcam) partiendo de 1 µg/ml en dilución en serie de 3 veces en la misma placa. A continuación, se lavó cada placa 4 veces con 400 µl de tampón de lavado (Tween-20 al 0.05% en 1XPBS) y se añadieron 100 µl de solución de anticuerpo de detección que contenía anticuerpo monoclonal 2D10 de K17 marcado con peroxidasa (anticuerpo monoclonal 2D10 de K17-HRP, US Biologicals) a una concentración final de 1 µg/ml en tampón de ensayo, y las muestras se incubaron a TA durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron y se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato TMB (Pierce), y las muestras se incubaron a TA en la oscuridad durante 20 minutos. A continuación, se detuvo la reacción utilizando 100 µl de solución de parada (VWR) y la placa se leyó a 450 nm.

Puntuación de expresión de la proteína queratina. Los portaobjetos se puntuaron con el software ImageJ 1.46 del National Institutes of Health (ver Schneider CA, *et al.*, Nat. Methods. (2012) 9:671-5), un software de procesamiento de imágenes basado en Java, utilizando el plugin de desconvolución del color de DAB-hematoxilina (DAB-H) (ver Ruitrook AC, Johnston DA. Anal. Quant. Cytol. Histol. (2001) 23:291-9) y mediante un sistema de puntuación semicuantitativo manual que cuantifica el porcentaje de células fuertemente teñidas positivamente en ciego respecto a los datos clínicos correspondientes (PathSQ). En determinadas formas de realización, la unidad de medición para el análisis inmunohistoquímico era la puntuación nuclear de PathSQ y la media de puntuación PathSQ de todas las puntuaciones nucleares. Las diferencias de puntuación entre categorías diagnósticas se determinaron mediante prueba de Kruskal-Wallis o mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon (no mostrados). Se calcularon las curvas de receptor-operador y la superficie bajo la curva a fin de evaluar el potencial de los biomarcadores para discriminar diferentes categorías diagnósticas basándose en modelos de regresión logística. El valor de corte óptimo de las curvas de receptor-operador se determinó utilizando el índice de Youden. Ver Youden WJ. Cancer. (1950) 3:32-5.

Ejemplo 2: detección de queratina 17 en células teñidas inmunohistoquímicamente como método diagnóstico para el cáncer de vejiga

Con el fin de determinar los valores diagnósticos de K17 en una o más categorías diagnósticas de cáncer de vejiga de estadio temprano, se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica (tabla 1) para K17 de tejido de muestras de tejido de paciente de cáncer de vejiga en depósito de cuatro categorías diagnósticas: mucosa de vejiga benigna (benigna), neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno (PUNLMP), carcinoma papilar urotelial de grado bajo (LG), carcinoma papilar urotelial de grado alto (HG) y carcinoma urotelial.

La tinción de K17 solo era débilmente detectable (puntuación de PathSQ media de 2.08) en la mucosa de vejiga benigna, aunque se expresaba a nivel elevado en todas las categorías diagnósticas de cáncer de vejiga examinadas. Por ejemplo, la tabla 1 muestra que las puntuaciones de PathSQ medias estaban comprendidas entre 12.3831954 y 45.1781993 para las muestras GA y PUNIMP, respectivamente (tabla 1), mientras que la puntuación de PathSQ media de las muestras de control (no cancerosas) era de aproximadamente 2. Además, las figuras 3A-D y una comparación de las muestras de control mostrados en las figuras 4A-D y 5A-D con las muestras cancerosas teñidas en las figuras 6A-D a 7A-D reveló la presencia de tinción fuerte (aumentada) de queratina 17 en las muestras obtenidas de sujetos que presentaban cáncer de vejiga. Conjuntamente estos resultados muestran que K17 es un marcador diagnóstico fuerte de cáncer de vejiga, tal como carcinoma urotelial de la vejiga ($p < 0.001$).

Entre las muestras de orina sometidas a ensayo que contenían células de pared de vejiga, se detectó la tinción de K17 en 5/5 muestras que habían sido diagnosticadas como sospechosas o positivas para cáncer de vejiga. Ver la

5 tabla 2. Tal como se muestra en la tabla 2, la expresión de K17 se encontraba ausente en casos que eran negativos para neoplasia maligna. Dichos datos muestran claramente la tinción positiva para K17 en todas las muestras obtenidas de un sujeto con cáncer de vejiga (T3-T7). En contraste, las muestras de orina obtenidas de pacientes no cancerosos no mostraban marcaje de K17, en casos con niveles detectables de células de vejiga (N1, N7, N8).
 5 Estos resultados proporcionan apoyo experimental a que la detección de K17 es un marcador diagnóstico del cáncer de vejiga.

10 Los resultados de inmunohistoquímica obtenidos utilizando muestras de tejido de vejiga proporcionaron apoyo a la hipótesis de que la detección de K17 podría ser un marcador sensible y específico para mejorar la precisión del diagnóstico del cáncer de vejiga en especímenes de citología urinaria. Tal como se muestra en la tabla 3 de la presente divulgación, la detección de K17 proporciona sensibilidad y especificidad como marcador diagnóstico del cáncer de vejiga. Por ejemplo, como resultado de múltiples estudios llevados a cabo con muestras de orina vaciada que contenían células de vejiga (figura 2), K17 muestra una sensibilidad (número de muestras positivas para K17 reales/número de muestras positivas para K17 detectadas) de 93% y una especificidad (número de muestras negativas para K17 reales/número de muestras negativas para K17 detectadas) de 91%. Para el estudio 2, la mayoría de muestras falsas positivas se sometieron a ensayo con la aplicación directa por puntos de las muestras, mientras que el estudio 3 se llevó a cabo mediante la utilización de métodos de preparación de muestras ThinPrep. Conjuntamente, los datos proporcionados muestran que la detección de K17 mediante inmunotinción de células de vejiga en muestras de orina puede detectar la presencia de cáncer de vejiga en un sujeto con elevadas sensibilidad y especificidad.
 20

Ejemplo 3: detección de queratina 17 en células mediante métodos de detección basados en dispositivos automatizados

