

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 345**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/US2013/062043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14052672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13841542 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2900265**

54 Título: **Sistemas y procedimientos de anticuerpos antiuroplaquina II**

30 Prioridad:

**27.09.2012 US 201261706312 P**

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

**20.09.2018**

73 Titular/es:

**BIOCARE MEDICAL, LLC (100.0%)  
60 Berry Dr.  
Pacheco, CA 94553, US**

72 Inventor/es:

**QI, WEIMIN y  
TACHA, DAVID**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 682 345 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

Sistemas y procedimientos de anticuerpos antiuroplaquina II

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos antiuroplaquina II, composiciones y cócteles que comprenden los anticuerpos y procedimientos para utilizar los anticuerpos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El examen microscópico de muestras de tejido, particularmente las obtenidas por biopsia, es un procedimiento común para el diagnóstico de las enfermedades. En particular, la inmunohistoquímica (IHC), una técnica en la que se utilizan anticuerpos específicos para detectar la expresión de proteínas específicas en la muestra de tejido es una herramienta valiosa para el diagnóstico, particularmente para la detección y el diagnóstico de cáncer.

Las uroplaquinas ("UP" o "Ups") comprenden un grupo de 4 proteínas transmembrana (UP Ia, Ib, II y III) expresadas en la superficie luminal de células superficiales uroteliales normales (paraguas), que son productos de diferenciación específicos de las células uroteliales. La uroplaquina II ("UP II") puede ser un componente de proteína de 15 kDa de las placas uroteliales que puede mejorar la barrera de permeabilidad del urotelio. La expresión de UP II puede ser aberrante en el carcinoma de células de transición de la vejiga urinaria ("CCT") de la vejiga y, de este modo, puede hacer que sea un marcador útil para el diagnóstico de cáncer. La referencia de Wu y otros incluye la discusión del ARNm de UP II como un marcador de diagnóstico prometedor para el cáncer de vejiga y posiblemente incluso para la micrometástasis del cáncer de vejiga en los ganglios linfáticos pélvicos (véase el artículo, "Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20." Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M. J Urol. Diciembre de 2005; 174 (6): 2138-42.) El ARNm de UP II se detectó en 19 de 19 (100%) y 15 de 16 (93,8%) muestras de tejido tumoral de vejiga y muestras de ganglios linfáticos pélvicos con metástasis, respectivamente. Por otro lado, se detectó ARNm de UP II en solo 6 casos de 66 (10%) muestras de ganglios linfáticos pélvicos sin metástasis. Por lo tanto, la expresión positiva del ARNm de UP II puede indicar metástasis ganglionares del cáncer de vejiga. Puede ser importante determinar las metástasis ganglionares en pacientes con cáncer de vejiga después de una cistectomía radical, dado que esta subpoblación de pacientes puede necesitar urgentemente quimioterapia posoperatoria para sobrevivir. Los autores concluyen que la detección del ARNm de UP II puede mejorar el desenlace clínico después de una cistectomía radical, proporcionando posiblemente información útil en el diagnóstico y tratamiento del CCT. Por lo tanto, es deseable para el desarrollo de un anticuerpo antiUP II para la detección de la expresión de la proteína UP II en los tejidos de pacientes, tales como con CCT.

Los estudios han demostrado que el ARNm de UP II se expresa en los tejidos de la vejiga y en la sangre periférica de los pacientes con CCT primarios y metastásicos, lo que posiblemente sugiere su posible función como biomarcador de los carcinomas uroteliales. La utilidad clínica de UP II puede haber sido reconocida a partir de estos estudios, posiblemente únicamente basándose en sus datos de ARNm. Se pueden justificar investigaciones adicionales que caractericen la localización de proteína de UP II en CCT, especialmente cuando las moléculas de proteína pueden ser más estables que las moléculas de ARNm. Un estudio utilizó un anticuerpo pan-UP que pudo haber reaccionado con todas las isoformas UP Ib, UP II e incluso UP III, posiblemente para demostrar la expresión persistente de UP en carcinomas uroteliales avanzados; sin embargo, el nivel específico de proteína UP II no pudo determinarse utilizando este anticuerpo pan-UP. (véase, Persistent Uroplakin Expression in Advanced Urothelial Carcinomas: Implications in Urothelial Tumor Progression and Clinical Outcome. Hong-Ying Huang, Shahrokh F. Shariat, Sol Tung-Tien, Herbert Lopor, Ellen Shapiro, Jer-Tsong Hsieh, Raheela Ashfaq, Yair Lotan y Xue-Ru Wu, Hum Pathol. Noviembre de 2007; 38 (11): 1703-1713). Poco se puede saber acerca de la expresión proteica de UP II en el cáncer urotelial, posiblemente debido a la ausencia de un anticuerpo anti-UP II específico. Además, se conocen anticuerpos que reaccionan fuertemente con uroplaquina III pero débilmente con uroplaquina II (véase el artículo, "Uroplakin II Gene Is Expressed in Transitional Cell Carcinoma But Not in Bilharzial Bladder Squamous Cell Carcinoma: Alternative Pathways of Bladder Epithelial Differentiation and Tumor Formation". Wu y otros, J Cancer Research 1998; 58: 1291-1297). Además, en la técnica se describen nuevos moduladores, que incluyen anticuerpos y sus derivados, y procedimientos para utilizar estos moduladores para tratar trastornos hiperproliferativos (véase el documento WO 2012/031273).

Existe una clara necesidad de un anticuerpo antiuroplaquina II sensible e incluso específico para su utilización en el diagnóstico del cáncer. Los anticuerpos anti-UP III se han desarrollado previamente como marcadores para el carcinoma de origen urotelial. En la presente memoria descriptiva, la presente invención da a conocer un anticuerpo anti-UP II [clon BC21] que puede ser altamente específico e incluso puede ser más sensible que el anticuerpo anti-UP III [clon BC17]. En casos de CCT, un ejemplo de la presente invención da a conocer un anticuerpo anti-UP II que mostró una sensibilidad aumentada (46/59, aproximadamente, el 78%, aproximadamente) en comparación con el anticuerpo anti-UP III (33/59, aproximadamente, el 56%, aproximadamente). Posiblemente además de su perfil de tinción más fuerte, el anticuerpo anti-UP II [BC21] puede mostrar un patrón de localización más amplio en comparación con el anticuerpo anti-UP III. Esto podría deberse a la sensibilidad superior del anticuerpo anti-UP II o

posiblemente incluso las dos isoformas puedan tener papeles distintos en la formación de placas uroteliales. La diferencia en su función puede no ser completamente conocida; sin embargo, los ratones que carecen del gen UP II no mostraron formación de placas uroteliales, mientras que los ratones que carecen del gen UP III aún pueden retener placas uroteliales pequeñas. Si UP II y UP III presentan funciones que no se superponen, la determinación de cualquiera de las isoformas puede no ser suficiente para un diagnóstico eficaz del CCT. Por lo tanto, puede ser necesario un anticuerpo anti-UP II para una cobertura más completa de la expresión proteica de las isoformas de UP.

El desarrollo de un anticuerpo anti-UP II puede ayudar en el diagnóstico de CCT primarios e incluso metastásicos, puede ayudar en la verificación de la expresión de ARNm de UP II, posiblemente en estudios clínicos previos, y puede incluso ayudar a distinguir una expresión proteica de UP II frente a UP III. En la presente invención, se han dado a conocer nuevos anticuerpos antiuroplaquina II, tales como el anticuerpo antiuroplaquina II [BC21] con una mayor sensibilidad a la tinción, y posiblemente incluso a la vez que conserva una especificidad de tinción igual o aún superior, en comparación con el anticuerpo antiuroplaquina III [BC17].

## DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Las realizaciones generales de la presente invención pueden incluir anticuerpos monoclonales para reconocer UP II, procedimientos para su preparación, y su utilización en inmunohistoquímica. En realizaciones, se pueden obtener clones de anticuerpo anti-UP II, tales como el clon de anticuerpo anti-UP II BC21 inmunizando ratones Balb/C con una proteína UP II humana recombinante correspondiente a los aminoácidos 26-155, obtenida por expresión de *E. coli*. Las proteínas UP II pueden inyectarse en los ratones BALB/c con un adyuvante, a través de inyecciones intraperitoneales, posiblemente 5 veces, aproximadamente, a intervalos de tres semanas, aproximadamente. La inmunorreactividad a UP II puede evaluarse mediante ELISA directo en la proteína recombinante UP II. Los ratones con el título más alto se pueden elegir para desarrollar hibridomas por fusión celular. Se puede elegir un clon de hibridoma que demuestre la mejor reactividad a UP II en tejidos humanos y se puede designar como BC21. El clon BC21 puede analizarse para determinar su isotipo y puede identificarse como IgG1/kappa de ratón. El anticuerpo BC21 puede producirse mediante cultivo de tejido a gran escala de las células de hibridoma y mediante ascitis en ratones BALB/c. El líquido ascítico y el anticuerpo ascítico se pueden recoger y el anticuerpo se puede purificar mediante una columna de afinidad de Proteína A. BC21 demostró reactividad específica a la proteína UP II humana mediante ELISA, transferencia de Western e incluso en tejidos humanos.

