



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 276**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06797321 .4**

96 Fecha de presentación : **01.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1930445**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Kit y método para la detección del cáncer urotelial.**

30 Prioridad: **02.09.2005 JP 2005-255370**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2010

73 Titular/es: **TORAY INDUSTRIES, Inc.**
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP
Kyoto University

72 Inventor/es: **Akiyama, Hideo;**
Tanaka, Yoshinori;
Kozono, Satoko;
Nobumasa, Hitoshi;
Ogawa, Osamu y
Takahashi, Takeshi

74 Agente: **Aznárez Urbietta, Pablo**

ES 2 343 276 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

Kit y método para la detección del cáncer urotelial.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para detectar un cáncer urotelial que comprende medir la proteína CXCL1 o la expresión de un gen que codifica tal proteína, método que es útil para detectar o diagnosticar el cáncer urotelial.

10 La presente invención también se refiere un kit para diagnosticar o detectar un cáncer urotelial, kit que comprende una sustancia capaz de unirse a la proteína CXCL1 o a un gen que codifica dicha proteína.

Antecedentes de la invención

15 El "cáncer urotelial" es un término colectivo para el cáncer de vejiga, el cáncer de pelvis renal, el cáncer de uréter urinario y similares. Tales cánceres son provocados por la canceración de una célula epitelial transicional del tracto urinario y se considera que sus propiedades son comunes o están compartidas. El número de pacientes que padecen cáncer urotelial es el segundo más alto de entre los pacientes con cánceres urogenitales después del cáncer de próstata. Según el "Population Survey Report" de 2001 del Departamento de Estadísticas e Información del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social de Japón, el número de pacientes con cáncer de vejiga ascendió a 9.765 varones y 3.243 mujeres, y el número de pacientes que fallecen anualmente en Japón por cáncer de vejiga es de 3.459 varones y 1.587 mujeres. Por otra parte, el número de pacientes con cáncer de pelvis renal o cáncer de uréter es notablemente inferior al correspondiente del cáncer de vejiga, siendo el número de pacientes que fallecieron por estos cánceres de, respectivamente, de 797 y 713 varones y mujeres en total.

Aunque no existen estudios sobre la prevención del cáncer de vejiga o de cualquier otro cáncer urotelial, a menudo el desarrollo del cáncer de vejiga se produce en personas de 50 años o de mayor edad, y la probabilidad de que los varones desarrollen dicho cáncer tiene una proporción 2 a 3 veces más alta que en el caso de las mujeres. Asimismo, los fumadores son 4 veces más susceptibles de desarrollar un cáncer de vejiga que los no fumadores. El cáncer de vejiga se suele clasificar como de dos tipos: esto es, cáncer superficial de vejiga y cáncer infiltrante de vejiga. Los tumores papilares superficiales son de malignidad relativamente baja y sobresalen en la cavidad interna de la vejiga (es decir la superficie interna de la vejiga), pero el grado de infiltración es poco profundo, y la superficie es papiliforme (como una coliflor) con troncos finos. Dicho cáncer puede ser tratado de forma endoscópica; sin embargo, se reproduce en las vejigas de la mitad o de más de la mitad de los pacientes. La profundidad de la invasión del cáncer puede alcanzar el nivel submucoso, aunque no alcanzaría la capa muscular de la vejiga. Por otra parte, el cáncer infiltrante es de malignidad alta, el grado de invasión es profundo, tiende a invadir la parte profunda de la pared de la vejiga y puede metastatizarse a otras partes del cuerpo. Por ello, con el fin de tratar el cáncer infiltrante se requiere un tratamiento que impone una carga para el cuerpo del paciente, tal como la extirpación de la vejiga, la utilización de un agente anticanceroso o radioterapia.

El síntoma más común del cáncer de vejiga es la hematuria indolora; sin embargo, los síntomas pueden ser similares a los de la cistitis, por ejemplo aumento de la frecuencia urinaria, dolor durante la micción o sensación de vaciar de forma incompleta la vejiga. El diagnóstico del cáncer de vejiga se lleva a cabo, por ejemplo, mediante un análisis de orina (diagnóstico citológico), fotografía de rayos X o diagnóstico endoscópico, sin embargo, debido a la falta de marcadores tumorales específicos y altamente sensibles que se puedan utilizar para la sangre o la orina y útiles para el diagnóstico temprano, con frecuencia el cáncer de vejiga se detecta después de que haya progresado. El cáncer urotelial que se desarrolla en sitios distintos de la vejiga tiene también las mismas propiedades. En consecuencia, se desea la aplicación práctica de un método de detección simple mediante la utilización de marcadores tumorales específicos y altamente sensibles para el cáncer urotelial y, en particular, para el cáncer de vejiga.

Se han propuesto diversos marcadores y métodos para la detección y determinación del cáncer de vejiga. Como ejemplos se incluyen métodos en los que el cáncer de vejiga se evalúa en base a los cambios en los niveles de expresión de genes tales como nucleofosmina/B23 (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2004-337120 (A)), HUMP (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2004-248508 (A)) o CYP4B1 o CYP4B2 (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2002-238599 (A)); un método con el que se evalúa el cáncer de vejiga en base a la expresión o la cantidad de una determinada proteína en una muestra de orina (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2004-61288 (A) y H7-309895 (1995) (A)); y un método con el que se evalúa el cáncer de vejiga mediante la concentración de Fas soluble en sangre como indicador (Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 2000-131321 (A)).

60 Descripción de la invención**Problemas a resolver por la invención**

65 La presente invención pretende describir un nuevo marcador tumoral para el cáncer urotelial y proporcionar un método para detectar eficazmente un cáncer urotelial, en particular el cáncer de vejiga.

Medios para resolver los problemas

Se han realizado estudios intensivos con el fin de alcanzar los objetos mencionados anteriormente. En consecuencia, hemos descubierto ahora que los cánceres uroteliales podrían ser significativamente detectados mediante la utilización de un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un marcador tumoral, es decir, a la proteína CXCL1, o, como alternativa, un ácido nucleico capaz de unirse a un gen que codifica dicha proteína, un producto de transcripción del mismo, o el ADNc del mismo. Esto ha llevado a la realización de la presente invención.

Sumario de la invención

Específicamente, la presente invención incluye las siguientes invenciones.

- 1) Un método para detectar el cáncer urotelial que comprende medir la proteína CXCL1, o la expresión de un gen que codifica dicha proteína, *in vitro* en una muestra biológica procedente de un sujeto.
- 2) Un método según el punto (1), en el que se mide la cantidad de proteína o el nivel de expresión del gen.
- 3) Un método según los puntos (1) ó (2), donde se utiliza como indicador el incremento significativo de la cantidad de proteína o del nivel de expresión del gen con respecto al de una muestra de control.
- 4) Un método según el punto (3), en el que el incremento es de al menos 2 veces.
- 5) Un método según el punto (3), en el que el incremento es de al menos 3 veces.
- 6) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (5), en el que la medición se realiza mediante un procedimiento inmunológico.
- 7) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (5), en el que la medición se realiza por hibridación.
- 8) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (7), en el que la medición se lleva a cabo mediante la utilización de una sustancia capaz de unirse a la proteína o el gen.
- 9) Un método según el punto (8), en el que la sustancia capaz de unirse a la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
- 10) Un método según el punto (8), en el que la sustancia capaz de unirse al gen es una sonda de ácido nucleico.
- 11) Un método según el punto (10), en el que la sonda de ácido nucleico comprende un ácido nucleico que se compone de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo, un ácido nucleico consistente en una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos contiguos del mismo.
- 12) Un método según cualquiera de los puntos (9) a (11), en el que se marca el anticuerpo o la sonda de ácido nucleico.
- 13) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (6), (8), (9) y (12), en el que la proteína se mide inmunológicamente en una muestra utilizando un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a la proteína o a un fragmento de la misma, detectando así un cáncer urotelial utilizando como indicador el aumento de la cantidad de proteína con respecto al de una muestra de control.
- 14) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (5), (7), (8) y (10) a (12), en el que el nivel de expresión del gen se mide en la muestra por medio de una sonda, la cual es un ácido nucleico compuesto de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o de un mutante del mismo, un ácido nucleico consistente en una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos contiguos del mismo, detectando así un cáncer urotelial por medio de la utilización, como indicador, del aumento del nivel de expresión del gen con respecto al de una muestra de control.
- 15) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (14), en el que el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer del tracto urinario.
- 16) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (15), en el que la muestra es sangre, plasma, suero u orina.
- 17) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (15), en el que la muestra es un tejido o una célula urotelial.

ES 2 343 276 T3

- 18) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (6), (8), (9), (12), (13) y (15) a (17), en el que la proteína posee la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:2 o un mutante de la misma.
- 5 19) Un método según cualquiera de los puntos (1) a (5), (7), (8), (10) a (12), y (14) a (17), en el que el gen tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo.
- 10 20) Una utilización de un kit para diagnosticar un cáncer urotelial que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une específicamente a la proteína CXCL1 o a un fragmento de la misma, o un derivado modificado químicamente del anticuerpo o de un fragmento del mismo (*in vitro*).
- 15 21) Una utilización de un kit según el punto (20), en el que la proteína tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:2 o un mutante de la misma.
- 20 22) Una utilización de un kit según el punto (20) ó (21), en el que el fragmento de proteína comprende un epítipo que posee al menos 8 aminoácidos.
- 25 23) Una utilización de un kit según cualquiera de los puntos (20) a (22), en el que el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo compuesto por cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer de tracto urinario.
- 30 24) Una utilización de un kit según cualquiera de los puntos (20) a (23), en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo está unido a un soporte de fase sólida.
- 35 25) Una utilización de un kit según cualquiera de los puntos (20) a (24), que comprende además un anticuerpo secundario marcado capaz de unirse al anticuerpo o a un fragmento del mismo.
- 40 26) Una utilización de un kit según el punto (25), en el que la etiqueta del anticuerpo secundario es una enzima, una etiqueta fluorescente o radiactiva.
- 45 27) Una utilización de un kit para diagnosticar un cáncer urotelial que comprende un ácido nucleico consistente en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1, o un mutante del mismo, un ácido nucleico que se compone de una secuencia complementaria al mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico, un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos contiguos del mismo, o un derivado modificado químicamente de uno cualquiera de los mismos (*in vitro*).
- 50 28) Una utilización de un kit según el punto (27), en el que el ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo.
- 55 29) Una utilización de un kit según el punto (27) ó (28), en el que el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo compuesto por cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer de tracto urinario.
- 60 30) Una utilización de un kit según cualquiera de los puntos (27) a (29), en el que el ácido nucleico está unido a un soporte de fase sólida.
- 65 31) Una utilización de un kit según el punto (30), en el que el soporte de fase sólida es un chip de ADN o sustrato para microarrays.

Definiciones

50 Se definen a continuación los términos aquí empleados.

Las indicaciones de ácidos nucleicos, nucleótidos, polinucleótidos, aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas o similares por abreviaturas están de acuerdo con las "Directivas para la preparación de especificaciones que contienen secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos" (Oficina de Patentes de Japón) y la práctica común en la técnica.

55 El término "CXCL1" (quimiocina (motivo C-X-C) ligando-1, GRO- α , GRO-1, actividad estimulante de crecimiento de melanoma, alfa) proteína empleado aquí se refiere a una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 1,1 kDa que se compone de 107 residuos de aminoácidos que pertenecen a la familia de quimiocinas C-X-C. Esta proteína funciona como ligando de CXCR1 o CXCR2, que es un receptor transmembrana 7 e induce la migración, por ejemplo, de neutrófilos, basófilos o mastocitos que expresan dichos receptores (por ejemplo Richmond, A y col., 1988, EMBO Journal, vol. 7, pp. 2025-712033). Asimismo, se ha reportado la actividad de CXCL1 como factor mitogénico en el melanoma maligno humano (Anisowicz, A y col., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, vol. 84, pp. 7188-7192).

65 El término "ácido nucleico" empleado aquí se refiere a un ácido nucleico que incluye ARN o ADN. Dichos ADN incluyen ADNc, ADN genómico y ADN sintético. Dichos ARN incluyen ARN total, ARNm, ARNr y ARN sintético. El término "ácido nucleico" utilizado aquí se emplea de forma intercambiable con un polinucleótido.

ES 2 343 276 T3

El término “ADNc” tal como se emplea aquí se refiere a una hebra de ADN de longitud total de una secuencia complementaria del ARN que resulta de la expresión genética, o un fragmento de ADN que se compone de una secuencia parcial del mismo; el ADNc se puede sintetizar mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR) utilizando ARN como plantilla y un cebador poli T.