25 Además de la inmunotinción de muestras de citología urinaria, las células positivas para K17 en muestras de citología urinaria son detectables mediante citometría de flujo y sistemas de dispositivos de microfluidos capaces de detectar las proteínas etiquetadas fluorescentemente. En la presente memoria, las células de cáncer marcadas que era conocido que eran positivas para K17 (HeLa, figura 8A) y las células de control negativas para K17 (C33, figura 8B) se aislaron, se marcaron fluorescentemente con anticuerpos de K17 y se analizó la expresión de K17 de las mismas en un dispositivo de detección de microfluidos, tal como se ha indicado anteriormente. Tal como se observa en las figuras 8A-8B, existen significativamente más células marcadas con K17 en HeLa (90.4% células positivas para K17) que el control, las células C33 (35.1% células positivas para K17). Conjuntamente estos datos muestran que la detección de células positivas para K17 puede conseguirse eficientemente utilizando un dispositivo de microfluidos acoplado con la inmunotinción de K17.
 35

Ejemplo 4: métodos diagnósticos basados en K17 libre de células

40 Tal como se muestra en las tablas 4 y 5, las muestras de ensayo compuestas de orina vaciada que no presentan células de vejiga pueden analizarse para la expresión de proteína K17 para determinar si un sujeto presenta cáncer de vejiga. Por ejemplo, la tabla 4 muestra los resultados obtenidos utilizando un método de detección de K17 basado en ELISA. En la presente memoria se analizaron muestras de control (es decir, calibradores) que presentaban una cantidad conocida de proteína K17, con el fin de determinar la sensibilidad del ensayo con el sistema ELISA de las muestras libres de células. Se determinó un valor umbral para la expresión aumentada de proteína K17 a partir de los controles negativos (calibrador cero) en el que la señal detectable era 3 veces la desviación estándar de los blancos de la media del control negativo. Por ejemplo, se utilizó la fórmula a continuación: media de lecturas de ELISA de controles negativos + [3 veces la desviación estándar de los controles negativos]. Basándose en los datos, el límite de sensibilidad del ELISA era de aproximadamente 1 ng/ml de proteína K17.
 45

50 La tabla 5 muestra los datos de 21 muestras de orina libres de células (6 cancerosas, 15 benignas, las muestras positivas se muestran en cursiva) obtenidas de los sujetos. En la presente memoria, cada una de las 21 muestras de ensayo se sometieron a ensayo en un sistema ELISA y se detectó la expresión en cada muestra de K17 en la parte libre de células de la orina vaciada, y se comparó con los niveles de control en la tabla 4. Una muestra de ensayo que mostrase una lectura de densidad óptica (OD) media de 0.081 o superior con un% CV inferior a 20% correlacionaría bien con la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto. Por ejemplo, 67% de las muestras de cáncer (4 de cada 6 muestras) mostraba una lectura de OD de 0.081 o superior, mientras que ninguna de las muestras de control no cancerosas mostraba un nivel detectable de K17 superior a OD 0.078. Debido a que éste era un modelo experimental y no un ensayo de pacientes real, la falta de señal de K17 detectable en dos de las muestras de cáncer se cree que se debe a un factor incontrolado, tal como el tiempo de recolección de las muestras, ya que el primer vaciado de la mañana presentará un nivel más alto de proteína K17 acumulada que los vaciados en otros momentos del día, o el factor de la manipulación de las muestras. Conjuntamente estos datos demuestran que la presente invención proporciona un método mediante el que la medición de niveles detectables de la proteína K17 en muestras de orina libres de células puede utilizarse para detectar la presencia de cáncer de vejiga (por ejemplo, diagnosticar cáncer de vejiga) en un sujeto mediante la utilización de ELISA u otras plataformas de detección basadas en proteínas, tales como la espectrometría de masas o las tecnologías de flujo lateral.
 60
 65

ES 2 921 701 T3

Tabla 1: tinción con queratina 17 en mucosa urotelial de control y cánceres de vejiga uroteliales.

Muestra	Número (N)	Expresión de K17 (media)	Factor de aumento de la expresión de K17 respecto a benigno
Benigno	12	2.08	
PUNLMP	9	65.56	31.5 veces
LG	23	34.57	16.6 veces
HG	14	29.36	14.1 veces
Carcinoma de transición/urotelial	26	49.23	23.7 veces

Tabla 2: análisis inmunocitoquímico de la expresión de K17 en muestras de orina.

5

Número ID de sujeto descodificado	Diagnóstico citológico	Expresión de K17
T1	Sospecha de malignidad	acelular
T2	Sospecha de malignidad	acelular
T3	Positivo para malignidad	moderadamente celular, cambios degenerativos, fuertemente positivo
T4	Positivo para malignidad	moderadamente celular, débilmente positivo
T5	Positivo para malignidad	altamente celular, fuertemente positivo
T6	Positivo para malignidad	moderadamente celular, débilmente positivo
T7	Positivo para malignidad	altamente celular, fuertemente positivo
T8	Sospecha de malignidad	acelular
N1	Negativo para malignidad	escasa celularidad, residuos proteicos, negativo
N2	Negativo para malignidad	acelular
N3	Raramente reactivo y presencia de células uroteliales degeneradas.	acelular
N4	Negativo para malignidad	acelular
N5	Negativo para malignidad	acelular
N6	Negativo para malignidad	acelular
N7	Negativo para malignidad	escasa celularidad, negativo
N8	Negativo para malignidad	moderadamente celular, negativo

Tabla 3: detección de la expresión de K17 mediante inmunotinción de células aisladas de la orina.

	Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3	Estudio 4	Total
Malignas	3	10	5	21	39
Benignas	5	20	18	22	65
Total	8	30	23	43	104
Pos. reales	5	9	5	17	
Neg. falsos	0	1	0	4	
Neg. reales	3	14	18	21	
Pos. falsos	0	6	0	1	Media
Sensibilidad	100%	90%	100%	81%	93%
Especificidad	100%	70%	100%	95%	91%

10 Tabla 4: límite de detección del ELISA utilizado para la detección de proteína queratina 17 en un componente sin células de orina.