Los anticuerpos anti-UP II, tales como el anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón pueden ser útiles para la detección de UP II en muestras de tejido, posiblemente con varias ventajas significativas, pero inesperadas, respecto a los anticuerpos anti-UP III actualmente conocidos. Cuando se utilizan en procedimientos de inmunohistoquímica tradicionales, los anticuerpos anti-UP II, tales como el anticuerpo anti-UP II BC21 de ratón pueden dar como resultado tinción citoplásmica o de membrana de UP II con una especificidad posiblemente similar a la de los anticuerpos anti-UP III conocidos. Sin embargo, los anticuerpos anti-UP II, tales como BC21 pueden exhibir una sensibilidad aumentada, quizás en comparación con los anticuerpos anti-UP III anteriores, lo que puede ofrecer mejoras significativas. Con anticuerpos anti-UP II, tales como BC21, el análisis de la muestra puede simplificarse y la expresión de UP II en células tumorales puede ser fácilmente identificable, permitiendo el diagnóstico en casos que, de otro modo, podrían ser difíciles, o incluso imposibles, de diagnosticar.

## DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

La figura 2 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 1.

La figura 3 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 2).

La figura 4 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 3.

La figura 5 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

La figura 6 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 5.

La figura 7 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

La figura 8 muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 7.

Las figuras 9A y 9B muestran la reactividad cruzada de los anticuerpos BC21 y BC17 con la proteína uroplaquina II y

la proteína uroplaquina III mediante transferencia de Western.

La figura 10 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + UP III que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica.

5 La figura 11 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + GATA3 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

10 La figura 12 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + GATA3 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

La figura 13 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + UP III + GATA3 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II y UP III (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

15 La figura 14 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

20 La figura 15 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

25 La figura 16 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

30 La figura 17 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 18 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 y PSA (nuclear y citoplásmica, respectivamente, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

35 La figura 19 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) y PSA (citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

40 La figura 20 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe cáncer de próstata. La tinción de PSA (marrón) es citoplásmica. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) y PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

45 La figura 21 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 y PSA (nuclear y citoplásmica, respectivamente, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

50 La figura 22 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (roja) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PSA (citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 23 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe cáncer de próstata. La tinción de PSA (roja) es citoplásmica. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PAX8 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

55 La figura 24 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + NKX3.1 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de NKX3.1 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

60 La figura 25 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + NKX3.1 que tiñe cáncer de próstata. La tinción de NKX3.1 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

65 La figura 26 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) y NKX3.1 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 27 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe carcinoma de células renales. La

tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y NKX3.1 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

5 La figura 28 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe cáncer de próstata. La tinción de NKX3.1 (roja) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

10 La figura 29 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica.

La figura 30 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de p63 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

15 La figura 31 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe neoplasia intraepitelial prostática (PIN). La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

20 La figura 32 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe próstata normal. La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 33 muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de p40 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica.

25 La figura 34 muestra un ejemplo de un resumen esquemático de un kit de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención.

30 La figura 35 muestra un ejemplo de un resumen esquemático de un procedimiento de inmunoensayo de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención.

La figura 36 es una versión en color de la figura 1, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

35 La figura 37 es una versión en color de la figura 2, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 36.

La figura 38 es una versión en color de la figura 3, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 2).

40 La figura 39 es una versión en color de la figura 4, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 38.

45 La figura 40 es una versión en color de la figura 5, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

La figura 41 es una versión en color de la figura 6, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 40.

50 La figura 42 es una versión en color de la figura 7, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP II [BC21] en tejido de CCT de vejiga (grado 3).

La figura 43 es una versión en color de la figura 8, que muestra un ejemplo de tinción del anticuerpo anti-UP III [BC17] en una sección en serie del mismo tejido de CCT de vejiga de la figura 42.

55 Las figuras 44A y 44B son una versión en color de las figuras 9A y 9B, que muestran la reactividad cruzada de los anticuerpos BC21 y BC17 con la proteína uroplaquina II y la proteína uroplaquina III mediante transferencia de Western.

60 La figura 45 es una versión en color de la figura 10, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + UP III que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica.

La figura 46 es una versión en color de la figura 11, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + GATA3 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

65 La figura 47 es una versión en color de la figura 12, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + GATA3 que tiñe

carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

5 La figura 48 es una versión en color de la figura 13, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + UP III + GATA3 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II y UP III (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de GATA3 (marrón) es nuclear.

10 La figura 49 es una versión en color de la figura 14, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

15 La figura 50 es una versión en color de la figura 15, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 51 es una versión en color de la figura 16, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

20 La figura 52 es una versión en color de la figura 17, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

25 La figura 53 es una versión en color de la figura 18, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 y PSA (nuclear y citoplásmica, respectivamente; marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

30 La figura 54 es una versión en color de la figura 19, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) y PSA (citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

35 La figura 55 es una versión en color de la figura 20, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe cáncer de próstata. La tinción de PSA (marrón) es citoplásmica. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) y PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 56 es una versión en color de la figura 21, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 y PSA (nuclear y citoplásmica, respectivamente; roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

40 La figura 57 es una versión en color de la figura 22, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (roja) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PSA (citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

45 La figura 58 es una versión en color de la figura 23, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + PSA que tiñe cáncer de próstata. La tinción de PSA (roja) es citoplásmica. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PAX8 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

50 La figura 59 es una versión en color de la figura 24, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + NKX3.1 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica. La tinción de NKX3.1 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

55 La figura 60 es una versión en color de la figura 25, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + NKX3.1 que tiñe cáncer de próstata. La tinción de NKX3.1 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 61 es una versión en color de la figura 26, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de PAX8 (nuclear, marrón) y NKX3.1 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

60 La figura 62 es una versión en color de la figura 27, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe carcinoma de células renales. La tinción de PAX8 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y NKX3.1 (nuclear, roja) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

65 La figura 63 es una versión en color de la figura 28, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + PAX8 + NKX3.1 que tiñe cáncer de próstata. La tinción de NKX3.1 (roja) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) y PAX8 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 64 es una versión en color de la figura 29, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica.

5 La figura 65 es una versión en color de la figura 30, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de UP II (marrón) es membranosa y citoplásmica. La tinción de p63 (nuclear, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

10 La figura 66 es una versión en color de la figura 31, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe neoplasia intraepitelial prostática (PIN). La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

15 La figura 67 es una versión en color de la figura 32, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p63 que tiñe próstata normal. La tinción de p63 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (membranosa y citoplásmica, marrón) puede reducirse o posiblemente estar ausente en esta muestra.

La figura 68 es una versión en color de la figura 33, que muestra un ejemplo de un cóctel de UP II + p40 que tiñe carcinoma urotelial. La tinción de p40 (marrón) es nuclear. La tinción de UP II (roja) es membranosa y citoplásmica.

## 20 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Como puede entenderse a partir de la discusión anterior, la presente invención incluye una variedad de aspectos, que se pueden combinar de diferentes maneras. Las siguientes descripciones se proporcionan para enumerar elementos y describir algunas de las realizaciones de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones iniciales, sin embargo, se debe entender que se pueden combinar de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los ejemplos descritos en diversas formas y las realizaciones preferentes no deben interpretarse como que limitan la presente invención a solo los sistemas, técnicas y aplicaciones descritos explícitamente. Además, se debe entender que esta descripción respalda y abarca descripciones y reivindicaciones de todas las diversas realizaciones, sistemas, técnicas, procedimientos, dispositivos y aplicaciones con cualquier número de elementos dados a conocer, con cada elemento solo, y también con cualquiera de las diversas permutaciones y combinaciones de todos los elementos en esta o cualquier solicitud posterior.