5

El término “gen” tal como se utiliza aquí se refiere no solamente a ADN de doble hebra sino también a ADN de una sola hebra, tal como una hebra plus (o hebra sentido) o una hebra complementaria (o hebra antisentido) que constituye el ADN de doble hebra. No está limitado particularmente por la longitud de dicha hebra. En consecuencia, el término “gen” se refiere a uno cualquiera de ADN de doble hebra (incluido el ADN genómico humano), ADN de una sola hebra (hebra plus) (incluido el ADNc), ADN de una sola hebra con una secuencia complementaria a la hebra plus (hebra complementaria) y un fragmento de la misma, salvo que se indique de otro modo. Dicho “gen” incluye no solamente un “gen” representado por una secuencia específica de nucleótidos (o una SEQ ID NO.) sino también otro “gen” que codifica una proteína, la cual tiene una función biológica equivalente a la de una proteína codificada por dicho gen, tal como un homólogo, un mutante tal como una variante de empalme, y un derivado. Ejemplos específicos de “genes” que codifican dicho homólogo, variante, o derivado incluyen “genes” que tienen cada uno una secuencia de nucleótidos que se hibridiza a una secuencia complementaria de una secuencia específica de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 en condiciones astringentes según se describe a continuación.

Los ejemplos de homólogos de proteína humana derivada o de genes que codifican la misma incluyen proteínas o genes derivados de otras especies de organismos que corresponden a proteínas humanas o a genes humanos que codifican las mismas. Dichos homólogos de proteína u homólogos de genes pueden ser identificados por HomoloGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homoloGene/>). Específicamente, cierta secuencia de aminoácido o nucleótido humano se puede someter a los programas BLAST (Karlín, S. y col., Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A., 1993, vol. 90, pp. 5873-5877, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para obtener el número de acceso de la secuencia correspondiente (es decir, la secuencia que muestra la mayor puntuación, valor-E 0, e identidad del 100%). Ejemplos de programas BLAST conocidos incluyen BLASTN (gen) y BLASTX (proteína). Cuando se busca un gen, por ejemplo, el número de acceso obtenido de la búsqueda por BLAST mencionado anteriormente se introduce en el UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), y el UniGeneClusterID obtenido (número identificado por “Hs”) se introduce entonces en el HomoloGene. A partir de la lista que muestra la correlación de los homólogos de genes entre los genes de otra especie de organismo y los genes humanos, se puede seleccionar un gen de la otra especie de organismo como homólogo del gen correspondiente al gen humano representado por determinada secuencia de nucleótidos. En este procedimiento, se puede utilizar el programa FASTA (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-e.html>) en lugar del programa BLAST.

35

Las regiones funcionales de los “genes” no están limitadas, y ejemplos de las mismas incluyen las regiones de control de expresión, regiones de codificación y regiones de exones o intrones.

El término “producto de transcripción” tal como se emplea aquí se refiere a ARN mensajero (ARNm) que se sintetiza a partir de la secuencia de ADN de un gen como plantilla. El ARN mensajero se sintetiza mediante la unión de la ARN-polimerasa a un sitio denominado promotor, que se localiza aguas arriba del gen en cuestión, y posteriormente mediante la unión de ribonucleótidos al extremo 3' para que sea complementario de la secuencia de nucleótidos de ADN. Dicho ARN mensajero contiene no solamente el gen en cuestión, sino también una secuencia de longitud total que abarca desde un sitio de iniciación de la transcripción hasta el terminal de una secuencia poli A que incluye la región de control de expresión, la región de codificación y la región de exones o intrones.

45

El término “producto de traducción” tal como se emplea aquí se refiere a una proteína que se sintetiza en base a la información del ARN mensajero sintetizado mediante transcripción sin tener en cuenta ninguna modificación, tal como un empalme. Durante el proceso de traducción del ARN mensajero, el ribosoma se une en primer lugar al ARN mensajero y entonces los aminoácidos se unen de acuerdo con la secuencia de nucleótidos del ARN mensajero, conduciendo así a la síntesis de una proteína.

50

El término “sonda” tal como se emplea aquí se refiere a un ácido nucleico que se utiliza para detectar específicamente el ARN que resulta de la expresión del gen o un ácido nucleico derivado del mismo y/o un ácido nucleico complementario del mismo.

55

El término “cebador” tal como se emplea aquí se refiere a un ácido nucleico continuo que reconoce específicamente y amplifica el ARN que resulta de la expresión del gen o un ácido nucleico derivado del mismo, y/o un ácido nucleico complementario del mismo.

60

El ácido nucleico complementario (es decir, un hebra complementaria o hebra inversa) se refiere a un ácido nucleico que es básicamente complementario de la secuencia de longitud total de un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en determinada SEQ ID NO., o una secuencia parcial del mismo, (aquí, mencionada convenientemente como “hebra plus”), en base al apareamiento de bases como A:T(U) o G:C. Dicha hebra complementaria, sin embargo, no se limita a una secuencia totalmente complementaria de la secuencia de nucleótidos de una hebra plus de interés; es decir, la hebra complementaria puede tener tanta complementariedad que puede hibridarse a la hebra plus en condiciones astringentes.

65

ES 2 343 276 T3

Tal como se emplea aquí, “condiciones astringentes” significa condiciones tales que una sonda puede hibridarse a una secuencia diana con un grado más alto de detección cuando se compara con su hibridación a otras secuencias (por ejemplo, al menos dos veces la base). Las condiciones astringentes dependen de la secuencia de una diana, dependiendo la variación del ambiente en el que tiene lugar la hibridación. Mediante el control de la astringencia de hibridación y/o de las condiciones de lavado, se puede identificar una secuencia diana que es al 100% complementaria de la sonda.

Tal como se emplea aquí, el término “mutante (o variante)” en el caso de un ácido nucleico se refiere a un mutante natural que resulta de un polimorfismo, mutación, empalme alternativo durante la transcripción o similar, un homólogo del mismo, un mutante basado en la degeneración del código genético, un mutante que comprende una delección, sustitución, adición o inserción de uno o más nucleótidos, preferentemente uno o varios nucleótidos, en una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o una secuencia parcial de los mismos, un mutante que tiene al menos alrededor de un 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos alrededor del 97%, al menos alrededor del 98% o al menos alrededor del 99% de identidad con dicha secuencia de nucleótidos o dicha secuencia parcial de los mismos, o un mutante de ácido nucleico que se hibridiza a un polinucleótido u oligonucleótido que comprende dicha secuencia de nucleótidos o una secuencia parcial de los mismos en condiciones astringentes tal como se ha definido anteriormente. Por otra parte, un “mutante (o variante)” en el caso de una proteína o un péptido se refiere a un mutante que comprende una delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos, preferentemente uno o varios aminoácidos, en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO:2 o una secuencia parcial de los mismos, o un mutante que tiene un porcentaje de identidad de al menos alrededor del 80%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 90%, al menos alrededor del 95%, al menos alrededor del 97%, al menos alrededor del 98%, o al menos alrededor del 99% con dicha secuencia de aminoácidos o secuencia parcial de los mismos.

El término “varios” tal como se emplea aquí significa un número entero de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2.

Tal como se emplea aquí, el “% de identidad” se puede determinar mediante la utilización de los sistemas de búsqueda de proteínas o genes tal como BLAST o FASTA, mencionados anteriormente, con la introducción de un gap (hueco) (Karlín, S. y col., 1993, Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A., vol. 90, pp. 5873-5877; Altschul, S.F. y col., 1990, Journal of Molecular Biology, vol. 215, pp. 403-410; Pearson, W.R. y col., 1988, Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A., vol. 85, pp. 2444-2448).

Tal como se emplea aquí, el término “derivado” en el caso de un ácido nucleico se refiere a un derivado etiquetado con fluoróforo, radioisótopo o similar, un derivado que comprende un nucleótido modificado (por ejemplo, un nucleótido que tiene un grupo funcional tal como halógeno, alquilo (por ejemplo, metilo), alcoxi (por ejemplo, metoxi), tio, o carboximetilo; un nucleótido biotinilado; o un nucleótido que comprende, por ejemplo, la reconstitución de una base, saturación de un doble enlace, desaminación o sustitución de oxígeno por azufre, o similares. Por otra parte, un “derivado” en el caso de una proteína, se refiere a un derivado modificado químicamente, tal como un derivado acetilado, acilado, alquilado, fosforilado, sulfatado, glicosilado o biotinilado/avidinilado o un derivado etiquetado con una enzima, fluoróforo, luminóforo o similar.

Tal como se emplea aquí, el término “kit para diagnóstico (o detección o determinación)” se refiere a un kit que se emplea directa o indirectamente para diagnosticar la presencia o ausencia del desarrollo de un cáncer urotelial, el grado de progreso, la presencia o ausencia de mejora o el grado de mejora (es decir si esta enfermedad mejora o no mejora), o para elegir sustancias candidatas útiles para prevenir, mejorar o tratar el cáncer urotelial. El kit comprende un nucleótido, un oligonucleótido o un polinucleótido que puede reconocer específicamente y unirse a un gen cuya expresión varía u *oscila in vivo*, particularmente en tejido urotelial, asociado al desarrollo del cáncer urotelial. Dichos oligonucleótido y polinucleótido se pueden utilizar eficazmente como sonda para detectar el gen mencionado anteriormente que se expresa *in vivo*, en un tejido o en una célula, basándose en las propiedades mencionadas anteriormente, o como cebador para amplificar el gen expresado *in vivo*. El kit incluye asimismo un anticuerpo que puede detectar una proteína como producto de traducción del gen mencionado anteriormente.

Tal como se emplea aquí, la “muestra biológica” que ha de ser detectada o diagnosticada se refiere a una muestra (o un espécimen) donde el modelo de expresión de la proteína y/o el gen de la invención cambia con el desarrollo del cáncer urotelial y que se toma de un sujeto. De forma más específica, la muestra significa un tejido urotelial y sus ganglios linfáticos periféricos, otro órgano del que se sospecha tiene metástasis, fluido corporal como sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, sobrenadante de cultivo de linfocitos, orina, fluido espinal, saliva, sudor, ascitis y extractos celulares o de órganos.

El término “cáncer urotelial” tal como se utiliza aquí se refiere a un cáncer que se desarrolla en los epitelios transicionales de los cálices, pelvis renal, uréter, vejiga y tracto urinario. Ejemplos de cáncer urotelial incluyen el cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer del tracto urinario. En particular, la presente invención se utiliza preferentemente para detectar el cáncer de vejiga.

El término “sujeto” tal como se emplea aquí se refiere a un animal que padece un cáncer urotelial, preferentemente a un mamífero que padece un cáncer urotelial y especialmente a un ser humano que padece un cáncer urotelial.

El término “específico (o específicamente)” tal como se emplea aquí se refiere al reconocimiento selectivo de determinada proteína o ácido nucleico solo, o a la unión selectiva a la misma o a la reacción con la misma.

Ventajas de la invención

5

La presente invención permite la detección fácil y fiable de un cáncer urotelial. Por ejemplo, el ensayo de la relación entre el nivel de CXCL1 y el nivel de creatinina en la orina de un paciente permite el fácil diagnóstico del cáncer urotelial. La presente invención es particularmente eficaz para detectar tumores infiltrantes.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: muestra los resultados de una comparación de los niveles de expresión de ARNm de CXCL1 medidos por RT-PCR en células cancerosas establecidas de la vejiga y en células uroteliales normales.

15 Fig. 2: muestra los niveles de expresión de las proteínas CXCL1 en sobrenadantes de cultivo de células cancerosas establecidas de la vejiga y de células uroteliales normales.

Fig. 3: muestra la expresión de la proteína CXCL1 en orina de pacientes con cáncer de vejiga.

20 Fig. 4: muestra los resultados de ensayos de los niveles de expresión de las proteínas CXCL1 en la orina de pacientes con cáncer de vejiga, indicando los círculos en blanco valores numéricos procedentes de los datos y estando indicados los promedios y desviaciones estándar con “+”; * indica un riesgo de $p < 0,001$, lo que muestra una diferencia significativa entre los voluntarios sanos (muestras control) y los pacientes con cáncer en fase temprana (Ta); y + indica un riesgo de $p < 0,01$, lo que indica una diferencia significativa entre pacientes con cáncer en fase temprana y pacientes con cáncer progresivo (T1 o avanzado).

Fig. 5: diagrama que muestra los resultados de inmunotinción de la proteína CXCL1 expresada en el tejido de un paciente con cáncer de vejiga. El nivel de tinción era alto en el tejido con cáncer progresivo (pT2G3) y en el foco metastático del ganglio linfático; sin embargo, no se observó tinción alguna en el tejido urotelial normal (pTaG1).