Calibrador (ng/ml)	DO-1	DO-2	Media	STDEV	% CV
1000	3.555	3.624	3.590	0.049	1%
333.3	3.578	3.604	3.591	0.018	1%
111.1	2.469	2.289	2.379	0.127	5%
37.0	0.844	0.832	0.838	0.008	1%
12.3	0.323	0.318	0.321	0.004	1%
4.1	0.142	0.14	0.141	0.001	1%
1.4	0.087	0.081	0.084	0.004	5%
0	0.067	0.058	0.063	0.006	10%
Umbral=0.082					

Tabla 5: detección de proteínas K17 en la parte sin células de muestras de orina para detectar la presencia de cáncer de vejiga en sujetos.

Muestras	Diagnóstico	OD-1	OD-2	Media	STDEV	% CV
N281-1	Benignas	0.069	0.070	0.070	0.001	1%
N281-2	Benignas	0.056	0.053	0.055	0.002	4%
CT7699	Benignas	0.055	0.054	0.055	0.001	1%
CT7304	Benignas	0.056	0.054	0.055	0.001	3%
GC 19-1	<i>Cáncer</i>	<i>0.064</i>	<i>0.066</i>	<i>0.065</i>	<i>0.001</i>	2%
GN19-1	Benignas	0.059	0.059	0.059	0.000	0%
GN19-2	Benignas	0.063	0.06	0.062	0.002	3%
GN19-3	Benignas	0.111	0.078	0.095	0.020	25%
GC24-1	<i>Cáncer</i>	<i>0.090</i>	<i>0.093</i>	<i>0.092</i>	<i>0.002</i>	2%
GN24-1	Benignas	0.056	0.055	0.056	0.001	1%
GN24-2	Benignas	0.062	0.061	0.062	0.001	1%
GN24-3	Benignas	0.078	0.078	0.078	0.000	0%
GN24-4	Benignas	0.056	0.056	0.056	0.000	0%
G6117-1	Benignas	0.051	0.055	0.053	0.003	5%
G6117-2	<i>Cáncer</i>	<i>0.072</i>	<i>0.09</i>	<i>0.081</i>	<i>0.013</i>	16%
G6717-1	<i>Cáncer</i>	<i>0.092</i>	<i>0.09</i>	<i>0.091</i>	<i>0.001</i>	2%
G6717-2	Benignas	0.075	0.078	0.077	0.002	3%
G6817-1	<i>Cáncer</i>	<i>0.050</i>	<i>0.059</i>	<i>0.055</i>	<i>0.006</i>	12%
G6817-2	Benignas	0.058	0.062	0.060	0.003	5%
G629-1	<i>Cáncer</i>	<i>0.088</i>	<i>0.095</i>	<i>0.092</i>	<i>0.005</i>	5%
G629-2	Benignas	0.067	0.06	0.064	0.005	8%

5 Tabla 6: juego de cebadores para la detección de ARNm de K17 mediante RT-PCR cuantitativa. Sin embargo, la detección de ARNm de K17 no se encuentra comprendida en las reivindicaciones adjuntas.

Pareja	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Longitud del producto (pb)
1	SEC ID nº 1 CAGTCCCAGCTCAGC ATGAA	SEC ID nº 2 CCACAATGGTACGCAC CTGA	295
2	SEC ID nº 3 AGAACCTCAATGACC GCCTG	SEC ID nº 4 TCCACAATGGTACGCA CCTG	973
3	SEC ID nº 5 CAAGGATGCCGAGG ATTGGT	SEC ID nº 6 ACAATGGTACGCACCT GACG	432
4	SEC ID nº 7 TCCTCAACGAGATGC GTGAC	SEC ID nº 8 CACAATGGTACGCACC TGAC	482
5	SEC ID nº 9 GGATGCCGAGGATT GGTTCT	SEC ID nº 10 AATGGTACGCACCTGA CGG	427
6	SEC ID nº 11 GCAGAGAAGAACCG CAAGGA	SEC ID nº 12 ACCTCTCCACAATGG TACGC	455

ES 2 921 701 T3

Pareja	Cebador directo (5'-3')	Cebador inverso (5'-3')	Longitud del producto (pb)
7	SEC ID nº 13 GCTCAGCATGAAAG CATCCC	SEC ID nº 14 CCTCTTCCACAATGGT ACGC	293
8	SEC ID nº 15 CCATGCAGGCCTTGG AGATA	SEC ID nº 16 GTGGTCACCGGTTCTT TCTTG	298
9	SEC ID nº 17 CCGTCAGGTGCGTAC CATT	SEC ID nº 18 TTGTCATCAGGCAAGG AAGCA	216
10	SEC ID nº 19 GGTGAAGATCCGTG ACTGGT	SEC ID nº 20 TTCCACAATGGTACGC ACCTG	901

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Research Foundation for The State University of New York K Dx Diagnostics, Inc.
- 5 <120> Queratina 17 como un biomarcador para el cáncer de vejiga
- <130> 33851PCT
- 10 <150> 62/371,286
<151> 2016-08-05
- <160> 20
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Primer cebador directo para ARNm de K17
- 25 <400> 1
cagtcccagc tcagcatgaa 20
- <210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Primer cebador inverso para ARNm de K17
- 35 <400> 2
ccacaatggt acgcacctga 20
- <210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Segundo cebador directo para ARNm de K17
- 45 <400> 3
agaacctcaa tgaccgcctg 20
- <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Segundo cebador inverso para ARNm de K17
- 55 <400> 4
tccacaatgg tacgcacctg 20
- 60 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> Tercero cebador directo para ARNm de K17

ES 2 921 701 T3

<400> 5
caaggatgcc gaggattggt 20

5 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Tercero cebador inverso para ARNm de K17

<400> 6
acaatggtac gcacctgacg 20

15 <210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cuarto cebador directo para ARNm de K17

<400> 7
tcctcaacga gatgcgtgac 20

25 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cuarto cebador inverso para ARNm de K17

35 <400> 8
cacaatggta cgcacctgac 20

40 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Quinto cebador directo para ARNm de K17

<400> 9
ggatgccgag gattggtct 20

50 <210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Quinto cebador inverso para ARNm de K17

<400> 10
aatggtacgc acctgacgg 19

60 <210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Sexto cebador directo para ARNm de K17

ES 2 921 701 T3

<400> 11
gcagagaaga accgcaagga 20

5 <210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sexto cebador inverso para ARNm de K17