35 Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar anticuerpos y procedimientos de los mismos que se unen específicamente a UP II y pueden utilizarse para la detección de UP II en el diagnóstico de varios tipos de cáncer en muestras de tejidos. Un anticuerpo anti-UP II puede ser un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo con un marcador unido o incluso conjugado con él o con un fragmento del mismo, un anticuerpo marcado con una señal o tinción detectable o un anticuerpo marcado con una toxina. Entre los marcadores se pueden incluir, elementos radiactivos, partículas magnéticas, radioisótopos, colorantes fluorescentes, enzimas, toxinas, señales, tinciones, enzimas de detección, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa, cromógenos, rojo Fast, 3,3'-diaminobencidina, 3-amino-9-etilcarbazol, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónido o cualquier combinación de los mismos. Los sistemas y procedimientos de la presente invención se pueden relacionar con el anticuerpo o su parte de unión a antígeno capaz de unirse a UP II.

50 Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar anticuerpos monoclonales y procedimientos de los mismos que se unen específicamente a UP II y pueden utilizarse para la detección de UP II en el diagnóstico de varios tipos de cáncer en muestras de tejidos. El anticuerpo monoclonal anti-UP II puede ser un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal de conejo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo marcado con una señal o tinción detectable o un anticuerpo marcado con una toxina. Los sistemas y procedimientos de la presente invención se pueden relacionar con el anticuerpo monoclonal o su parte de unión a antígeno capaz de unirse a UP II.

55 Los anticuerpos monoclonales de ratón pueden utilizarse de forma habitual en procedimientos de inmunoensayo para identificar analitos específicos, que incluyen anticuerpos primarios en procedimientos de inmunohistoquímica. Los anticuerpos monoclonales de ratón específicos para la proteína diana de interés pueden producirse utilizando procedimientos conocidos de manera general. De manera general, la exposición de un ratón al antígeno de interés (por ejemplo, un fragmento peptídico de la diana deseada o la proteína diana de longitud completa) puede inducir una respuesta inmunitaria en la que el ratón genera múltiples anticuerpos que se unen al antígeno, cada uno de los cuales puede producirse por una célula B particular. Estas células B pueden aislarse del bazo de ratón y los anticuerpos producidos pueden evaluarse para determinar su idoneidad como anticuerpos primarios en IHC. Después de seleccionar el anticuerpo óptimo, la célula B asociada puede fusionarse con una célula tumoral utilizando procedimientos conocidos, lo que puede dar como resultado un hibridoma, una nueva línea celular que puede replicarse sin fin y puede producir continuamente el anticuerpo deseado.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser preferentes a los anticuerpos policlonales por varias razones. En particular, los anticuerpos monoclonales pueden derivarse de una única célula B y, como tales, pueden reconocer un solo epítipo, lo que posiblemente da como resultado una mayor especificidad. Los anticuerpos monoclonales también se pueden generar de forma conveniente y reproducible en cultivo celular, lo que posiblemente da como resultado un suministro constante del anticuerpo deseado. Por supuesto, los anticuerpos policlonales pueden utilizarse en algunas realizaciones.

Los anticuerpos anti-UP II, tales como un anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón, pueden producirse utilizando estos procedimientos generales y pueden evaluarse por inmunohistoquímica para determinar la sensibilidad y especificidad en una variedad de tejidos normales y neoplásicos, en particular, en comparación posiblemente con el anticuerpo anti-UP III [BC17].

**Ejemplo de expresión de proteína UP II:** Se puede clonar y expresar una proteína recombinante UP II de la secuencia de aminoácidos 26 a 155 a partir de *E. coli*. De manera breve, el ADNc de UP II puede clonarse y purificarse. El ADNc de UP II puede ser digerido por enzimas de restricción y ligado en el vector pET30a-GST. Las células BL21 se pueden transformar con la construcción. Las colonias que expresan el tamaño correcto de la proteína recombinante se pueden seleccionar y secuenciar. Se puede realizar una producción a mayor escala cultivando *E. coli* en medio LB que contiene IPTG 0,5 mM. La proteína recombinante UP II final puede purificarse y analizarse mediante SDS-PAGE.

**Ejemplo de inmunización del huésped:** Se pueden inmunizar ratones BALB/c hembra (de, aproximadamente, 6 a, aproximadamente, 8 semanas de edad) por vía intraperitoneal (i.p.) con, aproximadamente, 100 µg de proteína UP II humana por ratón en adyuvante completo de Freund. Aproximadamente tres semanas después, los ratones pueden reforzarse con otros 100 µg de UP II humana por ratón en adyuvante de Freund incompleto, aproximadamente, 4 veces más en intervalos de, aproximadamente, 3 semanas. Los ratones se pueden desangrar de la cola, y los sueros se pueden recoger y almacenar a -20°C para un análisis posterior de los títulos de anticuerpos mediante el ensayo de inmunoadsorción (ELISA).

**Ejemplo de hibridomas:** Se pueden generar los hibridomas que producen anticuerpos contra UP II mediante técnicas estándar de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con UP II. Por ejemplo, los esplenocitos de ratones inmunizados con UP II pueden fusionarse con células de mieloma P3-X63-Ag 8.653 (mieloma no secretor derivado de células SP2/0 de mieloma Balb/c) mediante incubación con, aproximadamente, el 50% de polietilenglicol en una proporción de, aproximadamente, 4:1. Después de la incubación, las células pueden sedimentarse por centrifugación posiblemente a, aproximadamente, 300G durante, aproximadamente, 10 minutos, lavarse en, aproximadamente, 25 ml de PBS, recentrifugarse y el sedimento celular puede resuspenderse en, aproximadamente, 100 ml de medio de Dulbecco fresco que contiene, aproximadamente, el 20% de suero fetal bovino. (Hyclone, Utah, Colorado). Se pueden añadir alícuotas de, aproximadamente, 100 µl a cada pocillo de diez placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Lowell, Massachussets). Aproximadamente, veinticuatro horas después, se pueden añadir, aproximadamente, 100 µl de medio de cultivo DMEM complementado con hipoxantina (HT) 1 M, aproximadamente, aminoptericina 4 mM, aproximadamente y timidina (HAT) 160 mM, aproximadamente, a cada pocillo de microtitulación. Los medios pueden reemplazarse posiblemente después de 4 días, aproximadamente, con un medio completo (que posiblemente contiene HAT y HT). Durante los siguientes 10 días, los medios pueden ser eliminados y reemplazados por medios nuevos con HAT reducida o incluso sin HAT y HT añadidos. Los sobrenadantes de hibridoma pueden cribarse por ELISA para determinar la reactividad del anticuerpo contra UP II, y se pueden seleccionar y estabilizar los clones de hibridoma posiblemente mediante clonación dos veces mediante dilución limitante.

Las células de hibridoma denominadas clon BC21 de hibridoma anti-UP II humana se han depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo la designación de depósito de patente ACCT No. PTA-13181. Las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante el hibridoma depositado en la ATCC e incluso pueden incluir un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal cultivando la célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente uroplaquina II e incluso permitir que el hibridoma produzca anticuerpos monoclonales.

**ELISA:** las respuestas inmunitarias del huésped anti-suero a UP II se pueden medir mediante ELISA. Por ejemplo, puede utilizarse una solución de UP II (aproximadamente, 1 µg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para recubrir placas de poliestireno de fondo plano de, aproximadamente, 96 pocillos. Las placas pueden bloquearse con, aproximadamente, un 1% de albúmina de suero bovino (BSA)-PBS. Se pueden añadir inmunosueros diluidos o sobrenadantes de hibridoma y se pueden incubar a, aproximadamente, 37°C durante, aproximadamente, 1 hora. Después de lavar las placas con PBS, las placas pueden incubarse con reactivos HRP anti-ratón de cabra (Jackson Labs). Las incubaciones pueden realizarse a, aproximadamente, 37°C durante, aproximadamente, 30 minutos. El sustrato ABTS se puede añadir para desarrollar color y se puede medir la absorbancia a, aproximadamente, 405 nm (A405) en un lector de placas de microtitulación.



**Isotipo de anticuerpos monoclonales:** Se pueden isotipar los anticuerpos anti-UP II, tales como el anticuerpo monoclonal BC21 utilizando un kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón (Invitrogen, Carlsbad, California). Por ejemplo, se pueden añadir, aproximadamente, 100 µl de sobrenadante de células de anticuerpo monoclonal de ratón [BC21] a placas recubiertas con IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgM e IgA anti-ratón de cabra. Después de, aproximadamente, 30 minutos de incubación, la placa se puede lavar 3 veces con PBS y se puede incubar con reactivo de cabra anti Ig-HRP de ratón. Se puede añadir el sustrato ABTS para desarrollar color y se puede medir la absorbancia a, aproximadamente, 405 nm (A405) en un lector de placas de microtitulación. El clon BC21 puede analizarse para determinar su isotipo y puede identificarse como IgG1/kappa de ratón.