30

Realizaciones preferentes de la invención

Se realizó una exploración por análisis de proteomas de sobrenadantes de cultivo celular para proteínas cuyos niveles de expresión aumentan en las células cancerosas obtenidas de pacientes con cáncer de vejiga en comparación con las células uroteliales normales. Como resultado, hemos descubierto ahora que se detectó una cantidad más alta de proteína CXCL1 de longitud total en sobrenadantes de cultivos de células cancerosas que en sobrenadantes de cultivos de células uroteliales normales. El término “células uroteliales normales” empleado aquí se refiere a células epidérmicas obtenidas de conductos urinarios normales de pacientes que fueron sometidos a nefrectomía pero no aquejados de cáncer urotelial.

40

Asimismo, medimos el nivel de proteína CXCL1 en sangre y orina antes y después de la extirpación del cáncer de un paciente con cáncer de vejiga por medio de un método inmunológico. Como resultado, hemos descubierto ahora que la cantidad de proteína CXCL1 en la sangre y la orina del paciente antes de la extirpación del cáncer de vejiga era más alta que la cantidad después de la extirpación del cáncer de vejiga.

45

Además, recuperamos ARN total expresado en células obtenidas de un paciente con cáncer de vejiga y en células uroteliales, y medimos el nivel de expresión del gen que codifica CXCL1 en el ARN total por el método de arrays de ADN y el método por PCR cuantitativa. Así, se descubrió que la cantidad de ARNm que codifica CXCL1 había aumentado, en comparación con células normales, en células obtenidas del paciente con cáncer de vejiga.

50

En consecuencia, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar un cáncer urotelial que comprende la determinación de la proteína CXCL1, o la expresión de un gen que codifica dicha proteína, *in vitro*, en muestras biológicas procedentes de pacientes.

55 De acuerdo con el método de la presente invención, en general, se mide la presencia o la cantidad existente de la proteína o de la expresión o del nivel de expresión del gen en una muestra biológica. La proteína diana o el gen en la presente invención incluye un mutante que resulta del polimorfismo de acuerdo con un tipo de sujeto (por ejemplo, una raza) o individuo o mutación de empalme. La presencia o la cantidad de proteína o la expresión o el nivel de expresión del gen se pueden medir por medio de una sustancia capaz de unirse específicamente a dicha proteína o gen. Ejemplos de dicha sustancia incluyen un anticuerpo y una sonda de ácido nucleico tal como se describe a continuación.

60

Un anticuerpo que se puede utilizar en la presente invención es un anticuerpo que reconoce y se une específicamente a la proteína CXCL1 (preferentemente una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:2), un fragmento del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo (tal como se define más arriba). Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. El anticuerpo de la presente invención reacciona con uno o varios epítomos que comprenden al menos 5 y preferentemente al menos 8 aminoácidos de la proteína mencionada anteriormente. Se puede preparar un anticuerpo policlonal específico por un método mediante el cual se

65

pasa un antisuero de conejo o similar inmunizado con la proteína CXCL1 por una columna rellena de un soporte, por ejemplo agarosa, a la que se ha unido la proteína CXCL1, y se recupera el anticuerpo IgG unido al soporte de la columna. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal por medio de un método tal como se describe a continuación.

5 Las sondas de ácido nucleico que se pueden utilizar en la presente invención incluyen un ácido nucleico que se compone de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo, un ácido nucleico que se compone de una secuencia complementaria de la misma, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes a dicho ácido nucleico, un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos contiguos del mismo, o un derivado modificado químicamente del mismo (tal como se ha definido anteriormente).

De acuerdo con el método de la presente invención, se somete a ensayo la cantidad existente de la proteína o el nivel de expresión del gen en una muestra biológica según la realización. Cuando la cantidad de la proteína o el nivel de expresión del gen aumentan significativamente con respecto a la muestra de control, se determina que un sujeto padece de cáncer urotelial. Una muestra de control es una muestra equivalente obtenida de un individuo normal o sano o de un individuo que no tiene cáncer urotelial. Ejemplos de dicha muestra incluyen fluido corporal tal como sangre u orina y tejido o células uroteliales. En particular, se recupera ARNm de las muestras de tejido o de células de acuerdo con técnicas convencionales y se determina la cantidad de ADNc generado y amplificado por RT-PCR cuantitativa (en la que esta cantidad corresponde al nivel de expresión del gen diana). Como alternativa, se cultivan las células y se puede determinar el nivel o la concentración de proteína CXCL1 en el sobrenadante del cultivo.

El incremento relativo con respecto a la muestra de control es generalmente de dos o más veces, preferentemente tres veces o más, particularmente de 4 veces o más, y especialmente de 5 veces o más. Si dicho incremento es 3 veces más importante o más, la fiabilidad aumenta. El grado de incremento se puede determinar no solamente por comparación de los valores medidos. Por ejemplo, utilizando una cantidad de cierta sustancia de corrección (por ejemplo, creatinina) como referencia, el grado de aumento se puede determinar también mediante la comparación de los valores relativos de los valores medidos con la cantidad de sustancia de corrección.

Tal como se ha definido anteriormente, los ejemplos de cánceres uroteliales incluyen cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer del tracto urinario. En el caso de detección del cáncer de vejiga, en particular, la fiabilidad de detección del tumor infiltrante era significativamente más alta que la del tumor superficial. En consecuencia, de entre los cánceres uroteliales, la presente invención es particularmente eficaz para la detección de tumores infiltrantes que posiblemente puedan provocar metástasis.

Por tanto, el método para detectar un cáncer urotelial de acuerdo con la presente invención comprende medir el nivel de expresión de un ácido nucleico procedente de un gen que codifica la proteína CXCL1 producido a partir de la célula de cáncer urotelial en una muestra, mediante la utilización de un cebador o de una sonda, así como la medición inmunológica de la proteína CXCL1 en la muestra producida por la célula de cáncer urotelial mediante un anticuerpo. De acuerdo con el método de la presente invención, se puede determinar si un sujeto padece o no un cáncer urotelial y se puede distinguir entre un paciente con cáncer urotelial y un paciente sin cáncer urotelial. Además, la cuantificación del nivel de expresión de un ácido nucleico procedente de un gen que codifica la proteína CXCL1 o el nivel de proteína CXCL1 en una muestra por el método de la presente invención permite determinar el progreso de un cáncer urotelial.

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar un cáncer urotelial, representado por el cáncer de vejiga, mediante la cuantificación de forma inmunológica de la proteína CXCL1 en una muestra que utiliza un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína CXCL1 o a un fragmento de la misma.

Como alternativa, en otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar un cáncer urotelial, representado por el cáncer de vejiga, mediante la medición del nivel de expresión de un gen que codifica la proteína CXCL1 en una muestra, utilizando un ácido nucleico que se compone de una secuencia de nucleótidos que codifican la proteína CXCL1, un ácido nucleico consistente en una secuencia complementaria de la misma, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes a dicho ácido nucleico o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos continuos del mismo.

Detección del gen CXCL1

En la presente invención, un ejemplo de un método para detectar el cáncer urotelial consiste en un método en el que se mide el nivel de expresión de un gen que codifica la proteína CXCL1 producida a partir de la célula de cáncer urotelial en una muestra utilizando un ácido nucleico como cebador o sonda.

En la presente invención, el ácido nucleico que se puede utilizar para determinar la presencia y/o ausencia de un cáncer urotelial o para diagnosticar el cáncer urotelial permite una medición cualitativa y/o cuantitativa de la presencia, del nivel de expresión o de la cantidad existente del gen humano derivado de CXCL1, de un homólogo del mismo, de un producto de transcripción o un ADNc del mismo, o un mutante o derivado del mismo.

ES 2 343 276 T3

El nivel de expresión del gen CXCL1 aumenta significativamente en un tejido con cáncer urotelial en comparación con el tejido no canceroso correspondiente. En consecuencia, la composición de la presente invención se puede utilizar eficazmente para someter a ensayo y comparar los niveles de expresión del gen CXCL1 en tejido no canceroso y en tejido con cáncer urotelial.

5

Los ejemplos de ácidos nucleicos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen uno o una combinación de una pluralidad de ácidos nucleicos seleccionados de entre el grupo compuesto por un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 y una secuencia complementaria de la misma, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ADN que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos y una secuencia complementaria de la misma, un ácido nucleico que comprende 15 o más nucleótidos continuos de las secuencias de ácido nucleico.

10

Los fragmentos del polinucleótido anterior pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de nucleótidos, por ejemplo, de 15 nucleótidos continuos hasta todos ellos, de 15 a 300 nucleótidos, 15 a 250 nucleótidos, 15 a 200 nucleótidos, 15 a 150 nucleótidos, 15 a 140 nucleótidos, 15 a 130 nucleótidos, 15 a 120 nucleótidos, 15 a 110 nucleótidos, 15 a 100 nucleótidos, 15 a 90 nucleótidos, 15 a 80 nucleótidos, 15 a 70 nucleótidos, 15 a 60 nucleótidos, 15 a 50 nucleótidos, 15 a 40 nucleótidos, 15 a 30 nucleótidos o 15 a 25 nucleótidos; de 25 hasta todos los nucleótidos, de 25 a 300 nucleótidos, 25 a 250 nucleótidos, 25 a 200 nucleótidos, 25 a 150 nucleótidos, 25 a 140 nucleótidos, 25 a 130 nucleótidos, 25 a 120 nucleótidos, 25 a 110 nucleótidos, 25 a 100 nucleótidos, 25 a 90 nucleótidos, 25 a 80 nucleótidos, 25 a 70 nucleótidos, 25 a 60 nucleótidos o 25 a 40 nucleótidos; de 50 hasta todos los nucleótidos, 50 a 300 nucleótidos, 50 a 250 nucleótidos, 50 a 200 nucleótidos, 50 a 150 nucleótidos, 50 a 140 nucleótidos, 50 a 130 nucleótidos, 50 a 120 nucleótidos, 50 a 110 nucleótidos, 50 a 100 nucleótidos, 50 a 90 nucleótidos, 50 a 80 nucleótidos, 50 a 70 nucleótidos ó 50 a 60 nucleótidos; de 60 a todos los nucleótidos, 60 a 300 nucleótidos, 60 a 250 nucleótidos, 60 a 200 nucleótidos, 60 a 150 nucleótidos, 60 a 140 nucleótidos, 60 a 130 nucleótidos, 60 a 120 nucleótidos, 60 a 110 nucleótidos, 60 a 100 nucleótidos, 60 a 90 nucleótidos, 60 a 80 nucleótidos ó 60 a 70 nucleótidos; y similares.

15

20

25

Los ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos, tal como se utilizan en la invención, pueden ser ADN o ARN.

30

Los ácidos nucleicos en la composición de la presente invención se pueden preparar mediante las técnicas habituales, tales como tecnología de ADN recombinante, PCR, o un método donde se utiliza un sintetizador automático de ADN/ARN.

35

La tecnología de ADN recombinante o la PCR puede incluir el uso de técnicas tal como las descritas, por ejemplo, en Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons, US (1993); o Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, US (1989).

40

La presente invención también proporciona el uso de un kit para diagnosticar (o detectar) un cáncer urotelial que comprende uno o más ácidos nucleicos, que se pueden emplear como sonda (ocasionalmente como cebador) en el método mencionado anteriormente, un mutante de los mismos y/o un fragmento de los mismos.

45

El uso del kit de la presente invención comprende preferentemente uno o una pluralidad de ácidos nucleicos seleccionados de entre los ácidos nucleicos mencionados anteriormente o de fragmentos de los mismos.

El uso de un kit de la presente invención puede comprender al menos uno de un ácido nucleico compuesto de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1, un ácido nucleico consistente en una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes a dicho ácido nucleico y un fragmento de dicho ácido nucleico.

50

De acuerdo con una realización preferente, el ácido nucleico es un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1, un ácido nucleico que comprende una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes a dicho ácido nucleico o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos contiguos del mismo.

55

De acuerdo con una realización preferente, el fragmento puede ser un ácido nucleico que comprende nucleótidos contiguos tal como de 15 o más, preferentemente de 30 o más, particularmente de 50 o más o especialmente de 60 o más nucleótidos, por ejemplo de 50 a 100 nucleótidos.

60

Las combinaciones anteriores que constituyen el kit a utilizar en la presente invención son meramente ilustrativas y cualquier otro tipo de combinación posible se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Los ácidos nucleicos, mutantes de los mismos y fragmentos de los mismos que pueden estar incluidos en el kit de la presente invención se pueden envasar en distintos contenedores, por separado o en cualquier combinación.