<400> 12
acctcttcca caatggtacg c 21

15 <210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Séptimo cebador directo para ARNm de K17

<400> 13
gctcagcatg aaagcatccc 20

25 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Séptimo cebador inverso para ARNm de K17

35 <400> 14
cctctccac aatggtacgc 20

40 <210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Octavo cebador directo para ARNm de K17

<400> 15
ccatgcaggc ctggagata 20

50 <210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Octavo cebador inverso para ARNm de K17

<400> 16
gtggtcaccg gttcttctt g 21

60 <210> 17
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Noveno cebador directo para ARNm de K17

ES 2 921 701 T3

<400> 17
ccgtcaggtg cgtaccatt 19

5 <210> 18
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Noveno cebador inverso para ARNm de K17

<400> 18
ttgtcatcag gcaaggaagc a 21

15 <210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Décimo cebador directo para ARNm de K17

<400> 19
ggtgaagatc cgtgactggt 20

25 <210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Décimo cebador inverso para ARNm de K17

35 <400> 20
ttccacaatg gtacgcacct g 21

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la expresión de queratina 17 (K17) en un sujeto que comprende:
 - 5 obtener una muestra de orina de un sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga; y
 - 10 detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en el que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17, y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17.
 2. Método según la reivindicación 1, que comprende además procesar dicha muestra de orina, en el que dicho procesamiento comprende aislar las células de la muestra, lisar las células aisladas en una solución de lisis que comprende urea, aislar las proteínas de la solución de lisis.
 - 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha pluralidad de células de vejiga son células de epitelio de transición, células de tejido conectivo, células musculares, células adiposas o una combinación de las mismas.
 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la expresión de K17 en la muestra se detecta mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en inmunohistoquímica, micromatrices, espectrometría de masas, análisis inmunocitoquímico, transferencia Western, citometría de flujo, detección por microfluídica y ELISA.
 - 20 5. Método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende:
 - 25 obtener una muestra de orina de un sujeto, en el que dicha muestra comprende una pluralidad de células de vejiga;
 - 30 detectar la expresión de K17 en dicha muestra, en el que dicha detección comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo anti-K17, y detectar la unión entre K17 en las células y el anticuerpo anti-K17; y
 - 35 diagnosticar al sujeto con cáncer de vejiga cuando se detecta una cantidad aumentada de K17 en la muestra en comparación con una muestra de control que es una muestra de orina análoga obtenida de un sujeto libre de cáncer.
 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho cáncer de vejiga es el carcinoma urotelial seleccionado de entre el grupo que consiste en neoplasia papilar de potencial maligno bajo, carcinoma papilar urotelial de grado bajo, carcinoma papilar urotelial de grado alto y carcinoma urotelial-de transición.
 - 40 7. Método según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho anticuerpo anti-K17 es un anticuerpo anti-K17 monoclonal de ratón.
 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la expresión de K17 en la muestra se detecta mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en inmunohistoquímica, micromatrices, espectrometría de masas, análisis inmunocitoquímico, transferencia Western, citometría de flujo, detección por microfluídica y ELISA.
 - 45 9. Método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende:
 - 50 obtener una muestra de orina del sujeto; y
 - 55 detectar la cantidad de proteína K17 en dicha muestra utilizando un método de detección cualitativa o cuantitativa, en el que la detección de la proteína K17 en dicha muestra indica que dicho sujeto presenta un cáncer de vejiga.
 - 60 10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha muestra de orina no contiene células.
 11. Método según la reivindicación 9 o 10, en el que la cantidad de proteína K17 en la muestra se detecta mediante un procedimiento seleccionado de entre el grupo que consiste en inmunohistoquímica, micromatrices, espectrometría de masas, análisis inmunocitoquímico, transferencia Western, citometría de flujo, detección por microfluídica y ELISA.
 - 65 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial seleccionado de entre el grupo que consiste en neoplasia papilar de potencial maligno bajo, carcinoma papilar urotelial de grado bajo, carcinoma papilar urotelial de grado alto y carcinoma urotelial-de transición.
 13. Método según la reivindicación 5, en el que detectar la unión entre K17 y el anticuerpo anti-K17 es mediante

análisis inmunohistoquímico o ELISA; comprendiendo además el método:

obtener la muestra de orina de control que comprende una pluralidad de células de vejiga;

5 detectar la expresión de la proteína K17 en la muestra de orina de control, en el que dicha detección comprende:

poner en contacto las células en la muestra de orina de control con el anticuerpo anti-K17, y

10 detectar la unión entre la proteína K17 en las células de la muestra de orina de control y el anticuerpo anti-K17; y

15 diagnosticar al sujeto con cáncer de vejiga cuando se detecta en la cantidad de expresión de la proteína K17 un aumento de 1 vez, un aumento de por lo menos 3 veces, un aumento de por lo menos 5 veces o un aumento de por lo menos 10 veces en la muestra de orina cuando se compara con la cantidad de expresión de la proteína K17 en la muestra de orina de control.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha expresión de la proteína K17 se detecta mediante ELISA.

20 15. Método según la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo anti-K17 es un anticuerpo anti-K17 humana monoclonal de ratón [E3].

25 16. Método según la reivindicación 13, en el que el cáncer de vejiga es un carcinoma urotelial seleccionado de entre el grupo que consiste en neoplasia papilar de potencial maligno bajo, carcinoma papilar urotelial de grado bajo, carcinoma papilar urotelial de grado alto y carcinoma urotelial-de transición.