**Producción y purificación de anticuerpos:** Se pueden cultivar las células de hibridoma seleccionadas del clon BC21 con medio de cultivo DMEM complementado con, aproximadamente, un 10% de FBS o cualquier medio exento de suero. Los sobrenadantes de cultivo pueden purificarse adicionalmente mediante una columna de afinidad de proteína A. Las células de hibridoma se pueden inyectar también en ratones BALB/c cebados con pristano para producir ascitis de anticuerpo. La ascitis de anticuerpo puede purificarse adicionalmente mediante una columna de afinidad de proteína A. La concentración de IgG puede medirse espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción para IgG humana de, aproximadamente, 1,4 (aproximadamente el 0,1% a, aproximadamente, 280 nm). La pureza de IgG puede determinarse por SDS-PAGE.

**Reactividad cruzada probada mediante transferencia de Western:** el anticuerpo monoclonal purificado [BC21] se puede caracterizar mediante transferencia de Western. La proteína UP II o UP III de longitud completa puede someterse a electroforesis en gel de proteína utilizando de, aproximadamente, el 4 a, aproximadamente, el 12% de SDS-PAGE con tampón Tris-glicina y puede transferirse sobre filtros de nitrocelulosa en tampón Tris-glicina. Las proteínas en las transferencias se pueden visualizar incubando el anticuerpo BC21 durante, aproximadamente, 60 minutos a temperatura ambiente después del bloqueo con tampón de bloqueo, seguido de la incubación con inmunoglobulinas anti-ratón de cabra conjugadas con peroxidasa.

**Determinación de las secuencias VH y VL:** el ARN total se puede extraer de los hibridomas utilizando el kit Qiagen (EE. UU., Gaithersburg, Maryland) según las instrucciones del fabricante. La RT-PCR de primera ronda se puede llevar a cabo con el kit QIAGEN® OneStep RT-PCR. La RT-PCR puede realizarse con conjuntos de cebadores específicos para las cadenas pesada y ligera. Para cada muestra de ARN, pueden prepararse, aproximadamente, 12 reacciones de RT-PCR de cadena pesada y, aproximadamente, 11 de cadena ligera utilizando mezclas de cebadores directos degenerados que cubren las secuencias líder de regiones variables. Los cebadores inversos pueden estar ubicados en las regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras. Los sitios de restricción pueden no diseñarse en los cebadores. Los productos de RT-PCR de las reacciones de primera ronda pueden amplificarse en la segunda ronda de PCR. Se pueden establecer, aproximadamente, 12 reacciones de RT-PCR de cadena pesada individual y, aproximadamente, 11 de cadena ligera utilizando conjuntos de cebadores semianidados específicos para regiones variables de anticuerpos. Los ADNc amplificados se pueden purificar en gel y posteriormente se pueden secuenciar.

Los dominios variables de [BC21] se secuenciaron para proporcionar polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de una o más de las CDR de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une al epítipo de UP II **LSPALTESLLVALPP**, identificado como SEQ ID NO: 4. La secuencia de la región variable de la cadena pesada se identifica como SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de la cadena ligera se identifica como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir un polipéptido de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3 e incluso puede incluir una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. Un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir específicamente a, como mínimo, un polipéptido de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En realizaciones que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones, un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo, o incluso una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada puede tener una secuencia de aminoácidos, como mínimo, aproximadamente, el 70% idéntica a una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse específicamente a, como mínimo, un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es, como mínimo, aproximadamente, el 70% idéntica a los residuos de la SEQ ID NO: 4. Otros porcentajes pueden incluir, pero no están limitados a, como mínimo, aproximadamente, el 71%, como mínimo, aproximadamente, el 72%, como mínimo, aproximadamente, el 73%, como mínimo, aproximadamente, el 74%, como mínimo, aproximadamente, el 75%, como mínimo, aproximadamente, el 76%, como mínimo, aproximadamente, el 77%, como mínimo, aproximadamente, el 78%, como mínimo, aproximadamente, el 79%, como mínimo, aproximadamente, el 80%, como mínimo, aproximadamente, el 81%, como mínimo, aproximadamente, el 82%, como mínimo, aproximadamente, el 83%, como mínimo, aproximadamente, el 84%, como mínimo, aproximadamente, el 85% , como mínimo,

aproximadamente, el 86%, como mínimo, aproximadamente, el 87%, como mínimo, aproximadamente, el 88%, como mínimo, aproximadamente, el 89%, como mínimo, aproximadamente, el 90%, como mínimo, aproximadamente, el 91%, como mínimo, aproximadamente, el 92%, como mínimo, aproximadamente, el 93%, como mínimo, aproximadamente, el 94%, como mínimo, aproximadamente, el 95%, como mínimo, aproximadamente, el 96%, como mínimo, aproximadamente, el 97%, como mínimo, aproximadamente, el 98%, y posiblemente incluso, como mínimo, aproximadamente, el 99%.

**Mapeo de epítomos de la secuencia de unión anti-UP II [BC21] de ratón:** Para determinar la secuencia peptídica de UP II que es reconocida por los anticuerpos anti-UP II, tales como BC21, el mapeo de epítomos puede realizarse posiblemente utilizando dos ensayos: ELISA directo e incluso transferencia puntual. En un ensayo ELISA, la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo anti-UP II [BC21] pueden determinarse midiendo el título del anticuerpo a, aproximadamente, 1:500 y, aproximadamente, 1:1.000. Los péptidos solapantes a una longitud de, aproximadamente, 15 aminoácidos cada uno, que cubren la secuencia de la proteína UP II humana de posiblemente 26 a 155 aminoácidos, se pueden utilizar para determinar la secuencia preferente de unión a BC21.

Se demostró que el epítopo para BC21 estaba incluido en los aminoácidos de los residuos 36-50 de UP II, que es **LSPALTESLLVALPP**, identificada como la SEQ ID NO: 4. El epítopo del anticuerpo monoclonal UP II de ratón, o una parte del mismo, puede ser un antígeno útil para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales, incluida la producción en especies distintas del ratón (por ejemplo, conejo, cabra, caballo, pollo, etc.). Por supuesto, un anticuerpo policlonal se puede unir específicamente a un epítopo en la SEQ ID NO: 4 que se refiere a los residuos 36-50 de la proteína uroplaquina II.

Para el protocolo de ELISA directo, las placas se pueden recubrir primero con, aproximadamente, 100 µl de péptidos UP II a, aproximadamente, 5 µg/ml en tampón de recubrimiento (pH, aproximadamente, 9,5) durante la noche a, aproximadamente, 4°C, seguido de bloqueo (BSA a, aproximadamente, al 3%) a, aproximadamente, 200 µl/pocillo durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente. Las placas pueden incubarse con anticuerpo UP II purificado a, aproximadamente, 100 ng/ml y, aproximadamente, 200 ng/ml por separado durante, aproximadamente, 1 hora a, aproximadamente, temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA. A continuación, las placas se pueden lavar posiblemente cinco veces con PBST (aproximadamente 300 µl/pocillo) seguido de la adición de IgG-HRP antirratón de cabra a las placas y la incubación durante, aproximadamente, 1 hora en un agitador de placas. Las placas pueden lavarse posteriormente con PBST (aproximadamente 300 µl/pocillo) y secarse, y se puede añadir TMB a, aproximadamente, 100 µl/pocillo, revelarse durante, aproximadamente, 5 min en un agitador, e incluso puede seguirse con una solución de parada (aproximadamente 50 µl/pocillo). La absorbancia puede medirse a, aproximadamente, 450 nm en un lector de placas ELISA posiblemente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para el ensayo de transferencia puntual, se puede transferir una membrana de nitrocelulosa con, aproximadamente, 1 µl a una concentración de, aproximadamente, 1 mg/ml del péptido, cuadruplicados por péptido. Esta membrana puede incubarse durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente hasta que esté completamente seca. La membrana puede bloquearse con, aproximadamente, BSA al 3% en TBST (por ejemplo, Tris, aproximadamente, 50 mM, NaCl, aproximadamente, 0,5 M, Tween-20, aproximadamente, al 0,05%, pH, aproximadamente, 7,4) durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente se pueden añadir anticuerpos [BC21] anti UP II de ratón a, aproximadamente, 200 ng/ml durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente en TBST. A continuación, la membrana se puede lavar, aproximadamente, 3 veces (aproximadamente 10 minutos cada lavado) en TBST en un agitador orbital, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG1-AP anti-ratón de cabra durante, aproximadamente, 1 hora a temperatura ambiente en TBST. La membrana puede lavarse posiblemente, aproximadamente, 3 veces (aproximadamente 10 minutos cada una) en TBST en un agitador orbital. La unión se puede detectar añadiendo reactivos de detección de quimioluminiscencia Western Glo y exponiéndolos a una película.