65

El ácido nucleico como sonda a incluir en el kit que ha de utilizarse se puede unir a un soporte de fase sólida. Ejemplos de soportes incluyen sustratos tales como microarrays de ADN o chips de ADN. Específicamente, el microarray de ADN o chip de ADN que comprende el ácido nucleico mencionado anteriormente se encuentra también dentro del alcance de la presente invención.

ES 2 343 276 T3

Los ácidos nucleicos que han de inmovilizarse incluyen todos los ácidos nucleicos de la presente invención tal como se ha mencionado anteriormente. Por ejemplo, dicho ácido nucleico puede comprender uno o una pluralidad de ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos tal como se muestra a continuación:

5 un ácido nucleico que se compone de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1, un mutante de los mismos o un fragmento de los mismos que comprende 15 o más nucleótidos contiguos;

un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1;

10 ácidos nucleicos hibridándose cada uno en condiciones astringentes al ADN consistente en una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma que comprende 15 o más nucleótidos contiguos;

15 ácidos nucleicos hibridándose cada uno en condiciones astringentes al ADN consistente en la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un fragmento de la misma que comprende 15 o más nucleótidos contiguos; y

20 un ácido nucleico que comprende 60 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o una secuencia complementaria de la misma.

De acuerdo con la presente invención, los ácidos nucleicos que han de inmovilizarse pueden ser uno cualquiera de ADN genómico, ADNc, ARN, ADN sintético y ARN sintético o, como alternativa, pueden ser de hebra única o de doble hebra.

25 Ejemplos de chips de ADN que pueden detectar y medir los niveles de expresión del gen diana, ARN o ADNc incluyen el Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix), el Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent), el IntelliGene[®] HS Human Expression CHIP (Takara Bio).

30 Los microarrays de ADN se pueden preparar, por ejemplo, mediante un método en el que se inmovilizan sondas preparadas previamente en una superficie de fase sólida. En este método, se sintetizan los polinucleótidos dentro de los cuales se han introducido los grupos funcionales y los oligonucleótidos o polinucleótidos se depositan en forma de manchas en la superficie de un soporte de fase sólida tratado superficialmente, seguido de la unión covalente a la superficie (por ejemplo, J.B. Lamture y col., *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, pp. 2121-2125; Z. Guo y col., *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22, pp. 5456-5465). En general, los ácidos nucleicos se unen covalentemente al soporte de fase sólida tratado superficialmente a través de un espaciador o agente entrecruzador. Se conoce también un método en el que trozos finos de gel de poli(acrilamida) se alinean sobre la superficie de vidrio y en el que los ácidos nucleicos sintéticos se unen covalentemente a la misma (G. Yershov y col., *Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A.*, 1996, vol. 94, p. 4913). Otro método consiste en preparar un array de microelectrodos sobre microarrays de silicio, sobre cuyo electrodo se forma un sitio de reacción mediante la elaboración de una capa permeable de agarosa que contiene estreptavidina, sitio que se carga positivamente para inmovilizar los polinucleótidos biotinilados en el mismo y se regula la carga en el sitio, y entonces se realiza una hibridación astringente a una velocidad lo más alta posible (R.G. Sosnowski y col., *Proceedings of the National Academic Sciences, U.S.A.*, 1997, vol. 94, pp. 1119-1123).

45 El sustrato del chip de ADN no está particularmente limitado, siempre que el sustrato pueda comprender ADN inmovilizados en el mismo. Ejemplos de sustratos incluyen una placa de vidrio, un chip de silicio, un chip de polímero y una membrana de nylon. Dichos sustratos se pueden someter a un tratamiento superficial, por ejemplo recubrimiento con poli-L-lisina o introducción de un grupo funcional tal como un grupo amino o un grupo carboxilo.

50 El ADN se puede inmovilizar en un sustrato por medio de técnicas comunes sin limitación particular. Ejemplos de dichas técnicas incluyen un método en el que el ADN se deposita en forma de manchas por medio de un dispensador de alta densidad, denominado manchador o robot, un método para pulverizar ADN en un sustrato por medio de un aparato (es decir, chorro de tinta), que lanza finas gotas de una boquilla mediante un elemento piezoeléctrico, y un método para sintetizar nucleótidos sucesivamente en un sustrato. Cuando se utiliza el dispensador de alta densidad, por ejemplo, se colocan en primer lugar distintas soluciones de genes en cada pocillo de una placa multipocillo y las soluciones se retiran de la placa con un alfiler (es decir, una aguja) y son salpicadas sucesivamente en el sustrato. Según la técnica de chorro de tinta, los genes son eyectados por una boquilla y se ordenan en el sustrato a alta velocidad. En la síntesis de ADN en el sustrato, el nucleótido del sustrato está protegido por un grupo funcional que es capaz de salir del sustrato con luz, y se aplica la luz selectivamente sólo al nucleótido en una posición específica mediante la utilización de un enmascaramiento, desprotegiendo así el grupo funcional. A continuación, se añaden los nucleótidos a la mezcla de reacción, nucleótidos que se acoplan a los nucleótidos del sustrato, y se repite este paso.

65 Las condiciones de hibridación no están particularmente limitadas. Por ejemplo, la hibridación se lleva a cabo en 3 a 4 x SSC y un 0,1% a un 0,5% de SDS a 30°C hasta 50°C durante 1 a 24 horas, preferentemente en 3,4 x SSC y un 0,3% de SDS a 40°C hasta 45°C durante 1 a 24 horas, seguido del lavado. El lavado se lleva a cabo en continuo, por ejemplo, con una solución que contiene 2 x SSC y un 0,1% de SDS, con una solución de 1 x SSC, y con una solución de 0,2 x SSC a temperatura ambiente. El término "1 x SSC" se refiere a una solución acuosa que contiene 150 mM de cloruro de sodio y 15 mM de citrato de sodio (pH 7,2). Preferentemente, una hebra complementaria se

queda hibridizada a la hebra (+) diana incluso si se lava en dichas condiciones. Los ejemplos específicos de dicha hebra complementaria incluyen una hebra que consiste en la secuencia de nucleótidos totalmente complementaria de la secuencia de nucleótidos de la hebra (+) diana, y una hebra que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad con dicha hebra.

5

Cuando se lleva a cabo una PCR en condiciones astringentes de hibridación utilizando fragmentos de polinucleótido obtenidos del kit de la presente invención como cebadores, por ejemplo, se utiliza un tampón de PCR que comprende 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl y de 1 a 2 mM de MgCl₂, y el tratamiento se lleva a cabo a una temperatura de fusión, T_m - (5 a 10°C), calculada a partir de la secuencia del cebador, durante aproximadamente 15 segundos a 1 minuto. El valor T_m se puede calcular, por ejemplo, mediante la ecuación $T_m = 2 \times (\text{el número de residuos de adenina} + \text{el número de residuos de timina}) + 4 \times (\text{el número de residuos de guanina} + \text{el número de residuos de citosina})$.

10

Se describe otro ejemplo de “condiciones astringentes” para la hibridación en, por ejemplo, Sambrook, J. & Russel, D., *Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15 de enero de 2001, vol. 1: 7.42 a 7.45, vol. 2: 8.9 a 8.17, y se pueden emplear dichas condiciones en la presente invención.

15

Detección de la proteína CXCL1

En la presente invención, otro ejemplo de método para detectar un cáncer urotelial consiste en un método en el que se mide la expresión o cantidad de proteína CXCL1 producida en la célula de cáncer urotelial en la muestra por medio de un anticuerpo.

20

En la presente invención, los anticuerpos que se pueden utilizar para determinar la presencia y/o ausencia de cáncer urotelial o para diagnosticar el cáncer urotelial permite un ensayo cualitativo y/o cuantitativo del nivel de expresión o de la cantidad de producto de traducción del gen humano derivado de CXCL1, un homólogo del mismo, un mutante del mismo o un derivado del mismo.

25

Los anticuerpos que se pueden utilizar en la presente invención no están particularmente limitados, siempre que puedan unirse específicamente a la proteína CXCL1 o a fragmentos de la misma. El anticuerpo a utilizar en la invención es un anticuerpo monoclonal o policlonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal. El tipo globulina del anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que el anticuerpo tenga las propiedades mencionadas anteriormente y puede ser uno cualquiera de IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD, preferentemente IgG e IgM. Por ejemplo, se puede utilizar el anticuerpo monoclonal 21326.1 (ab10375, Abcam) y se puede usar el anticuerpo policlonal comercial de Abcam. Como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que se une específicamente a la proteína CXCL1 de acuerdo con el método descrito a continuación.

30

35

Preparación del inmunógeno

Con el fin de preparar un anticuerpo en la presente invención, se prepara una proteína como inmunógeno (antígeno). Como proteína inmunógena se utiliza la proteína CXCL1 o un fragmento de la misma. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de la proteína CXCL1 que se puede utilizar como inmunógeno en la presente invención y la secuencia de ADNc (SEQ ID NO:1) que codifica la proteína, se describe con los números de acceso NP_001502 y NM_001511 en el GenBank. En consecuencia, se puede sintetizar un fragmento de la proteína CXCL1 a utilizar como inmunógeno gracias a la información descrita para la secuencia de aminoácidos de acuerdo con un método conocido en la técnica, tal como un método de síntesis de péptidos en fase sólida. Cuando un fragmento de la proteína CXCL1 se utiliza como inmunógeno, está preferentemente ligado a una proteína transportadora, tal como KLH o BSA.

40

45

Se puede obtener la proteína CXCL1 mediante la utilización de la información del ADNc que codifica la proteína CXCL1 por medio de técnicas conocidas de ADN recombinante. El ADNc que codifica la proteína CXCL1 se puede preparar por clonación de ADNc. Se extrae el ARN total de un tejido de un cuerpo vivo, tal como un monocito, una célula de melanoma, una célula epitelial respiratoria, un queratinocito o un macrófago alveolar, donde se expresa el gen CXCL1 diana de la presente invención. El ARN total extraído se aplica a una columna de oligo dT celulosa para obtener poli A(+)ARN, sobre esta base se prepara la librería de ADNc mediante RT-PCR y los clones de ADNc diana se obtienen de la librería resultante mediante un método de screening (exploración), tal como screening por hibridación, screening de la expresión o screening de anticuerpos. Si es necesario, los clones de ADNc pueden ser amplificados por PCR. Las sondas o los cebadores pueden seleccionarse y sintetizarse a partir de cualquier secuencia que comprende de 15 a 100 nucleótidos contiguos de las secuencias de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:1. La técnica de clonación de ADNc se describe, por ejemplo, en Sambrook, J. & Russel, D., *Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 15 de enero de 2001, vol. 1: 7.42 a 7.45, vol. 2: 8.9 a 8.17.

50

55

60

La proteína CXCL1 se puede obtener, por ejemplo, mediante la incorporación del clon de ADNc obtenido de la forma mencionada anteriormente en un vector de expresión, mediante el cultivo de células huésped procarióticas o eucarióticas transformadas o transfectadas con el vector y mediante la obtención de la proteína CXCL1 de las células o del sobrenadante del cultivo. Ejemplos de vector de expresión incluyen plásmidos derivados de *E. coli* (por ejemplo pET21a, pGEX4T, pC118, pC119, pC18 o pC19), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo pUB110 y pTP5) y plásmidos derivados de levadura (por ejemplo YEp13, YEp24 o YCp50). Un ejemplo de ADN de fago es el

65

fago λ (por ejemplo λ gt11 o λ ZAP). Además, se pueden utilizar también vectores de virus de animal como el vector del virus de la vaccinia o los vectores de virus de insectos como el vector de baculovirus. Se dispone de vectores y sistemas de expresión de Novagen, Takara Shuzo (Japón), Daiichi Pure Chemicals (Japón), Qiagen, Stratagene, Promega, Roche Diagnostics, Invitrogen, Genetics Institute, o de Amersham Bioscience.

5 El ADNc de CXCL1 se inserta en un vector en primer lugar segmentando el ADN purificado con una enzima de restricción adecuada, e insertando el resultante en un sitio de la enzima de restricción o en un sitio de multiclonación de un vector adecuado para ligar el ADNc al vector. Los vectores pueden comprender, además del ADN que codifica la proteína mencionada anteriormente, elementos reguladores tal como promotores, potenciadores, señales de polia-
10 denilación, sitios de unión al ribosoma, origen de replicación, terminadores y marcadores de selección. Además, para facilitar la purificación de un polipéptido se puede añadir una etiqueta peptídica al terminal C o N del polipéptido para formar un polipéptido de fusión. Ejemplos de etiquetas peptídicas representativas incluyen, pero no se limitan a, la repetición (histidina)₆₋₁₀, FLAG, péptido myc y proteína GFP. Se describen técnicas de ADN recombinante en Sambrook, J. & Russel, D. (más arriba). Un fragmento de ADN se liga a un fragmento de vector utilizando una ligasa
15 de ADN conocida.