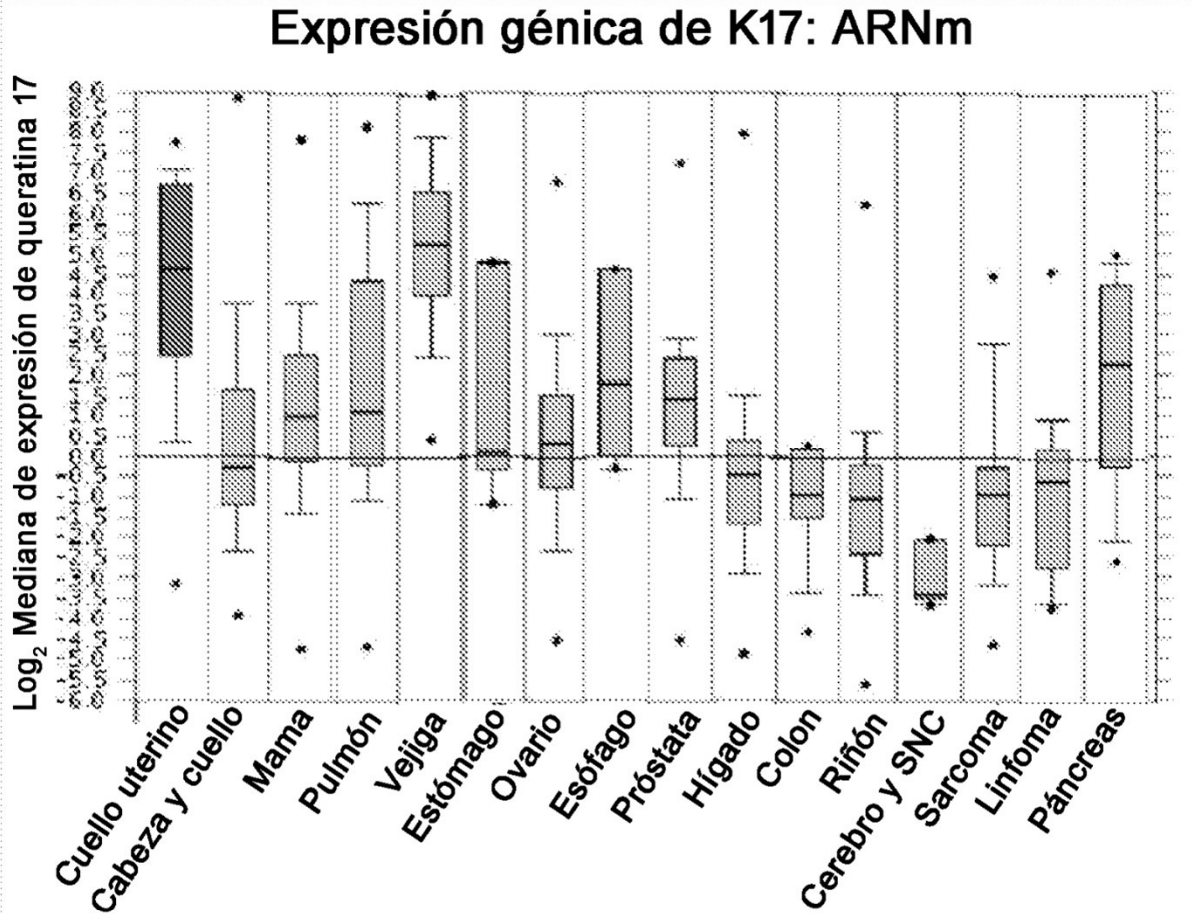


FIG. 1

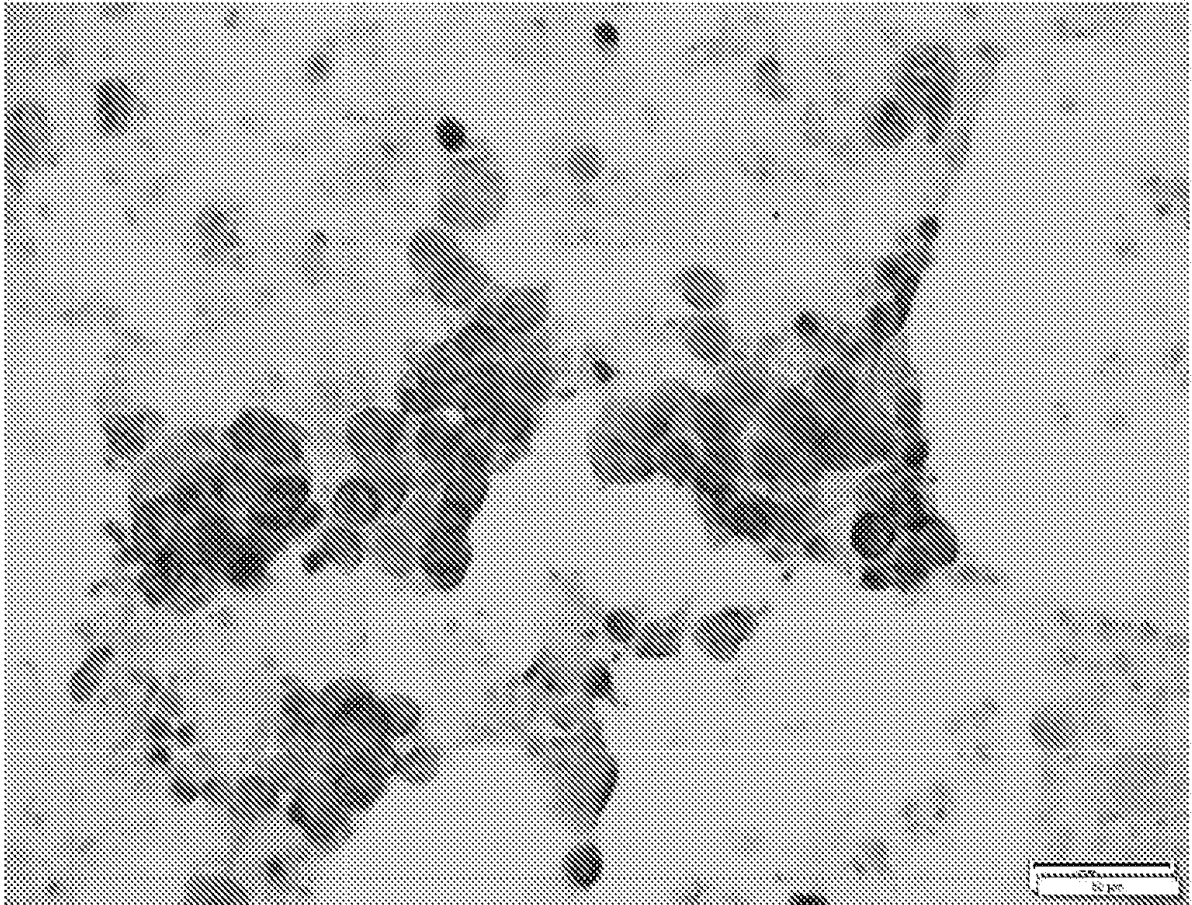