**Procedimiento IHC con BC21 anti-UP II:** La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-UP II tales como el anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón se puede realizar en muestras de tejido incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) utilizando procedimientos conocidos de manera general por los expertos en la materia. Tal como se indica como ejemplo en general mediante los siguientes ejemplos no limitantes (por ejemplo, lavados con solución salina tamponada con Tris, pH de, aproximadamente, 7,6, entre etapas):

1) Secciones (~ 5 µm) de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina se pueden montar en portaobjetos de microscopio disponibles en el mercado posiblemente recubiertos con polilisina.

2) Las secciones se pueden desparafinar (usando xilenos o un sustituto de xileno) y se pueden rehidratar posiblemente a través de una serie de soluciones de alcohol/agua, seguido posiblemente de bloqueo de peroxidasas endógenas posiblemente con, aproximadamente, un 3% de solución de peróxido de hidrógeno.

3) Las muestras pueden someterse a recuperación de antígeno inducida por calor utilizando un tampón de citrato en una olla a presión (Reveal, Decloaking Chamber; Biocare Medical) y pueden calentarse a, aproximadamente, 125°C

durante, aproximadamente, 30 segundos. [Otros procedimientos de recuperación de antígenos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, vaporizador, horno de microondas, enzima) también pueden ser aceptables]. Se puede dejar que los tejidos se enfríen durante, aproximadamente, 10 minutos y posteriormente se pueden enjuagar con agua desionizada.

4) El anticuerpo UP II BC21 se puede aplicar en una solución tamponada con fosfato (pH, aproximadamente, 6,0) con albúmina de suero bovino como proteína vehículo durante, aproximadamente, 30 minutos.

5) La detección del anticuerpo UP II, posiblemente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection, Biocare Medical) puede realizarse en dos etapas. Una aplicación inicial de un anticuerpo IgG anti-ratón de conejo durante, aproximadamente, 10 minutos puede ir seguida de una incubación con un conjugado HRP anti-conejo de cabra durante, aproximadamente, 10 minutos.

6) En una etapa posible de detección final, se puede aplicar 3,3'-diaminobencidina (DAB) en tampón que posiblemente contiene, aproximadamente, el 0,02% de peróxido de hidrógeno (Betazoid DAB, Biocare Medical). La oxidación de DAB a través de un mecanismo mediado por HRP puede dar como resultado la precipitación de un producto cromógeno marrón, permitiendo posiblemente la identificación de sitios de expresión de UP II.

7) Los portaobjetos pueden ser brevemente contrateñidos, posiblemente en una hematoxilina de Mayer modificada.

**Resultados de la tinción de IHC con anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón:** utilizando el protocolo anterior, se evaluó la expresión de UP II en una variedad de tejidos normales y neoplásicos utilizando BC21 y se compararon con patrones de tinción utilizando un anticuerpo monoclonal anti-UP III de ratón (BC17, Biocare Medical). Se optimizó el título de ambos anticuerpos (por ejemplo, concentración) utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se evaluaron diversos títulos de anticuerpos para maximizar la intensidad de la tinción, a la vez que posiblemente se minimizó o incluso se eliminó la tinción de fondo. Para cada anticuerpo, se utilizó el título que proporcionó la máxima intensidad de tinción, posiblemente con la mínima tinción de fondo.

Las figuras 1-8 muestran varios ejemplos de tinción del carcinoma de células de transición de la vejiga por el anticuerpo anti-UP II (BC21), en comparación con la tinción del anticuerpo anti-UP III (BC17), en una sección en serie de la misma muestra.

La tabla 1 muestra la sensibilidad de la tinción del anticuerpo anti-UP II (BC21) a 178 muestras de cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células de transición (CCT) y CCT papilar), utilizando una micromatriz de tejido (TMA). Utilizando un valor de corte de, aproximadamente,  $\geq 5\%$  de las células tumorales que se tiñen como criterio para determinar un caso como "positivo" para UP II y, por el contrario, aproximadamente,  $< 5\%$  de las células tumorales que se tiñen como criterio para determinar un caso "negativo", se descubrieron 137 de 178 (aproximadamente el 77%) positivos para UP II (BC21). El diagnóstico de tumores de mayor grado a veces puede ser un desafío. En estas muestras, el anticuerpo anti-UP II (BC21) identificó 68 de 83 (aproximadamente el 82%) tumores de grado II, y 25 de 44 (aproximadamente el 57%) tumores de grado III.

**Tabla 1: anticuerpo anti-UP II (BC21) en TMA de cáncer de vejiga (CCT y CCT papilar)**

Grado	Número de muestras	Número de muestras positivas	% de positivas	Número de muestras negativas	% de negativas
Grados I, II y III	178	137	77%	41	23%
Grado II	83	68	82%	15	18%
Grado III	44	25	57%	19	43%

La mayor sensibilidad del anticuerpo anti-UP II (BC21), en comparación con el anticuerpo anti-UP III (BC17), se demostró tiñendo las mismas 59 muestras de CCT de grados I, II y III con cada anticuerpo (tabla 2). Utilizando los mismos criterios, el anticuerpo anti-UP II (BC21) identificó 46 muestras como positivas (aproximadamente el 78%), en comparación con 33 muestras (aproximadamente el 56%) que se determinó que eran positivas con anticuerpo anti-UP III (BC17). En las muestras de grado II, el anticuerpo anti-UP II (BC21) y el anticuerpo anti-UP III (BC17) demostraron sensibilidades de, aproximadamente, el 77% (27 de 35) y, aproximadamente, el 54% (19 de 35), respectivamente. En las muestras de grado III, el anticuerpo anti-UP II (BC21) y el anticuerpo anti-UP III (BC17) demostraron una sensibilidad similar de, aproximadamente, el 64% (7 de 11). En muchas comparaciones, el anticuerpo anti-UP II (BC21) proporcionó una tinción más oscura que el anticuerpo anti-UP III (BC17).

**Tabla 2: Comparación de anticuerpo anti-UP II (BC21) y anticuerpo anti-UP III (BC17) en cáncer de vejiga (CCT y CCT papilar) TMA**

Anticuerpo	Grado	Número de muestras	Número de muestras positivas	% de positivas	Número de muestras negativas	% de negativas
BC21	Grados I, II y III	59	46	78%	13	22%
BC17	Grados I, II y III	59	33	56%	26	44%
BC21	Grado II	35	27	77%	8	23%
BC17	Grado II	35	19	54%	16	46%
BC21	Grado III	11	7	64%	4	36%
BC17	Grado III	11	7	64%	4	36%

5 El anticuerpo anti-UP II (BC21) puede ser altamente específico, posiblemente cuando se evalúa en una variedad de tejidos normales (tabla 3) e incluso neoplásicos (tabla 4). La vejiga y el uréter pueden ser los únicos tejidos normales que se tiñen positivamente con UP II (BC21). Esta tinción puede esperarse, posiblemente considerando que la expresión conocida de UP II en el anticuerpo anti-UP II de urotelio normal (BC21) puede no teñir ningún otro tejido normal o neoplásico, lo que puede demostrar su alta especificidad.