Ejemplos de células huésped que se pueden utilizar son células procarióticas tales como bacterias (por ejemplo *E. coli* o *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), células de insectos (por ejemplo células Sf) y células de mamíferos (por ejemplo células COS, CHO y BHK). El método para introducir un vector recombinante en una célula huésped no está particularmente limitado, siempre que dicho método consista en introducir ADN en una célula huésped relevante. Por ejemplo, se puede emplear un método que implica el uso de iones calcio, un método que implica el uso de liposomas, electroporación o microinyección.

Como medio de cultivo para un transformante obtenido con el uso de un microorganismo tal como *E. coli* o una levadura como huésped, se puede utilizar un medio natural o sintético, siempre que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo y sea capaz de cultivar eficazmente el transformante. El cultivo se realiza generalmente en condiciones aeróbicas, por ejemplo, cultivo en matraces oscilantes o cultivo por agitación y aireación, a 37°C durante 6 a 24 horas. Durante el cultivo, se mantiene el nivel de pH a
25 alrededor de neutro. Se ajusta el pH con un ácido orgánico o inorgánico, una solución alcalina o similar. Durante el cultivo, si es necesario, se puede añadir al medio un antibiótico tal como ampicilina o tetraciclina. Cuando se cultivan transformantes de células de mamíferos, dichas células se cultivan en un medio adecuado y se recuperan las proteínas generadas del sobrenadante de cultivo o de las células. En este caso, un medio puede comprender o no suero sanguíneo, siendo preferente un cultivo en un medio libre de suero. Cuando la proteína CXCL1 se produce en microorganismos o células, dichos microorganismos o células pueden alterarse para extraer las proteínas. Cuando la proteína CXCL1 es secretada fuera de los microorganismos o células, el caldo de cultivo se puede utilizar en ese estado o someterse a
30 centrifugación u otro procedimiento para eliminar los microorganismos o células.

Cuando las proteínas de la presente invención se producen sin la adición de una etiqueta peptídica, la proteína puede purificarse, por ejemplo mediante ultrafiltración, adición de sales, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico. Además, se pueden realizar en combinación una cromatografía de afinidad, HPLC, cromatografía hidrofóbica, cromatografía isoeléctrica o similar. Cuando la proteína tiene una etiqueta peptídica, tal como una repetición de histidina, FLAG, myc o GFP, se puede llevar a cabo una cromatografía de afinidad adecuada para cada etiqueta peptídica de acuerdo con técnicas convencionales. Preferentemente se construye un vector de expresión que facilite el aislamiento o la purificación. Cuando el vector de expresión se construye para expresarse en forma de proteína de fusión de un polipéptido con una etiqueta peptídica y dicho vector se utiliza para preparar la proteína mediante técnicas de ingeniería genética, el aislamiento o la purificación del polipéptido es fácil. Si se obtiene o no la proteína CXCL1 podría confirmarse por electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS u otros medios.

El anticuerpo así obtenido que reconoce la proteína puede unirse específicamente a la proteína a través de un sitio de unión con el antígeno del anticuerpo. Específicamente, la proteína CXCL1, un fragmento de la misma, un mutante de la misma, una proteína de fusión, o similar, se puede utilizar como inmunógeno para producir anticuerpos inmunorreactivos.

De forma más específica, la proteína, un fragmento de la misma, un mutante de la misma o una proteína de fusión comprende un determinante o epítipo antigénico que provoca la formación de anticuerpos, determinante o epítipo de antígeno que puede tener una estructura lineal o una estructura de orden superior (o desconectada). Dicho determinante o epítipo de antígeno puede ser identificado por cualquier método conocido en la técnica.

Los anticuerpos de cualquier aspecto son elicitados por las proteínas de la presente invención. Si se aísla la totalidad, una parte o un epítipo de la proteína, se puede preparar un anticuerpo monoclonal o policlonal según técnicas convencionales. Un ejemplo de método para preparar un anticuerpo se describe en Kennet y col., (ed.), Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, New York, 1980.

Posteriormente, la proteína resultante se disuelve en un tampón para preparar un inmunógeno. Si es necesario, se puede añadir un adyuvante para facilitar la inmunización. Ejemplos de adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund comercial, adyuvante incompleto de Freund, hidróxido de aluminio (alum) y péptido de muramilo. Se puede utilizar cualquiera de dichos adyuvantes en una mezcla por adición.

*Preparación de anticuerpo monoclonal**(1) Inmunización y recogida de células productoras antígenos*

5 El inmunógeno así obtenido se administra a un animal mamífero tal como una rata, un ratón (por ejemplo cepa endogámica de ratón Balb/c) o un conejo. La dosis de inmunógeno se determina adecuadamente dependiendo, por ejemplo, del tipo de animal que se debe inmunizar o de la vía de administración, y es aproximadamente de 50 a 200 μg por animal. La inmunización se realiza en primer lugar mediante la inyección de un inmunógeno de forma subcutánea o intraperitoneal. Los intervalos de inmunización no están particularmente limitados. Después de la primera inmunización, se lleva a cabo la inmunización de refuerzo de 2 a 10 veces, preferentemente de 3 ó 4 veces, a intervalos de varios días a varias semanas, y preferentemente a intervalos de 1 a 4 semanas. Después del primer refuerzo de inmunización, el título del anticuerpo del suero sanguíneo del animal inmunizado se mide repetidas veces, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Cuando el título del anticuerpo alcanza una meseta, se inyecta el inmunógeno de forma intravenosa o intraperitoneal para completar la inmunización final. Se recogen las células productoras de anticuerpos 2 a 5 días, preferentemente 3 días, después de la inmunización final. Ejemplos de células productoras de anticuerpos incluyen células de bazo, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica, preferentemente células de bazo o células de ganglios linfáticos regionales.

(2) Fusión celular

20 La presente invención proporciona asimismo líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos de proteínas relevantes. Dichos hibridomas se pueden producir e identificar mediante técnicas convencionales. El método para producir dichas líneas celulares de hibridoma comprende la inmunización de un animal con una proteína de la invención, eliminar las células del bazo del animal inmunizado, fusionar las células del bazo con una línea celular de mieloma, producir células de hibridoma a partir de las mismas, y determinar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a la enzima en cuestión. Las líneas celulares de mieloma que han de fusionarse con las células productoras de anticuerpos pueden ser líneas celulares establecidas de animales, como de ratones, comerciales. Preferentemente, las líneas celulares a utilizar poseen selectividad por un medicamento; esto es, no pueden sobrevivir en el medio de selección HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timina) en un estado no fusionado, mientras que pueden sobrevivir solamente en un estado fusionado con células productoras de anticuerpos. Las células establecidas derivan preferentemente de un animal de la misma especie que el animal que ha de ser inmunizado. Un ejemplo de la línea celular de mieloma es la cepa P3X63-Ag.8 (ATCC TIB9), que es una línea de células deficientes en hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT) procedentes de ratón BALB/c.

35 Posteriormente, las líneas celulares de mieloma se fusionan con las células productoras de anticuerpos. La fusión celular se lleva a cabo en un medio libre de suero para cultivo de células de animales, tal como medio DMEM o RPMI-1640, mezclando las células productoras de anticuerpos con las líneas celulares de mieloma a aproximadamente 1:1 hasta 20:1, en presencia de un acelerador de fusión celular. Como acelerador de fusión celular, se puede utilizar polietilenglicol con un peso molecular medio de 1.500 a 4.000 dalton a una concentración, por ejemplo, de aproximadamente el 10 al 80%. Opcionalmente, se puede emplear un agente auxiliar, tal como sulfóxido de dimetilo, combinado con el fin de aumentar la eficacia de fusión. Además, las células productoras de anticuerpos se pueden fusionar con las líneas celulares de mieloma utilizando un aparato comercial de fusión de células mediante estímulo eléctrico (por ejemplo, electroporación).

(3) Selección y clonación de hibridomas

45 Los hibridomas de interés se seleccionan de entre las células fusionadas. Con este fin, la suspensión celular se diluye adecuadamente, por ejemplo en un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal, luego se distribuye la suspensión en partes alícuotas en cada pocillo de una placa de microtitulación a aproximadamente dos millones de células/pocillo, pocillos a los que se añade un medio de selección y, a continuación, se lleva a cabo el cultivo mientras se cambia apropiadamente el medio de selección por el mismo medio fresco. La temperatura de cultivo es de 20°C a 40°C, preferentemente de alrededor de 37°C. Cuando la célula de mieloma es una cepa deficiente en HGPRT o una cepa deficiente en timidina-quinasa, se puede cultivar selectivamente un hibridoma de una célula que tiene la capacidad de producir un anticuerpo y una línea de células de mieloma y desarrollarse en el medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (es decir, medio HAT). Como resultado, se pueden obtener como hibridoma células desarrolladas durante aproximadamente 14 días después del inicio del cultivo en el medio de selección.

Posteriormente, contenga o no el sobrenadante del cultivo del hibridoma desarrollado el anticuerpo en cuestión, éste se busca. La exploración de los hibridomas se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, sin limitación particular. Por ejemplo, el sobrenadante del cultivo en el pocillo que contiene los hibridomas desarrollados se muestrea parcialmente y después se somete a inmunoensayo con enzimas (EIA) o ELISA o a radioinmunoensayo (RIA). Las células fusionadas se clonan utilizando el método de dilución limitadora o similar, y las células productoras de anticuerpos monoclonales, es decir los hibridomas, se establecen al final. El hibridoma de la presente invención es estable durante el cultivo en un medio básico, tal como RPMI-1640 o DMEM, tal como se describe a continuación, y el hibridoma puede producir y secretar un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con la proteína CXCL1 derivada del cáncer urotelial.

(4) Recuperación del anticuerpo

El anticuerpo monoclonal se puede recuperar por medio de técnicas convencionales. Específicamente, se puede recoger un anticuerpo monoclonal del hibridoma establecido por medio de técnicas de cultivo celular convencionales, desarrollo de ascitos o similares. Según la técnica de cultivo celular, el hibridoma se cultiva en un medio de cultivo celular animal, tal como un medio RPMI-1640 que contiene un 10% de suero bovino fetal, un medio MEM o un medio exento de suero, en condiciones de cultivo comunes (por ejemplo, 37°C, 5% de CO₂) durante 2 a 10 días, y se obtiene el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo. En el caso de desarrollo de ascitos, se administran de forma intraperitoneal aproximadamente 10 millones de células de hibridoma derivadas de mieloma a un animal de la misma especie que el mamífero del que deriva la célula de mieloma, para permitir que las células de hibridoma crezcan en gran cantidad. Después de una a dos semanas, se recogen los ascitos o el suero sanguíneo de dicho animal.

Cuando se necesita la purificación de un anticuerpo en el método descrito anteriormente para recoger el anticuerpo, se pueden seleccionar o combinar apropiadamente técnicas convencionales, tal como la adición de sales mediante sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en gel, para obtener el anticuerpo monoclonal purificado de la presente invención.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención incluye un anticuerpo quimérico tal como un anticuerpo monoclonal humanizado de ratón. La presente invención proporciona asimismo fragmentos de unión al antígeno del anticuerpo mencionado anteriormente. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno que se pueden producir mediante técnicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos Fab y F(ab')₂. La presente invención proporciona asimismo fragmentos de anticuerpos y derivados de los mismos que se pueden producir por ingeniería genética. El anticuerpo de la presente invención se puede utilizar *in vitro* e *in vivo* para el ensayo que pretende detectar la presencia del polipéptido de la presente invención o de un fragmento de (poli) péptido del mismo. El anticuerpo de la presente invención se puede emplear para purificar una proteína o un fragmento de la misma mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Preparación del anticuerpo policlonal

Cuando se preparan anticuerpos policlonales, se inmuniza un animal de la misma forma que la descrita anteriormente, el título del anticuerpo se mide 6 a 60 días después de la inmunización final por inmunoensayo con enzimas (EIA o ELISA) o radioinmunoensayo (RIA) y se extrae sangre el día en el que se mide el título máximo de anticuerpos para obtener el antisuero. A continuación, la reactividad de los anticuerpos policlonales del antisuero se somete a ensayo por ELISA o similar.

Método de detección

En la presente invención se emplea preferentemente un método de ensayo que implica el uso del anticuerpo de la presente invención, es decir un inmunoensayo, o un método para medir el nivel de expresión del gen que codifica la proteína CXCL1.