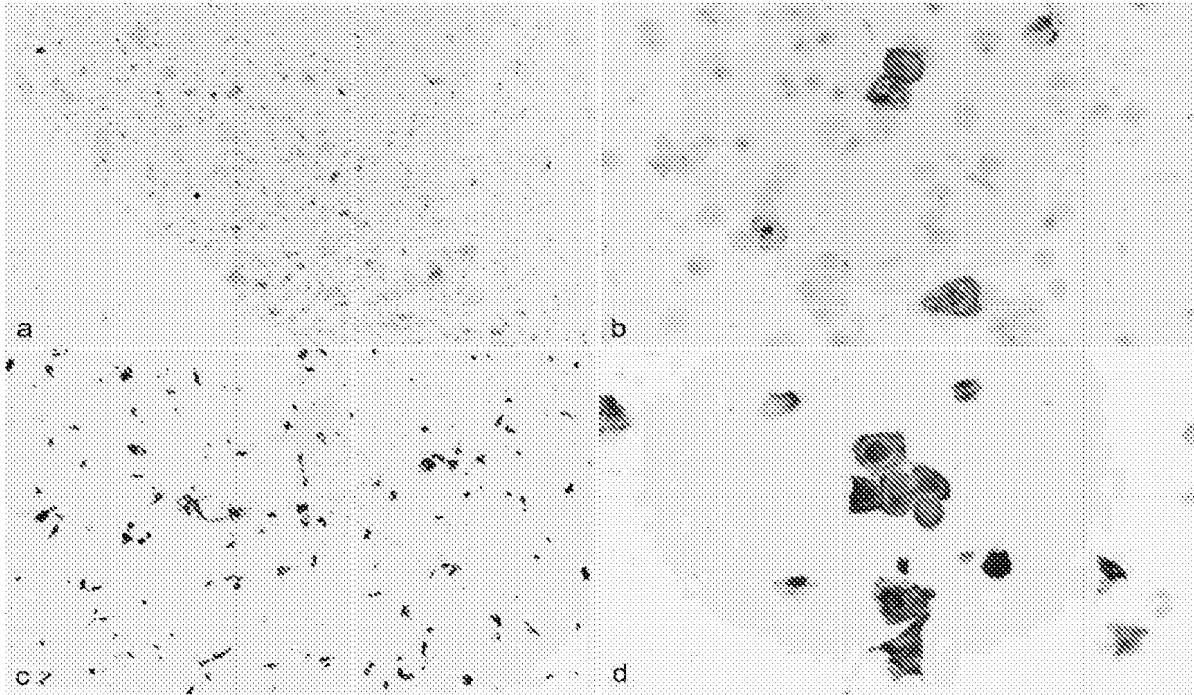
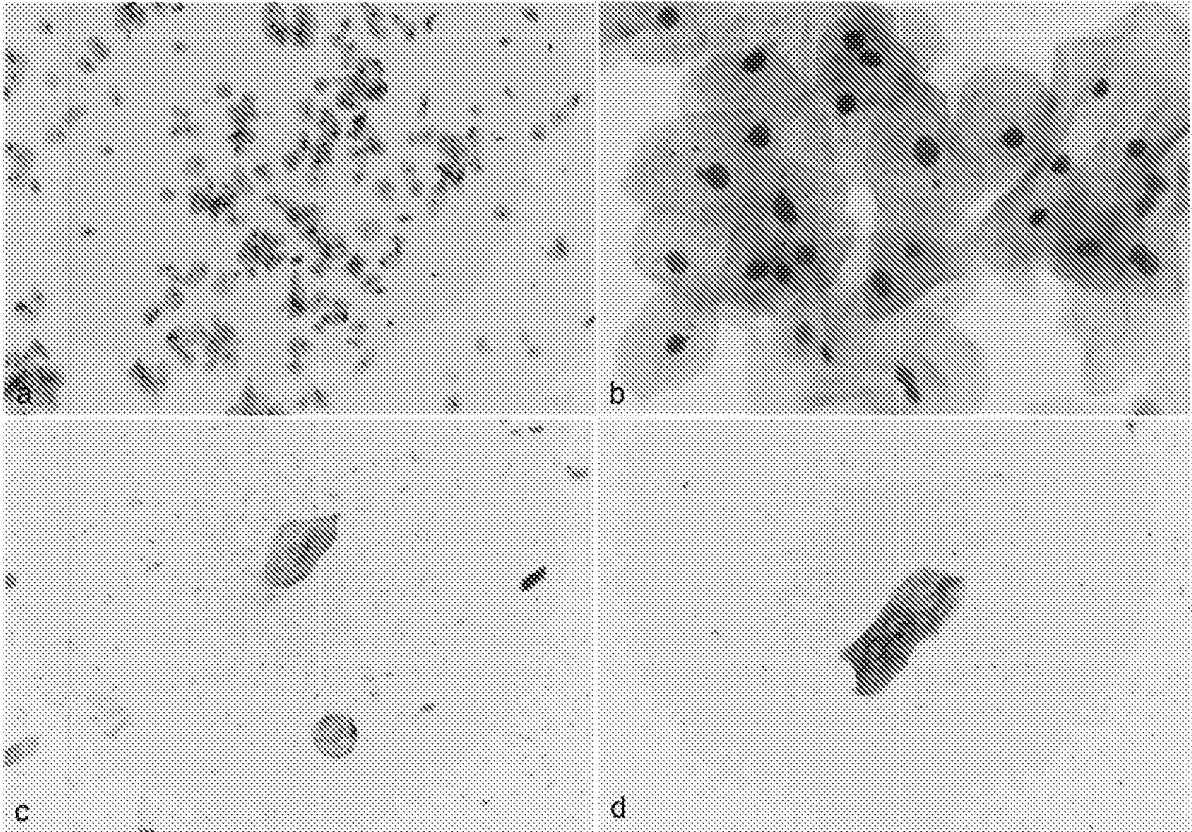