10

**Tabla 3: Tinción del anticuerpo anti-UP II (BC21) en tejidos normales**

Tejido	# casos	Número de casos positivos
Glándula suprarrenal	3	0
Vejiga	7	5
Médula ósea	1	0
Ojo	2	0
Mama	3	0
Cerebelo	3	0
Córtex cerebral	3	0
Trompa de Falopio	3	0
GI-Esófago	3	0
GI-Estómago	3	0
GI-intestino delgado	3	0
GI-Colon	3	0
GI-Recto	3	0
Corazón	3	0
Riñón	6	0
Hígado	3	0
Pulmón	3	0
Ovario	3	0
Páncreas	3	0
Paratiroides	1	0
Glándula pituitaria	2	0
Placenta	3	0
Próstata	3	0
Piel	2	0
Médula espinal	2	0
Bazo	2	0
Músculo estriado	3	0
Testículos	3	0
Timo	3	0
Tiroides	3	0
Amígdala	3	0
Uréter	3	3
Cuello uterino	3	0
Endometrio uterino	3	0

**Tabla 4: tinción del anticuerpo Anti-UP II (BC21) de diversos tejidos tumorales**

Tipo de tumor	Número de casos	Número de casos positivos
Cáncer de próstata	10	0
Cáncer de pulmón	20	0
Cáncer de mama	10	0

15

Tipo de tumor	Número de casos	Número de casos positivos
Cáncer de colon	30	0
Cáncer renal	5	0

Los anticuerpos anti-UP II, tales como el anticuerpo anti-UP II (BC21) monoclonal de ratón pueden ofrecer ventajas distintas con su sensibilidad mejorada, posiblemente incluso en comparación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-UP III (BC17). Las figuras 1-8 muestran ejemplos de comparaciones de BC21 con secciones en serie de tinción con BC17 de la misma muestra de CCT de vejiga, lo que posiblemente demuestra la mayor sensibilidad de BC21. Por ejemplo, la muestra de las figuras 1 y 2 puede exhibir una fuerte tinción membranosa y citoplásmica con BC21 (figura 1), mientras que la tinción de BC17 puede ser mínima en este caso (figura 2). En las figuras 3 y 4, se puede observar una tinción fuerte y extendida de BC21 (figura 3); mientras que solo se pueden observar manchas focales dispersas en la misma muestra con BC17 (figura 4). De forma similar, la muestra de las figuras 5 y 6 puede mostrar una fuerte tinción con BC21 (figura 5), pero puede tener solo una tinción limitada con BC17 (figura 6). Finalmente, las figuras 7 y 8 muestran una muestra que también puede presentar una fuerte tinción con BC21 (figura 7); en contraste, BC17 puede ser negativo en esta misma muestra (figura 8).

Estos ejemplos demuestran casos en los que un patólogo podría haber identificado definitivamente la presencia de carcinoma urotelial con un anticuerpo anti-UP II, tal como BC21, lo que no hubiera sido posible con un anticuerpo menos sensible, tal como con BC17 (figuras 1, 2, 7 y 8). O bien, los resultados ambiguos con un anticuerpo anti-UP III, tal como BC17, podrían haber llevado a un diagnóstico equívoco que carece de confianza, mientras que un anticuerpo anti-UP II, como BC21, puede ofrecer un resultado claro e inequívoco (figuras 3, 4, 5 y 6).

La tinción mínima observada con BC17 en las figuras 3, 4, 5 y 6 puede proporcionar excelentes ejemplos del desafío que pueden afrontar los patólogos cuando utilizan un anticuerpo menos sensible; específicamente, cuando la tinción observada puede ser escasa y ligera, puede ser difícil determinar con confianza si se trata de una tinción positiva verdadera, lo que indica la presencia de UP II y, posiblemente, indicativa de carcinoma urotelial, o si es un artefacto de tinción engañoso y debería ser descartado. La ambigüedad asociada con un anticuerpo menos sensible puede conducir a diagnósticos equívocos o incluso incorrectos, y los pacientes con carcinoma urotelial pueden no recibir el tratamiento adecuado de manera oportuna. En contraste, un anticuerpo anti-UP II, tal como BC21, puede ofrecer una ventaja significativa para el diagnóstico con su sensibilidad aumentada. Un anticuerpo anti-UP II, tal como BC21, puede dar lugar a una tinción fuerte y clara del carcinoma urotelial que puede permitir que un patólogo devuelva definitivamente un diagnóstico de carcinoma urotelial, posiblemente permitiendo que un paciente reciba rápidamente el tratamiento más apropiado.

### Resultados de transferencias de Western con anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón

La unión de BC21 a la proteína UP II puede demostrarse mediante transferencia de Western (figura 9A). La ausencia de unión similar de BC21 a la proteína UP III también puede mostrarse mediante transferencia de Western (figura 9 B). Por el contrario, el anticuerpo anti-UP III BC17 puede no unirse a la proteína UP II, pero puede reconocer la proteína UP III (figura 9B).

En algunas realizaciones de la presente invención, los anticuerpos anti-UP II, tales como el anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón pueden ser adecuados para utilizar en muchas variaciones de los protocolos anteriores y otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las muestras teñidas con BC21 se pueden archivar utilizando un medio de montaje permanente y un cubreobjetos. El anticuerpo BC21 también se puede utilizar en un instrumento de tinción automatizado, utilizando protocolos estándar. También se puede concebir la utilización de muchos procedimientos de detección alternativos (por ejemplo, fluorescencia), enzimas de detección (por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa) y, posiblemente, incluso cromógenos (por ejemplo, 3-amino-9-etilcarbazol, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucurónido), conocidos de manera general por los expertos en la materia.

Un epítipo de anticuerpos anti UP II, tal como anticuerpo monoclonal anti-UP II de ratón, o una parte del mismo, puede ser un antígeno útil para la producción de nuevos anticuerpos monoclonales, incluida la producción en especies distintas del ratón (por ejemplo, conejo, cabra, caballo, pollo, etc.) como lo entendería un experto en la materia. Un anticuerpo monoclonal para uroplaquina III puede incluir un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal de conejo, un anticuerpo monoclonal de cabra, un anticuerpo monoclonal de caballo, un anticuerpo monoclonal de pollo, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo quimérico, o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, un anticuerpo policlonal para uroplaquina III puede incluir un anticuerpo policlonal de conejo, anticuerpo policlonal de ratón, un anticuerpo policlonal de cabra, un anticuerpo policlonal de caballo, un anticuerpo policlonal de pollo, un anticuerpo policlonal humanizado, cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones adicionales, un anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado.

Aunque en el presente documento puede describirse la utilización de anticuerpos anti-UP II, tales como BC21 en inmunohistoquímica de tejidos incluidos en parafina fijados con formalina, su utilidad en otros inmunoensayos puede concebirse fácilmente y todos están incluidos en la presente solicitud. En particular, puede ser bien conocido que muchos de los mismos reactivos utilizados en IHC de FFPE se pueden utilizar también en IHC de secciones de

tejido congelado. Los anticuerpos anti-UP II, tales como BC21 también pueden ser útiles en otros inmunoensayos, que incluyen ELISA, posiblemente utilizando procedimientos conocidos de manera general.

5 En otro aspecto de la presente invención, posiblemente relacionado con IHC, se puede utilizar un anticuerpo anti-UP II junto con uno o más anticuerpos primarios adicionales como parte de un cóctel, para realizar un procedimiento de "doble tinción" (también descrito como multitinción o incluso múltiplex). Dichos procedimientos de "doble tinción" pueden ser bien conocidos en la técnica de manera general; sin embargo, pueden no conocerse las mejores combinaciones de anticuerpos primarios para una aplicación de diagnóstico particular.

10 En el presente procedimiento, anticuerpos anti-UP II, tales como un anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón, podrían combinarse con uno o más anticuerpos en un cóctel de anticuerpos primario. Como mínimo uno de los anticuerpos adicionales podría derivarse de una especie distinta del ratón, tal como un anticuerpo de conejo. Los anticuerpos pueden derivarse de, como mínimo, dos especies diferentes tales como un huésped de ratón o un huésped de conejo. Entre las especies se pueden incluir ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, ser humano o cualquier combinación de las mismas. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. De esta manera, los múltiples anticuerpos en el cóctel primario de anticuerpos pueden diferenciarse en las siguientes etapas de detección e incluso visualización. Por ejemplo, después de la incubación de la muestra de tejido con el cóctel de anticuerpos primarios, se puede aplicar el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP habitual, seguido posiblemente por un cromógeno apropiado, tal como DAB. Posteriormente, se puede realizar una segunda etapa de detección, utilizando anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con AP, seguido posiblemente por un cromógeno apropiado, tal como rojo Fast. De esta manera, se pueden identificar dos o más dianas en la misma muestra de tejido con los dos colores resultantes. En este ejemplo específico, los anticuerpos primarios de ratón (que incluyen BC21) podrían producir tinción marrón (DAB) y los anticuerpos primarios de conejo podrían producir tinción roja (rojo Fast).

25 Los anticuerpos anti-ratón o anti-conejo que comprenden los conjugados anticuerpo-enzima pueden derivar de una especie huésped diferente, entre las que se incluyen ratón, conejo, pollo, caballo, rata, cabra u oveja. Un anticuerpo primario puede ser de una variedad de especies huésped, entre las que se incluyen ratón, conejo, pollo, caballo, rata, cabra u oveja. En realizaciones, un anticuerpo puede incluir un conjugado anticuerpo-enzima y un anticuerpo primario podría obtenerse a partir de dos especies huésped diferentes. También se pueden utilizar cromógenos distintos de DAB y/o rojo Fast.