Ejemplos de técnicas de ensayo inmunológico incluyen el inmunoensayo con enzimas (ELISA o EIA), inmunoensayo de fluorescencia, radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo luminiscente, inmunonefelometría, ensayo de aglutinación con látex, turbidimetría látex, hemaglutinación, aglutinación de partículas y Western blotting.

Ejemplos de métodos para someter a ensayo los niveles de expresión de los ácidos nucleicos derivados de los genes incluyen RT-PCR cuantitativa, análisis de arreglos de ADN, Northern blotting, hibridación Northern, Southern blotting e hibridación Southern.

Las muestras que han de analizarse en el método para detectar una proteína de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que dichas muestras sean muestras biológicas que pueden contener la proteína CXCL1 derivada del cáncer urotelial o ácidos nucleicos derivados del gen que codifica la proteína. En particular, los valores determinados de la proteína CXCL1 obtenida de muestras de fluidos corporales, como orina, sangre, plasma sanguíneo o suero sanguíneo, son útiles como indicadores para el cáncer urotelial. El método para detectar el cáncer urotelial de la presente invención es capaz de detectar el cáncer urotelial no sólo en tejido canceroso, sino también en sangre u orina. En consecuencia, este método es muy útil como método de detección simple.

Cuando el método para detectar una proteína de la presente invención se lleva a cabo mediante una técnica de inmunoensayo utilizando una etiqueta, tal como inmunoensayo con enzimas, inmunoensayo de fluorescencia, radioinmunoensayo o inmunoensayo luminiscente, el anticuerpo de la presente invención puede ser inmovilizado, o un componente en la muestra se puede inmovilizar para someter dicha sustancia a una reacción inmunológica.

Ejemplos de soportes de fase sólida que se pueden utilizar incluyen soportes insolubles en forma de microesferas, microplacas, tubos de prueba, varillas, o espécimen (tiras de prueba) que comprenden un material de poliestireno, policarbonato, poliviniltolueno, polipropileno, polietileno, cloruro de polivinilo, nylon, polimetacrilato, látex, gelatina, agarosa, celulosa, sefarosa, vidrio, metal, cerámica o materiales magnéticos.

Las muestras se pueden inmovilizar en el soporte de acuerdo con técnicas convencionales mediante la unión del anticuerpo de la presente invención o de un componente de muestra al soporte de fase sólida por adsorción física, unión química o una combinación de los mismos.

5 La presente invención pretende detectar fácilmente la reacción entre el anticuerpo de la presente invención y la proteína CXCL1 derivada de la célula de cáncer urotelial en la muestra. Con este fin, el anticuerpo de la presente invención es etiquetado para detectar directamente la reacción en cuestión. Como alternativa, se utiliza un anticuerpo secundario etiquetado para detectar indirectamente la reacción. En el método de detección de acuerdo con la presente invención, esta última técnica de detección indirecta (por ejemplo técnica sandwich) se emplea preferentemente desde el punto de vista de la sensibilidad.

Ejemplos de sustancias de etiquetado que se pueden utilizar para el inmunoensayo con enzimas incluyen peroxidasa (POD), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, ureasa, catalasa, glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, amilasa y un complejo avidina-biotina. Ejemplos de sustancias de etiquetado que se pueden emplear para el inmunoensayo de fluorescencia incluyen isotiocianato de fluoresceína, isotiocianato de tetrametilrodamina, isotiocianato de rodamina sustituido, isotiocianato de diclorotriazina, Alexa y AlexaFluoro. Ejemplos de sustancias de etiquetado que se pueden utilizar para el radioinmunoensayo incluyen tritio, yodo 125 y yodo 131. Ejemplos de sustancias de etiquetado que se pueden emplear para el inmunoensayo luminiscente incluyen un sistema NACH-, FMNH₂-, luciferasa, sistema luminol-peróxido de hidrógeno-POD, sistema de éster de acridinio o un sistema de compuestos de dioxetano.

20 Al anticuerpo se puede unir una etiqueta en el caso del inmunoensayo con enzimas, por ejemplo mediante el método del glutaraldehído, método de maleimida, método de piridil disulfuro o el método de ácido periódico. El radioinmunoensayo se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas convencionales, tal como el método de cloramina-T y el método de Bolton-Hunter. Dichas técnicas de ensayo se pueden llevar a cabo de acuerdo con las técnicas convencionales (Current protocols in Protein Sciences, 1995, John Wiley & Sons Inc., Current protocols in Immunology, 2001, John Wiley & Sons Inc.). Cuando el anticuerpo de la presente invención se etiqueta directamente, por ejemplo, se inmoviliza un componente en la muestra y se pone en contacto con el anticuerpo etiquetado de la presente invención para formar un complejo de la proteína CXCL1 y el anticuerpo de la presente invención. El anticuerpo etiquetado no unido se separa mediante lavado y la cantidad de proteína CXCL1 en la muestra se puede determinar sobre la base de la cantidad de anticuerpo etiquetado unido o de anticuerpo etiquetado no unido.

30 Cuando se utiliza el anticuerpo secundario etiquetado, por ejemplo, se deja que el anticuerpo de la presente invención reaccione con la muestra (reacción primaria) y luego con el anticuerpo secundario etiquetado (reacción secundaria). La reacción primaria y la reacción secundaria se pueden llevar a cabo en orden inverso, concurrente o separadamente. Las reacciones primaria y secundaria resultan en la formación de un complejo de proteína CXCL1 inmovilizada/anticuerpo de la invención/anticuerpo secundario etiquetado o un complejo de anticuerpo inmovilizado de la invención/proteína CXCL1/anticuerpo secundario etiquetado. El anticuerpo secundario etiquetado no unido se separa por lavado y la cantidad de proteína CXCL1 en la muestra se puede determinar en base a la cantidad de anticuerpo secundario etiquetado unido o de anticuerpo secundario etiquetado no unido.

40 En el inmunoensayo con enzimas, específicamente, se deja reaccionar la etiqueta enzimática con un sustrato en condiciones óptimas y la cantidad de producto de reacción se somete a ensayo mediante un método óptico o similar. En el inmunoensayo de fluorescencia, se somete a ensayo la intensidad fluorescente procedente de una etiqueta fluorescente. En el radioinmunoensayo, se somete a ensayo la radioactividad procedente de la etiqueta radioactiva. En el inmunoensayo luminiscente, se somete a ensayo el nivel luminiscente derivado de una reacción luminiscente.

50 En el método de la presente invención, la generación de agregados de complejos inmunes en la inmunonefelometría, ensayo de aglutinación de látex, turbidimetría látex, hemaglutinación, aglutinación de partículas o similar, se somete a ensayo midiendo ópticamente el haz transmitido o el haz difuso. Cuando se somete a ensayo visualmente, se puede utilizar un disolvente, tal como un fosfato, glicina, Tris o tampón de Good. Además, se puede añadir al sistema de reacción un acelerador de reacción tal como polietilenglicol o un inhibidor de reacción no específica.

55 A continuación se describe una realización preferente del método de detección de acuerdo con la presente invención.

En primer lugar, el anticuerpo de la presente invención se inmoviliza en un soporte insoluble como anticuerpo primario. Preferentemente, la superficie del soporte de fase sólida en el que el antígeno no es adsorbido se bloquea con una proteína que no está relacionada con el antígeno (por ejemplo suero de ternera fetal, seroalbúmina bovina o gelatina). Posteriormente, el anticuerpo primario inmovilizado se deja reaccionar con la muestra de analitos. Entonces se deja reaccionar la muestra con el anticuerpo secundario etiquetado que reacciona con la proteína CXCL1 en un sitio distinto del sitio de la reacción con el anticuerpo primario para detectar una señal procedente de la etiqueta. El "anticuerpo secundario que reacciona con la proteína CXCL1 en un sitio distinto del sitio de la reacción con el anticuerpo primario" utilizado aquí no está particularmente limitado, siempre que dicho anticuerpo reconozca un sitio diferente del sitio en el que el anticuerpo primario se une a la proteína CXCL1. Dicho anticuerpo puede ser policlonal, antisuero, o un anticuerpo monoclonal sin tener en cuenta el tipo de inmunógeno. Se puede utilizar también un fragmento de dicho anticuerpo, tal como Fab, F(ab')₂, Fab, Fv o ScFv. Además, se puede utilizar una pluralidad de tipos de anticuerpos monoclonales como anticuerpos secundarios.

Por otra parte, el anticuerpo de la presente invención se puede etiquetar para preparar un anticuerpo secundario. En un sitio diferente del sitio del anticuerpo de la presente invención, un anticuerpo que reacciona con la proteína CXCL1 se puede inmovilizar en un soporte insoluble como anticuerpo primario, y el anticuerpo primario inmovilizado se puede poner en contacto con la muestra de analitos. El resultante se puede poner entonces en contacto con el anticuerpo de la presente invención que ha sido etiquetado como anticuerpo secundario para detectar una señal procedente de la etiqueta mencionada anteriormente.

Tal como se describe anteriormente, el anticuerpo de la presente invención puede reaccionar específicamente con la proteína CXCL1 derivada de la célula de cáncer urotelial. Así, el anticuerpo de la presente invención se puede emplear como agente de diagnóstico de cáncer. El agente de diagnóstico de la presente invención comprende el anticuerpo de la presente invención. En consecuencia, el agente de diagnóstico de la presente invención se puede utilizar para detectar la proteína CXCL1 derivada de una célula de cáncer urotelial contenida en la muestra obtenida de un sujeto del que se sospecha padece cáncer urotelial. Así, se puede determinar si el sujeto sufre o no de cáncer urotelial.

El agente de diagnóstico de la presente invención se puede emplear para cualquier medio, siempre que dicho medio sea para un ensayo inmunológico. La utilización del agente de diagnóstico de la presente invención en combinación con un medio simple, tal como una tira de prueba para inmunocromatografía, conocida en la técnica, permite el diagnóstico del cáncer de una forma más sencilla y rápida. Una tira de prueba para la inmunocromatografía se compone, por ejemplo, de una parte receptora de la muestra que comprende un material que absorbe fácilmente la muestra, una parte reactiva que comprende el agente de diagnóstico de la presente invención, una parte de desarrollo hacia la que el producto de reacción de la muestra y el agente de diagnóstico migran, una parte etiquetada en la que el producto de reacción desarrollado se colorea, una parte de presentación hacia la que el producto de reacción coloreado se desarrolla. Dicha tira de prueba puede tener una forma similar a la de una prueba del embarazo. En primer lugar, se aplica la muestra a la parte receptora de muestra, y la parte receptora de muestra entonces absorbe y entrega la muestra a la parte reactiva. Posteriormente, la reacción tiene lugar entre la proteína CXCL1 derivada de la célula de cáncer urotelial en la muestra y el anticuerpo de la presente invención en la parte reactiva, el compuesto resultante migra sobre la parte de desarrollo hacia la parte con etiqueta. La reacción entre el compuesto resultante y el anticuerpo secundario etiquetado tiene lugar en la parte con etiqueta, el producto de reacción con el anticuerpo secundario etiquetado se desarrolla hacia la parte de presentación y entonces se reconoce el color. La tira de prueba mencionada anteriormente para la inmunocromatografía no produciría al usuario ningún dolor o riesgo que resulte del uso del reactivo. En consecuencia, dicha tira de prueba se puede utilizar para el control domiciliario y los resultados de la misma se pueden someter a un examen minucioso, y el sujeto del control se puede someter a tratamiento (por ejemplo extirpación quirúrgica) en una institución médica relevante, lo que puede conducir a la prevención de metástasis y/o a la recurrencia. Actualmente, dichas tiras de prueba se pueden producir masivamente de forma rentable por medio del método descrito, por ejemplo, en la Publicación de Patente Japonesa (kokai) N° 10.54830 (1998) (A). Asimismo, el uso del agente de diagnóstico de la presente invención en combinación con un agente de diagnóstico para un marcador tumoral existente de cáncer urotelial permite un diagnóstico más fiable.

En consecuencia, la presente invención se refiere al uso de un kit para diagnosticar el cáncer urotelial, el cual comprende un anticuerpo que reacciona específicamente con la proteína CXCL1 o con un fragmento de la misma o un fragmento de dicho anticuerpo. El anticuerpo incluido en el kit de la presente invención se puede unir a un soporte de fase sólida tal como se ha descrito anteriormente. Además, el kit de la presente invención puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo secundario etiquetado, un soporte, un tampón de lavado, un diluyente de muestra, un sustrato enzimático, un terminador de reacción y la proteína CXCL1 como sustancia purificada de etiquetado.