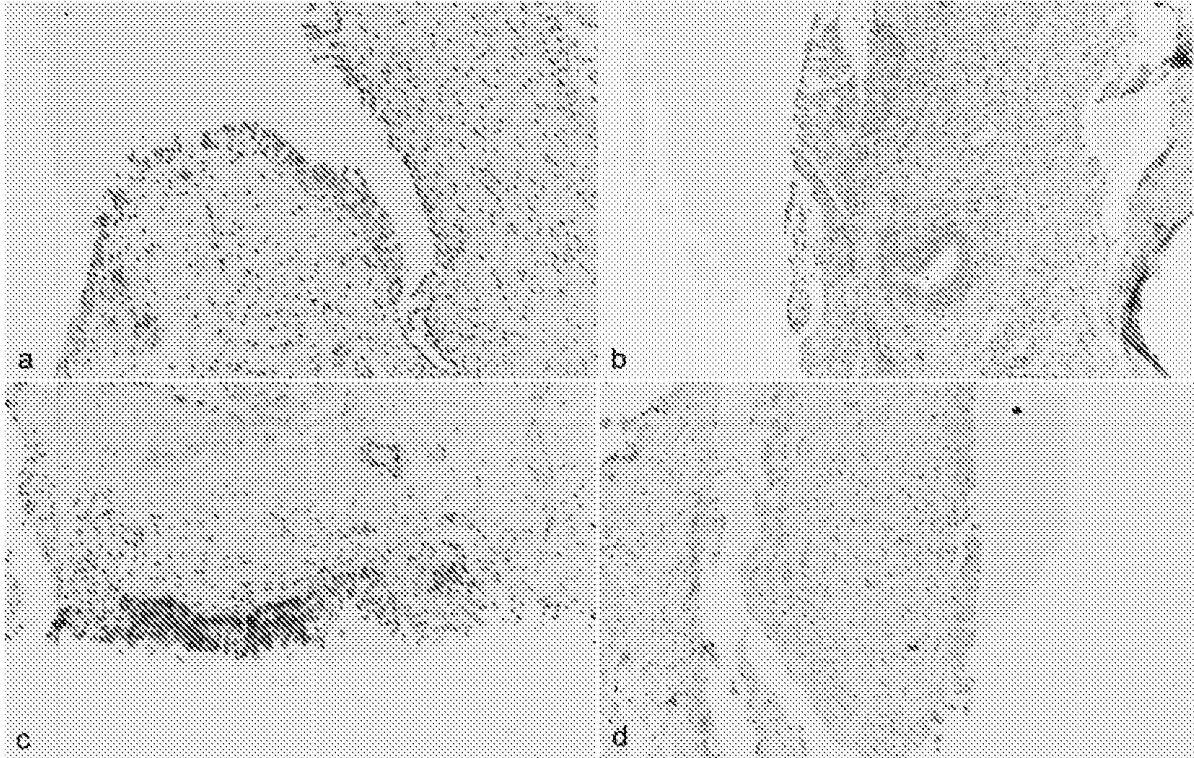
FIG. 2



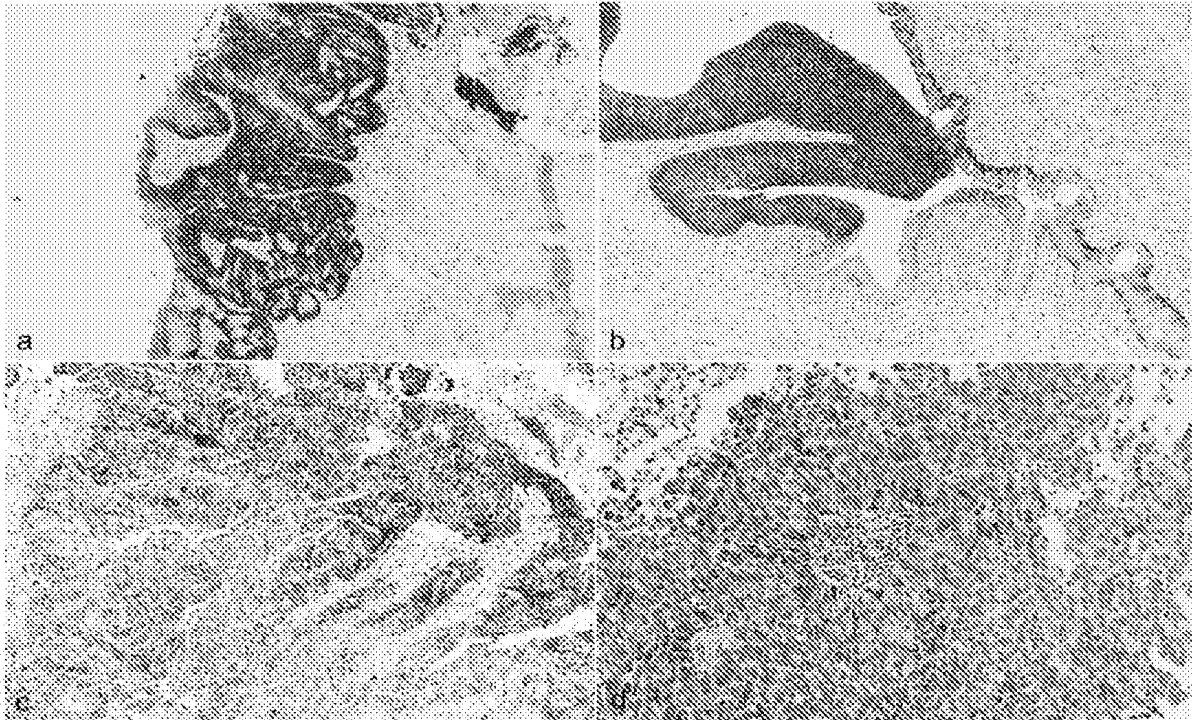
FIGS. 3A-D



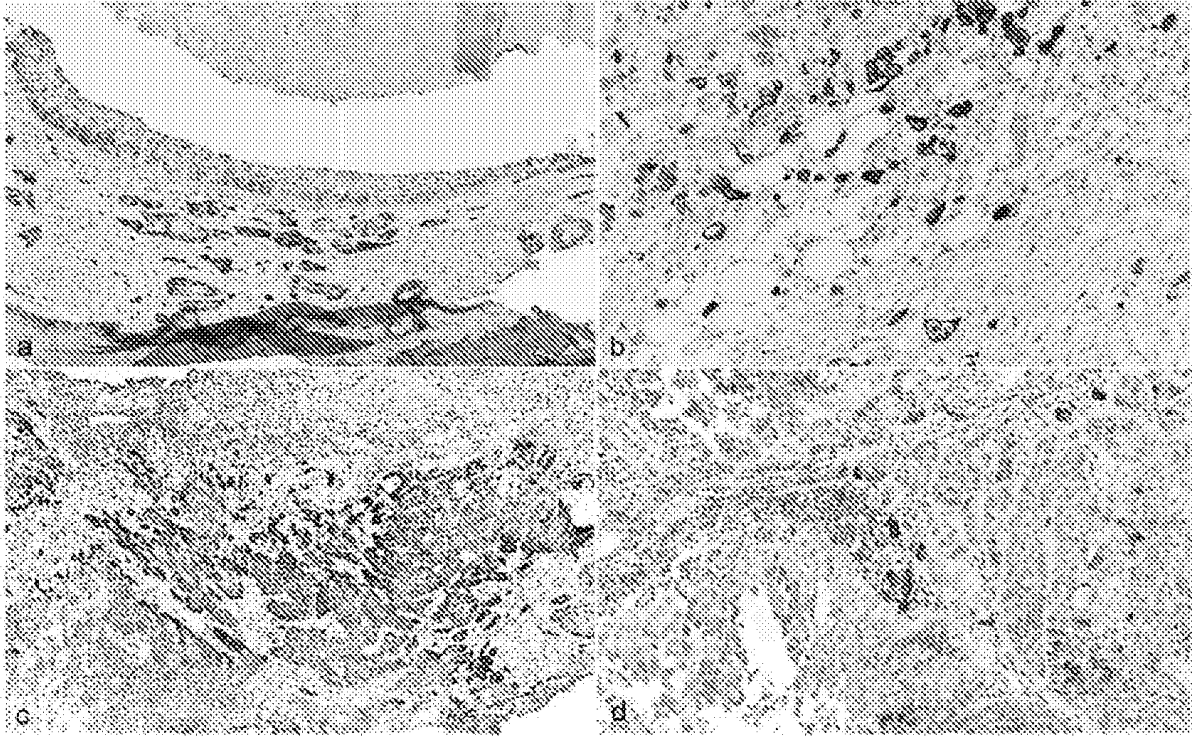