30 Son posibles múltiples alternativas al procedimiento de doble tinción, entre las que se incluyen la utilización de más de dos anticuerpos, la utilización de especies distintas al ratón y al conejo, otros cromógenos y sistemas de detección, un orden diferente de detección y posiblemente incluso modificaciones que dan como resultado tres o más colores (lo que puede requerir una etapa de desnaturalización).

35 Las realizaciones de la presente invención pueden dar a conocer una composición que tiene, como mínimo, dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, posiblemente como un cóctel, en la que, como mínimo, uno de los dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se une específicamente a, como mínimo, uroplaquina II. Esto puede dar a conocer un procedimiento para detectar, como mínimo, dos proteínas diferentes en una muestra biológica, posiblemente poniendo en contacto una muestra biológica con una composición que comprende, como mínimo, dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos en los que, como mínimo, uno de los, como mínimo, dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse específicamente, como mínimo, a uroplaquina II, para formar un complejo antígeno-anticuerpo y se puede detectar un complejo antígeno-anticuerpo. Una composición puede tener, como mínimo, un primer anticuerpo primario y, como mínimo, un segundo anticuerpo primario. Entre las muestras biológicas se pueden incluir sangre, orina, tejido de la vejiga, tejido urotelial, tejido celular de transición, tejido normal, tejido neoplásico, tejido renal, tejido ovárico, tejido tiroideo, tejido endometrial, tejido renal, tejido de la amígdala, tejido del páncreas, tejido de colon, tejido de ganglio linfático, tejido pancreático neoplásico, tejido de estómago, tejido de próstata, tejido de pulmón y tejido mamario.

40 Como mínimo, uno de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se puede unir específicamente, como mínimo, a uroplaquina II y puede incluso tener un valor de corte de indicación positiva de más del 1% de las células teñidas. Tal como se menciona en el presente documento, un valor de corte de indicación positiva puede proporcionar un porcentaje de células teñidas necesarias para indicar un resultado de tinción positivo. Entre otros valores de corte se pueden incluir más de, aproximadamente, el 1% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 2% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 3% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 4% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 5% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 6% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 7% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 8% de células teñidas, más de, aproximadamente, el 9% de células teñidas, y posiblemente incluso más de, aproximadamente, el 10 % de células teñidas, o superior.

50 En realizaciones, la presente invención puede dar a conocer una composición con, como mínimo, dos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que pueden ser capaces de proporcionar resultados de visualización diferentes, tales como resultados de color diferentes. Tal como se describe en otras realizaciones a continuación, una composición puede proporcionar que, como mínimo, otro de, como mínimo, dos anticuerpos o fragmentos de

unión a antígeno de los mismos se puedan unir específicamente a GATA-3, p63, uroplaquina III, PAX8, NKX3.1, PSA o cualquier combinación de los mismos. Los anticuerpos, composiciones de los mismos, posiblemente con anticuerpos antiuroplaquina II, pueden proporcionar un sistema de detección entre los que se incluyen una composición de detección de carcinoma urotelial, una composición de detección de carcinoma de células renales, una composición de detección de carcinoma de próstata/prostático o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, puede utilizarse una tinción de un solo color para un cóctel de anticuerpos primarios. En un ejemplo, si el cóctel de anticuerpos primario está compuesto por anticuerpos derivados todos de la misma especie huésped, entonces se puede utilizar un conjugado de enzima de un solo anticuerpo para teñir la presencia de todos los anticuerpos con un solo color. La presencia o ausencia de cada anticuerpo se puede determinar basándose en la localización celular, o posiblemente esta determinación no es necesaria y la tinción se puede interpretar de manera efectiva sin identificar la presencia o ausencia de cada anticuerpo individual.

Ciertas etapas de un procedimiento de IHC pueden realizarse de forma secuencial o simultánea, posiblemente mediante la utilización de un cóctel de reactivos, tal como es conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en un cóctel primario de anticuerpos se pueden aplicar alternativamente en etapas secuenciales de uno o más anticuerpos. De forma similar, los reactivos de detección se pueden aplicar simultáneamente en un cóctel de reactivos o los reactivos separados en etapas secuenciales.

En algunas realizaciones, se puede aplicar un primer anticuerpo primario, seguido de un primer conjugado anticuerpo-enzima y un primer cromógeno, y posteriormente una etapa de desnaturalización, antes de proceder a la aplicación de un segundo anticuerpo primario, seguido de un segundo conjugado anticuerpo-enzima y un segundo cromógeno. De esta manera, se puede lograr una doble tinción de dos colores diferentes utilizando anticuerpos primarios derivados de la misma especie.

Entre los anticuerpos que pueden ser útiles para el diagnóstico cuando se combinan con un anticuerpo anti-UP II, tal como un anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón en un cóctel de anticuerpos primarios para su utilización en procedimientos de tinción múltiple se pueden incluir:

**Tabla 5**

<b>Cóctel de anticuerpos</b>	<b>Utilidad</b>
UPII + UPIII	Marcador urotelial de sensibilidad mejorada
UPII + GATA3	Marcador urotelial de sensibilidad mejorada
UPII + UPIII + GATA3	Marcador urotelial de sensibilidad mejorada
UPII + PAX8	Marcador diferencial de vejiga y riñón
UPII + PAX8 + PSA	Marcador diferencial de vejiga, riñón y próstata
UPII + NKX3.1	Marcador diferencial de vejiga y próstata
UPII + PAX8 + NKX3.1	Marcador diferencial de vejiga, riñón y próstata
UPII + p63	Marcador urotelial de sensibilidad mejorada y marcador diferencial de vejiga y próstata y marcador diferencial de carcinoma de células escamosas vesicales y no vesicales
UPII + GATA-3 y/o p63 + PAX8 + PSA y/o NKX3.1	Marcador diferencial de vejiga, riñón y cáncer de próstata
UPII + p40	Marcador urotelial de sensibilidad mejorada y marcador diferencial de vejiga y próstata y marcador diferencial de carcinoma de células escamosas vesicales y no vesicales

Un anticuerpo anti-UP II, tal como un anticuerpo monoclonal anti-UP II BC21 de ratón puede ser específico para la detección de UP II y puede ser útil en procedimientos inmunohistoquímicos para el diagnóstico de varios tipos de cánceres en muestras de tejido humano. En particular, el anticuerpo anti-UP II, tal como BC21, tiene ventajas respecto el anticuerpo BC17 anti-UP III, entre las que se incluyen una mayor sensibilidad.

Los niveles de expresión de la proteína UP II pueden ser un marcador pronóstico de los resultados del paciente en casos de cáncer de vejiga. La determinación de la expresión de UP II, utilizando un anticuerpo tal como BC21, puede ayudar a identificar pacientes con más probabilidades de experimentar un desenlace positivo (por ejemplo, un mayor tiempo de supervivencia, un mayor tiempo de progresión de la enfermedad, un tamaño tumoral reducido), un pronóstico positivo o bueno, o aquellos pacientes con más probabilidades de experimentar un desenlace negativo (por ejemplo, un tiempo de supervivencia más corto, un tiempo más corto para la progresión de la enfermedad), un pronóstico negativo o malo. La determinación de la expresión de UP II, utilizando un anticuerpo tal como BC21, puede ayudar también a predecir la respuesta del paciente a un tratamiento terapéutico particular. Por ejemplo, el nivel de expresión de UP II puede ayudar a determinar la probabilidad de que un paciente pueda beneficiarse de un agente farmacéutico particular, entre los que se incluyen agentes terapéuticos basados en anticuerpos. Por el contrario, la expresión de UP II puede ayudar a determinar la probabilidad de que un paciente no se beneficie de un tratamiento terapéutico particular.