A continuación, se describe de forma más detallada la presente invención con referencia a los ejemplos, aunque el alcance técnico de la presente invención no se limita a los mismos.

50 Ejemplos

1. *Análisis de proteomas del sobrenadante de cultivo de células uroteliales normales*

Se obtuvieron células uroteliales normales de los conductos urinarios normales de pacientes con nefrectomía. Las células uroteliales extraídas de los conductos urinarios normales se cultivaron en medio KSFM Definido en placas de cultivo de 10 cm (Scriven, S.D. y col., 1997, Journal of Urology, vol. 158, pp. 1147-1152). Cuando las células uroteliales que habían sido cultivadas en cuatro placas de cultivo de 10 cm alcanzaron una confluencia del 90%, se lavaron las células tres veces con PBS(-), se cambió el medio por medio RPMI 1640 exento de suero, se realizó el cultivo durante 24 horas, y se recogió el sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo resultante se sometió a ultracentrifugación a 150.000 g y 4°C durante 30 minutos para eliminar el sedimento, se concentró el sobrenadante de centrifugación por centrifugación a 4.000 g y 4°C durante 20 minutos utilizando un Amicon Ultra-15 (Millipore). Como consecuencia, se extrajo 1 mg de proteína de 40 ml del sobrenadante de cultivo.

Las proteínas extraídas (200 µg) se dividieron en 26 fracciones mediante cromatografía en fase inversa utilizando un ProteomeLab™ PF2D System (Beckman Coulter), se digirieron con tripsina y se sometieron después a identificación exhaustiva de proteínas con un Q-TOF Ultima (Micromass). Como resultado, se identificaron aproximadamente 600 proteínas, de las cuales se supone que aproximadamente 20 tenían actividad de factor de crecimiento.

2. Análisis de los genes expresados

Se cultivaron células cancerosas establecidas de la vejiga (RT112, 5637, T24, y EJ) en medio RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10% y las células uroteliales normales en KSFM Definido. A partir de estas células se prepararon ARN totales utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y el kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con los protocolos recomendados; los ADNc se sintetizaron a partir de 3 μ g de ARN total por medio del kit de síntesis de ADNc de Primera Hebra (Amersham Biosciences). Los ADNc se utilizaron como plantillas, se diseñaron cebadores para un factor de crecimiento descubierto como resultado del análisis de proteomas, es decir CXCL1, y un receptor de la misma, es decir CXCR2, se analizó la expresión genética por RT-PCR, y la presencia o ausencia de la expresión se confirmó por electroforesis en gel de agarosa utilizando el peso molecular como indicación (Fig. 1). Se utilizó el Marcador de ADN Hi-Lo (BIONEXUS) como marcador de peso molecular.

El nivel de expresión del ARNm de CXCL1 era alto en las líneas celulares 5637 y T24 derivadas de cáncer infiltrante de vejiga. Aunque se observó la expresión en células normales, se descubrió que el grado de expresión era más bajo que el nivel de expresión en las líneas celulares derivadas de cáncer infiltrante.

3. Determinación de la concentración de CXCL1 en sobrenadante de cultivo

Se cultivaron líneas celulares cancerosas establecidas de la vejiga (5637 y T24) en medio RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal al 10% y las células uroteliales normales en KSFM Definido. Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos durante 24 horas y se cambió el medio de cultivo cuando se alcanzó sustancialmente la confluencia en el cultivo. Se recuperó el sobrenadante de cultivo 24 horas después. La concentración de la proteína CXCL1 en el sobrenadante de cultivo se determinó utilizando el kit de ELISA Human GRO alpha/CXCL1 Quantikine (R&D Systems). Como resultado, no se detectó CXCL1 en el sobrenadante de cultivo de células uroteliales normales, mientras que se detectó la CXCL1 en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares 5637 y T24 derivadas del cáncer infiltrante, a una concentración alta, por encima de aproximadamente 5-20 ng/ml (Fig. 2).

4. Determinación de la concentración de CXCL1 en la orina de un paciente con cáncer de vejiga

Se obtuvieron muestras de orina de 3 pacientes con cáncer infiltrante de vejiga y de un 1 voluntario sano y se determinó la concentración de proteína CXCL1 en la orina por medio del kit de ELISA Human GRO alpha/CXCL1 Quantikine (R&D Systems). La concentración de proteína CXCL1 se corrigió utilizando la concentración de creatinina en la orina en las muestras, y se descubrió que la concentración de proteína CXCL1 en la orina era más alta en pacientes con cáncer de vejiga que en el voluntario sano (Fig. 3).

5. Determinación de la concentración de CXCL1 en la orina de un paciente con cáncer de vejiga de acuerdo con el grado de progresión

Se obtuvieron muestras de orina de 32 pacientes con cáncer de vejiga en fase temprana (Ta), 35 pacientes con cáncer de vejiga progresivo (T1 o avanzado) y 40 voluntarios sanos, y se determinaron las concentraciones de proteína CXCL1 en las muestras de orina utilizando el kit de ELISA Human GRO alpha/CXCL1 Quantikine (R&D Systems). Se descubrió que los niveles de concentración de proteína CXCL1 en la orina eran más altos en los pacientes con cáncer de vejiga en fase temprana y progresivo que los voluntarios sanos (Fig. 4).

6. Ensayo de la expresión de CXCL1 en tejido urotelial normal y en tejido con cáncer de vejiga

Tejido urotelial normal y tejido con cáncer urotelial se inmovilizaron individualmente con formalina neutra al 10% y luego se incrustaron en parafina. El bloque de parafina se cortó en trozos de 5 μ m de espesor sometidos a desparafinación y humectación, y después se inmovilizaron en placas de vidrio. La actividad peroxidasa endógena fue inhibida por peróxido de hidrógeno. Se lavaron las placas de vidrio con PBS y después se trataron con PBS que contenía suero de conejo al 1% durante 30 minutos. El anticuerpo anti-CXCL1 (Gro α (C-15):SC1374, Santa Cruz Biotechnology) se diluyó a 1:150 para preparar un anticuerpo primario y luego se dejó reposar a 4°C durante toda la noche. Además, se utilizó Histofine® Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences Inc., Japón) para desarrollar el color con la ayuda de diaminobenzidina. Además, se tiñeron ligeramente los trozos con hematoxilina. Cuando el 10% o más del citoplasma de las células tumorales se encontró teñido, se determinó que las células eran células CXCL1-positivas.

Las células uroteliales normales no se tiñeron y no se observó expresión de CXCL1 en las mismas. En el tejido con cáncer de vejiga progresivo (pT2G3) y en el foco metastático del ganglio linfático se observó una fuerte tinción, lo que indica una fuerte expresión de CXCL1 (Fig. 5).

Por tanto, de acuerdo con la presente invención, la expresión o el nivel de expresión del gen de CXCL1 en tejido o células uroteliales se puede determinar y comparar con los controles mediante la utilización del anticuerpo o de la sonda de ácido nucleico mencionados anteriormente. Así, un cáncer urotelial, tal como un cáncer de vejiga en fase

temprana o progresivo, puede ser detectado eficazmente mediante la detección de la expresión del gen de interés o mediante la utilización del incremento del nivel de expresión del gen como indicador.

Aplicación industrial

5

La presente invención realiza la detección eficaz de un posible cáncer urotelial de una forma sencilla y rentable, lo que permite la detección temprana, el diagnóstico y el tratamiento de un cáncer urotelial. Como el cáncer urotelial se puede detectar de una forma no invasiva por medio del método de la presente invención utilizando las orinas de pacientes, el método proporciona un método sencillo y rápido de detección.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para detectar un cáncer urotelial que comprende la medición de la proteína CXCL1 o la expresión de un gen que codifica la proteína, *in vitro*, en una muestra biológica procedente de un sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se mide la cantidad de proteína o el nivel de expresión del gen.
- 10 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque se utiliza como indicador el incremento significativo de la cantidad de proteína o del nivel de expresión del gen con respecto al de una muestra de control.
4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el incremento es de al menos 2 veces.
- 15 5. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el incremento es de al menos 3 veces.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la medición se lleva a cabo por medio de un método inmunológico.
- 20 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la medición se lleva a cabo por hibridación.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la medición se lleva a cabo mediante el uso de una sustancia capaz de unirse a la proteína o al gen.
- 25 9. Método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la sustancia capaz de unirse a la proteína es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
10. Método según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la sustancia capaz de unirse al gen es una sonda de ácido nucleico.
- 30 11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la sonda de ácido nucleico comprende un ácido nucleico que se compone de la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo, un ácido nucleico que se compone de una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico, o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos continuos del mismo.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque se etiqueta el anticuerpo o la sonda de ácido nucleico.
- 40 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9 y 12, **caracterizado** porque la proteína se mide inmunológicamente en una muestra utilizando un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína o a un fragmento de la misma, detectando así un cáncer urotelial, utilizando como indicador un incremento de la cantidad de proteína con respecto a la de una muestra de control.
- 45 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7, 8 y 10 a 12, **caracterizado** porque el nivel de expresión del gen se mide en la muestra por medio de una sonda, que es un ácido nucleico consistente en la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo, un ácido nucleico que se compone de una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico, o un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos continuos del mismo, detectando así un cáncer urotelial utilizando como indicador el incremento del nivel de expresión del gen con respecto al de una muestra de control.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado** porque el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer urotelial, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer de tracto urinario.
- 55 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque la muestra es sangre, plasma, suero u orina.
- 60 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado** porque la muestra es un tejido o una célula urotelial.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8, 9, 12, 13 y 15 a 17, **caracterizado** porque la proteína tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:2 o un mutante de la misma.
- 65 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7, 8, 10 a 12 y 14 a 17, **caracterizado** porque el gen tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo.

ES 2 343 276 T3

20. Utilización de un kit que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína CXCL1 o a un fragmento de la misma, o un derivado químicamente modificado del anticuerpo o fragmento del mismo, para diagnosticar un cáncer urotelial.

5 21. Utilización del kit según la reivindicación 20, **caracterizada** porque la proteína tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO:2 o un mutante de la misma.

10 22. Utilización del kit según la reivindicación 20 ó 21, **caracterizada** porque el fragmento de proteína comprende un epítipo que tiene al menos 8 aminoácidos.

23. Utilización del kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, **caracterizada** porque el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer del tracto urinario.

15 24. Utilización del kit según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, **caracterizada** porque el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un soporte de fase sólida.

20 25. Utilización del kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, que comprende además un anticuerpo secundario etiquetado capaz de unirse al anticuerpo o un fragmento del mismo.

26. Utilización del kit según la reivindicación 25, **caracterizada** porque la etiqueta del anticuerpo secundario es una etiqueta enzimática, fluorescente o radioactiva.

25 27. Utilización de un kit que comprende un ácido nucleico consistente en la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo, un ácido nucleico consistente en una secuencia complementaria del mismo, un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones astringentes al ácido nucleico, un fragmento que comprende 15 o más nucleótidos continuos del mismo, o un derivado químicamente modificado de uno cualquiera de los mismos, para diagnosticar un cáncer urotelial.

30 28. Utilización del kit según la reivindicación 27, **caracterizada** porque el ácido nucleico tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO:1 o un mutante del mismo.

35 29. Utilización del kit según la reivindicación 27 ó 28, **caracterizada** porque el cáncer urotelial se selecciona de entre el grupo consistente en cáncer de vejiga, cáncer de pelvis renal, cáncer de uréter y cáncer del tracto urinario.

30. Utilización del kit según una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, **caracterizada** porque el ácido nucleico se une a un soporte de fase sólida.

40 31. Utilización del kit según la reivindicación 30, **caracterizada** porque el soporte de fase sólida es un chip de ADN o un sustrato de microarrays.