FIGS. 4A-D



FIGS. 5A-D

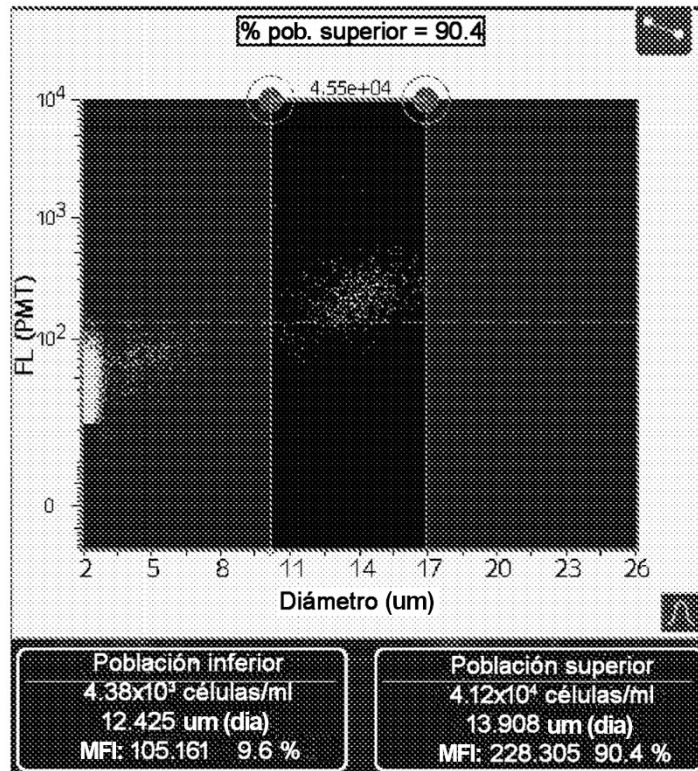


FIGS. 6A-D

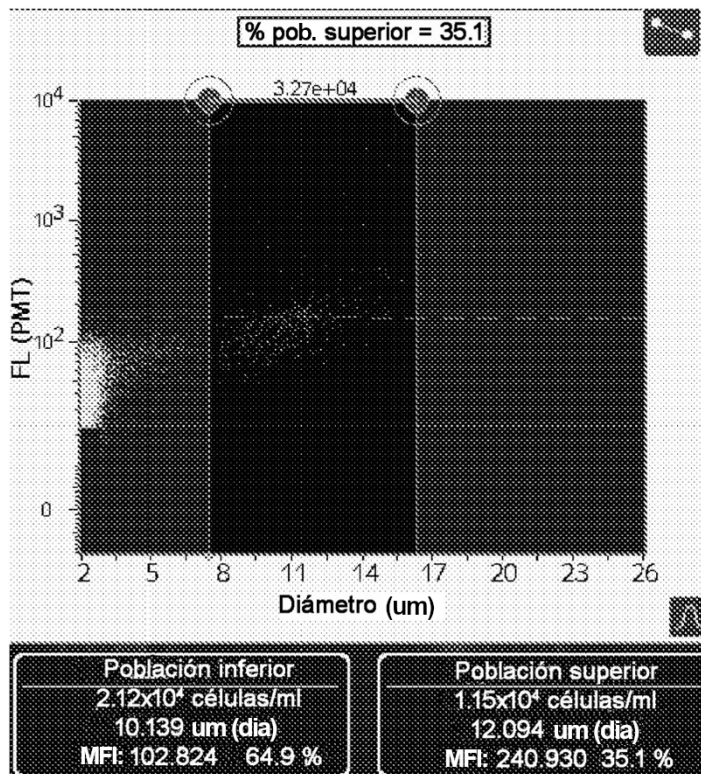


FIGS. 7A-D

A



B



FIGS. 8A-B