45

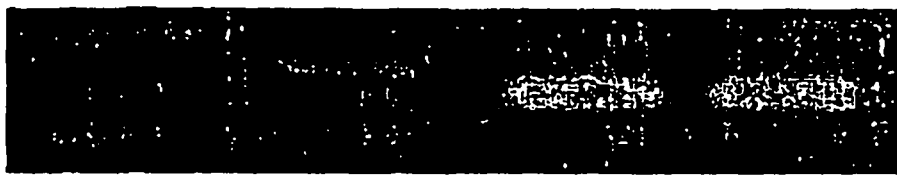
50

55

60

65

Fig. 1



Marcador

**Célula
benigna**

**Célula #5637
derivada de
cáncer de
vejiga**

**Célula #T24
derivada de
cáncer de
vejiga**

Fig. 2

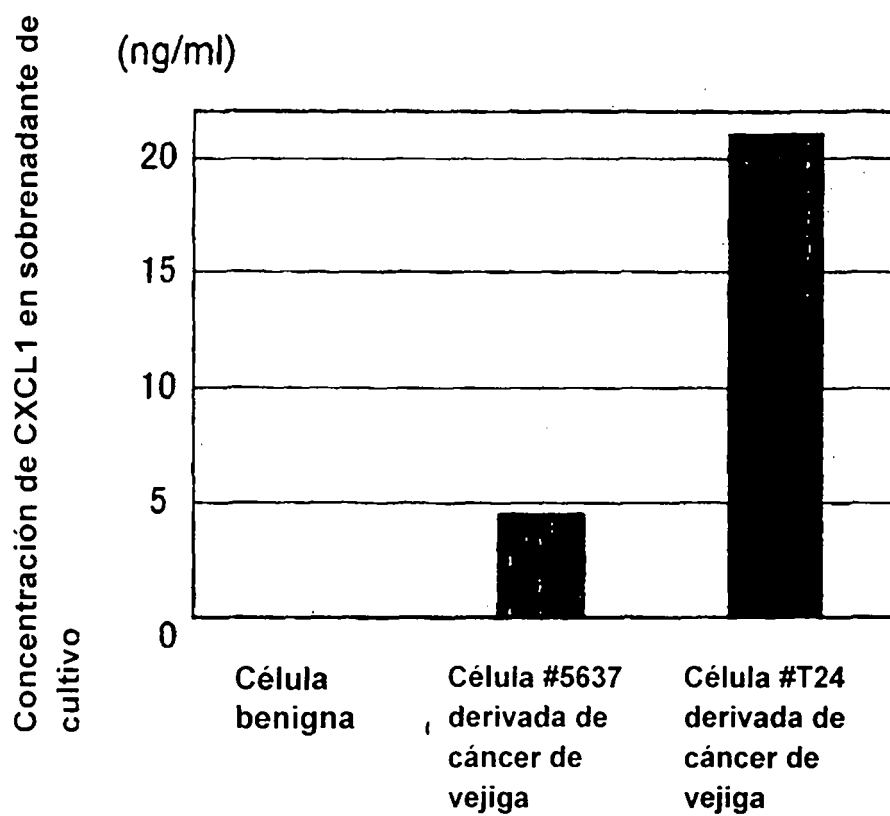


Fig. 3

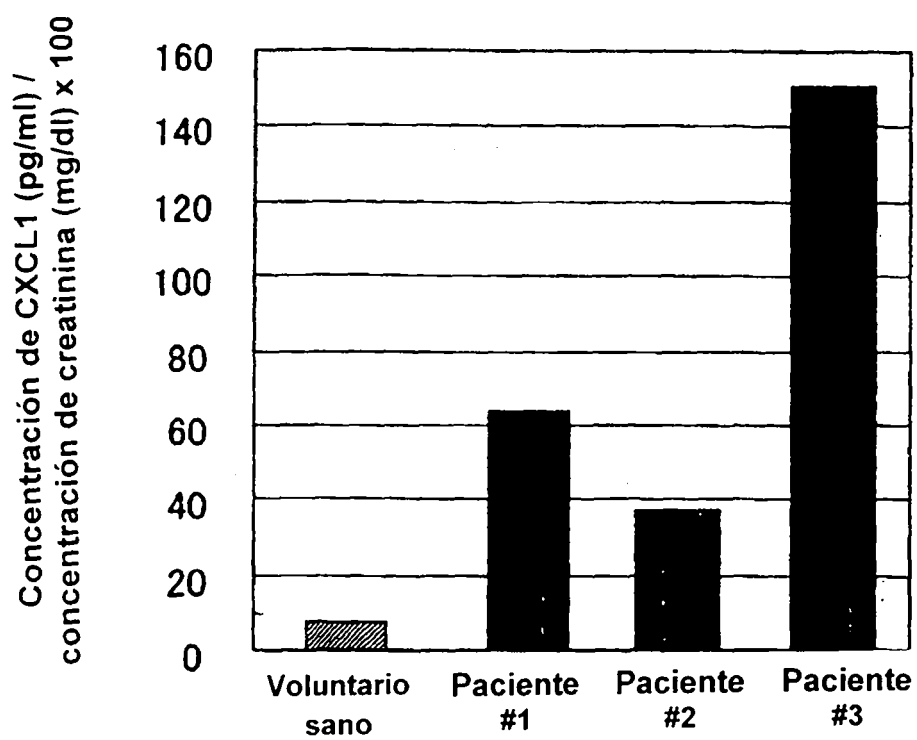


Fig. 4

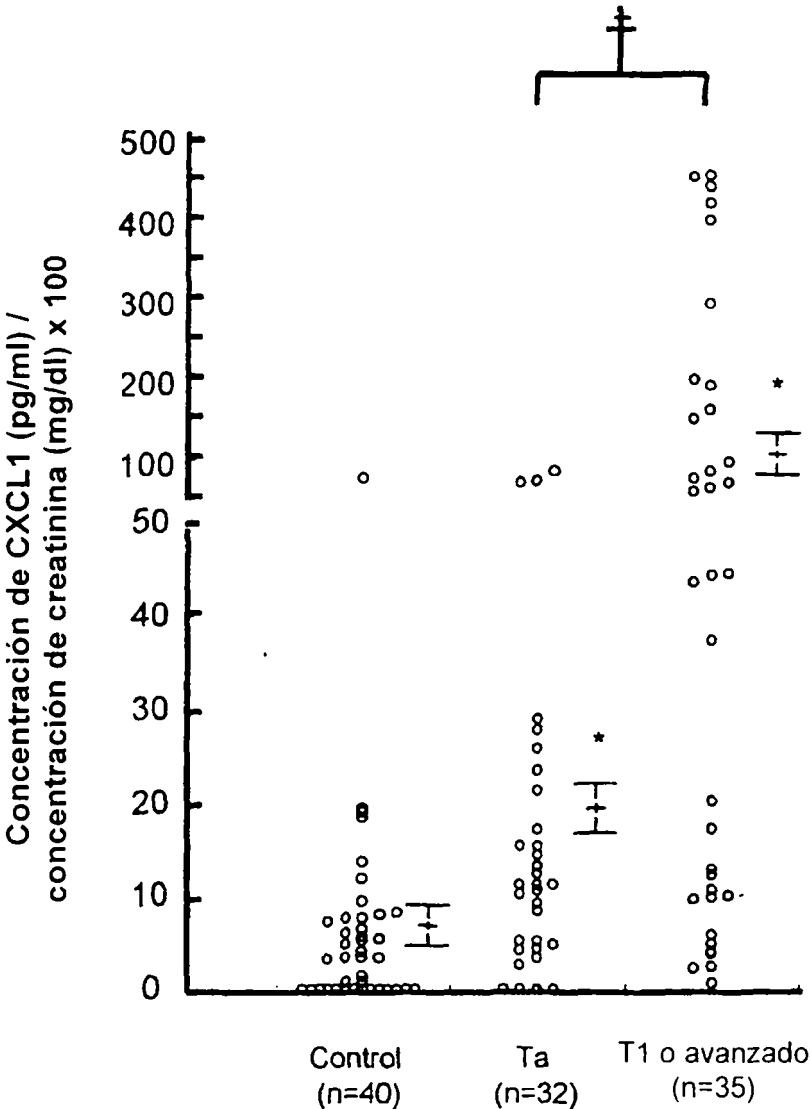
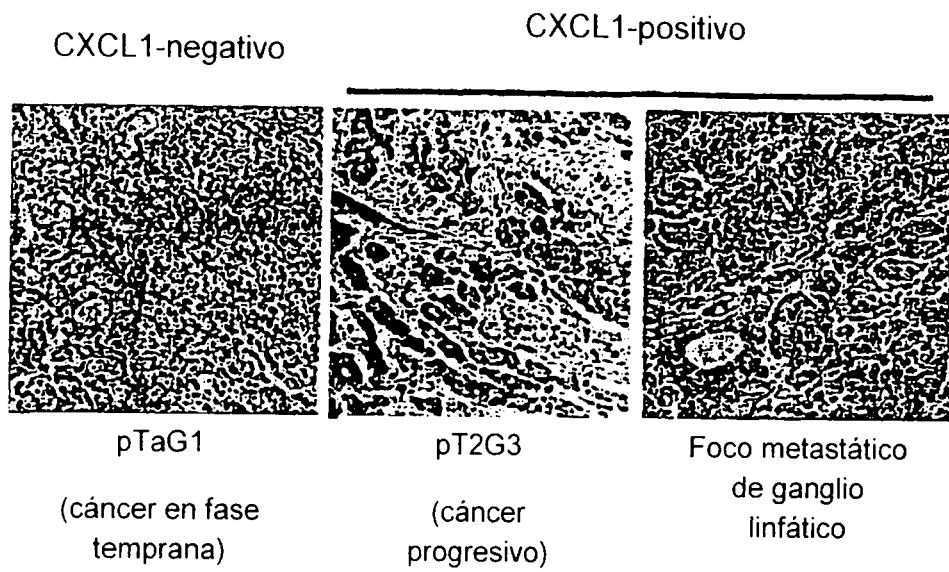


Fig. 5



ES 2 343 276 T3

LISTA DE SECUENCIAS

| | | |
|----|--|-------------|
| | <110> TORAY Industries, Inc Kyoto University | |
| 5 | <120> Kit y método para el diagnóstico de cáncer urotelial | |
| | <130> PH-2869-PCT | |
| | <140> PCT/JP2006/317379 | |
| | <141> 01-09-2006 | |
| 10 | <150> JP 2005-255370 | |
| | <151> 02-09-2005 | |
| | <160> 2 | |
| | <170> Patente versión 3.1 | |
| 15 | <210> 1 | |
| | <211> 1103 | |
| | <212> ADN | |
| 20 | <213> <i>Homo sapiens</i> | |
| | <400> 1 | |
| 25 | cacagagccc gggccgcagg cacctcctcg ccagctcttc cgctcctctc acagccgcca | 60 |
| | gacccgcctg ctgagcccca tggcccgcgc tgctctctcc gccgcccaca gcaatccccg | 120 |
| 30 | gctcctgcga gtggcactgc tgctcctgct cctggtagcc gctggccggc gcgcagcagg | 180 |
| | agcgtccgig gccactgaac tgcgctgccca gtgcttgacag acctgcagg gaattcacc | 240 |
| 35 | caagaacatc caaagtgtga acgtgaagtc ccccgacc cactgcgccc aaaccgaagt | 300 |
| | catagccaca ctcaagaatg ggcggaaagc ttgcctcaat cctgcatccc ccatagttaa | 360 |
| 40 | gaaaatcatc gaaaagatgc tgaacagtga caaatccaac tgaccagaag ggaggaggaa | 420 |
| | gctcactggt ggctgttctt gaaggaggcc ctgcccttat aggaacagaa gaggaaagag | 480 |
| 45 | agacacagct gcagaggcca cctggattgt gcctaattgt tttgagcatc gcttaggaga | 540 |
| | agtcttctat ttattttatt attcattagt tttgaagatt ctatgttaat attttaggtg | 600 |
| 50 | taaaataatt aagggtatga ttaactctac ctgcacactg tctattata ttcattcttt | 660 |
| | ttgaaatgtc aaccccaagt tagttcaate tggattcata ttaatttga aggtagaatg | 720 |
| | ttttcaaatg ttctccagtc attatgttaa tatttctgag gagcctgcaa catgccagcc | 780 |
| 55 | actgtgatag aggctggcgg atccaagcaa atggccaatg agatcattgt gaaggcaggg | 840 |
| | gaatgtatgt gcacatctgt tttgtaactg tttagatgaa tgtcagttgt tattttatga | 900 |
| | aatgatttca cagtgtgtgg tcaacatttc tcatgttgaa actttaagaa ctaaaatggt | 960 |
| 60 | ctaaatatcc ctggacatt ttatgtcttt cttgtaaggc atactgcctt gtttaatggt | 1020 |
| | agttttacag tgtttctggc ttagaacaaa ggggcttaat tattgatggt ttcatagaga | 1080 |
| 65 | atataaaaat aaagcactta tag | 1103 |

ES 2 343 276 T3

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10 **Met Ala Arg Ala Ala Leu Ser Ala Ala Pro Ser Asn Pro Arg Leu Leu**
 1 5 10 15

15
 Arg Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala Gly Arg Arg Ala
 20 20 25 30

25 **Ala Gly Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Leu Gln Thr**
 35 40 45

30 **Leu Gln Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys Ser**
 50 55 60

35
 Pro Gly Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn
 40 65 70 75 80

45 **Gly Arg Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile**
 85 90 95

50 **Ile Glu Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn**
 100 105

55

60

65