Las realizaciones alternativas de anticuerpos que pueden ser útiles para el diagnóstico, cuando se combinan con un anticuerpo UP II, tal como un anticuerpo monoclonal UP II BC21 de ratón en un cóctel de anticuerpos primarios para su utilización en procedimientos de tinción múltiple pueden incluir:

5

**Tabla 6**

Combinación de anticuerpos (Especie huésped, localización celular, color de tinción*)	Utilidad diagnóstica posible	Sistema de detección utilizado en el ejemplo y número de figura
UPIII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón) UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón)	Puede observarse tinción de UPII y/o UPIII en el carcinoma urotelial.	HRP Anti-ratón de cabra Figura 10
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) GATA3 (conejo, nuclear, marrón)	Puede observarse tinción de UPII y/o GATA3 en el carcinoma urotelial.	DS # 1 Figuras 11, 12
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) UPIII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) GATA3 (conejo, nuclear, marrón)	Puede observarse tinción de UPII y/o UPIII y/o GATA3 en el carcinoma urotelial.	DS # 1 Figura 13
UPII (Ratón, membranosa y citoplásmica, roja) PAX8 (conejo, nuclear, marrón)	La tinción de UPII se puede observar en el carcinoma urotelial. La tinción de PAX8 se puede observar en el carcinoma de células renales.	DS # 1 Figuras 14, 15, 16, 17
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) PAX8 (conejo, nuclear, marrón)  PSA (conejo, citoplásmica, marrón)	Se puede observar una tinción de UPII en el carcinoma urotelial. La tinción de PAX8 se puede observar en el carcinoma de células renales. La tinción de PSA se puede observar en el carcinoma de próstata.	DS # 1 Figuras 18, 19, 20
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón)  PAX8 (conejo, nuclear, roja) PSA (conejo, citoplásmica, roja)	Se puede observar tinción de UPII de en el carcinoma urotelial.  La tinción de PAX8 se puede observar en el carcinoma de células renales. La tinción de PSA se puede observar en el carcinoma de próstata.	DS # 2 Figuras 21, 22, 23
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón) NKX3.1 (conejo, nuclear, roja)	La tinción de UPII se puede observar en el carcinoma urotelial. La tinción de NKX3.1 puede observarse en el carcinoma de próstata	DS # 2 Figuras 24, 25
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón) PAX8 (ratón, nuclear, marrón)  NKX3.1 (conejo, nuclear, roja)	Se puede observar tinción de UPII en el carcinoma urotelial. La tinción de PAX8 se puede observar en el carcinoma de células renales. Se puede observar tinción de NKX3.1 en el carcinoma de próstata	DS # 2 figuras 26, 27, 28
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) p63 (ratón, nuclear, marrón)	La tinción UPII se puede observar en el carcinoma urotelial. La tinción de p63 puede observarse en el carcinoma urotelial.	HRP anti-ratón de cabra y AP anti-ratón de cabra Figura 29
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, marrón) p63 (ratón, nuclear, marrón)	La tinción de UPII se puede observar en el carcinoma urotelial. La tinción de p63 se puede observar en próstata normal o PIN	HRP anti-ratón de cabra. Figuras 30, 31, 32
UPII (ratón, membranosa y citoplásmica, roja) p40 (ratón, nuclear, marrón)	La tinción de UPII se puede observar en el carcinoma urotelial. La tinción de p40 puede observarse en el carcinoma urotelial.	HRP anti-ratón de cabra y AP anti-ratón de cabra Figura 33



Combinación de anticuerpos (Especie huésped, localización celular, color de tinción*)	Utilidad diagnóstica posible	Sistema de detección utilizado en el ejemplo y número de figura
<p>El color enumerado de cada tinción puede ser el resultado de un sistema de detección que puede incluir un anticuerpo anti-ratón conjugado posiblemente con HRP e incluso un anticuerpo anti-ratón conjugado posiblemente con AP, posiblemente incluso con DAB y Rojo Fast como cromógenos, que pueden dar como resultado tinción marrón para anticuerpos de ratón y tinción roja para anticuerpos de conejo (denominado DS # 2). Alternativamente, el sistema de detección puede incluir un anticuerpo anti-ratón posiblemente conjugado con AP e incluso un anticuerpo anti-conejo posiblemente conjugado con HRP, posiblemente incluso con DAB y Fast Red como cromógenos, lo que puede producir tinción roja para anticuerpos de ratón y tinción marrón para anticuerpos de conejo (denominado DS # 1). En algunos casos, pueden no ser necesarios dos colores porque los antígenos se pueden distinguir por localización celular de la tinción, o posiblemente no sea significativo desde el punto de vista del diagnóstico para determinar qué antígeno se está tiñendo. Se pueden obtener otras combinaciones de color utilizando otros sistemas de detección o cromógenos y todos están destinados a ser incluidos en la presente divulgación.</p>		

- 5 Los ejemplos no limitantes de diversos cócteles enumerados en la tabla 6 son solo ejemplos y no pretenden sugerir que cada caso de un cáncer particular podría producir el mismo resultado. Por ejemplo, no todos los casos de carcinoma urotelial podrían ser positivos para UP II y/o GATA3. Además, no todos los casos de carcinoma de células renales podrían ser positivos para PAX8 y similares. Cada marcador puede reducirse o incluso puede estar ausente en otros casos.
- 10 En algunas realizaciones, la combinación de UP II con otro anticuerpo que tiñe tejido urotelial, tal como UP III, puede ser útil, aumentando posiblemente la sensibilidad en comparación con la tinción con cada uno de los anticuerpos individualmente. La figura 10 muestra un ejemplo de un cóctel de UP III + UP II que tiñe una muestra de carcinoma urotelial. En algunos casos, se puede observar la tinción de UP II, cuando posiblemente la tinción de UP III se reduce o está ausente. En otros casos, puede observarse tinción de UP III, cuando posiblemente la tinción de UP II se reduce o está ausente.
- 15 Un cóctel de UP II + GATA3 también puede proporcionar una mayor sensibilidad para el carcinoma urotelial. En la figura 11 se muestra una muestra de carcinoma urotelial teñida con un cóctel de UP II + GATA3. En algunos casos, puede observarse tinción de UP II, cuando posiblemente la tinción de GATA3 se reduce o está ausente. En otros casos, se puede observar la tinción de GATA3, cuando posiblemente la tinción de UP II se reduce o está ausente.
- 20 La combinación de múltiples marcadores de carcinoma urotelial puede mejorar aún más la sensibilidad. Una muestra teñida con un cóctel de UP II + GATA3 se muestra en la figura 12. La misma muestra teñida con un cóctel de UP II + UP III + GATA3 se muestra en la figura 13. Se observa posiblemente más tinción con el cóctel UP II + UP III + GATA3, lo que puede dar como resultado una sensibilidad mejorada.
- 25 La combinación de UP II + PAX8 puede ser útil para diferenciar el carcinoma urotelial y el carcinoma de células renales. UP II puede teñir el carcinoma urotelial, que no está teñido por PAX8 (figuras 14 y 15). Por el contrario, el carcinoma de células renales puede teñirse con PAX8, pero posiblemente no con UP II (figuras 16 y 17).
- 30 La combinación de UP II + PAX8 + PSA puede ser útil para diferenciar el carcinoma de células renales del carcinoma urotelial y el carcinoma de próstata. UP II puede teñir el carcinoma urotelial, que no se tiñe con PAX8 o PSA (figuras 18 y 21). Por el contrario, el carcinoma de células renales puede teñirse con PAX8, pero posiblemente no con UP II o PSA (figuras 19 y 22). Además, el carcinoma de próstata puede teñirse con PSA, pero posiblemente no con UP II o PAX8 (figuras 20 y 23).
- 35 La combinación de UP II + NKX3.1 puede ser útil para diferenciar el carcinoma urotelial y el carcinoma de próstata. UP II puede teñir el carcinoma urotelial, que no está teñido por NKX3.1 (figura 24). Por el contrario, el carcinoma de próstata puede teñirse con NKX3.1, pero posiblemente no con UP II (figura 25).
- 40 La combinación de UP II + PAX8 + NKX3.1 puede ser útil para diferenciar el carcinoma de células renales del carcinoma urotelial y el carcinoma de próstata. UP II puede teñir el carcinoma urotelial, que no se tiñe con PAX8 o NKX3.1 (figura 26). Por el contrario, el carcinoma de células renales puede teñirse con PAX8, pero posiblemente no con UP II o NKX3.1 (figura 27). Además, el carcinoma de próstata puede teñirse con NKX3.1, pero posiblemente no con UP II o PAX8 (figura 28).
- 45 Un cóctel de UP II + p63 también puede proporcionar una mayor sensibilidad para el carcinoma urotelial. En las figuras 29 y 30 se muestra una muestra de carcinoma urotelial teñida con un cóctel de UP II + p63. La próstata normal, o posiblemente la neoplasia intraepitelial prostática (NIP) pueden teñirse con p63, pero posiblemente no con UP II (figuras 31 y 32).
- 50 Un cóctel de UP II + p40 también puede proporcionar una mayor sensibilidad para el carcinoma urotelial. En la figura 33 se muestra una muestra de carcinoma urotelial teñida con un cóctel de UP II + p40.

La figura 34 muestra un resumen esquemático de diversas realizaciones de la presente invención, que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones, entre las que se incluye un kit (5) que puede proporcionar un anticuerpo anti-UP II, fragmento de unión a antígeno del mismo, parte del mismo, en una composición o incluso en un cóctel, posiblemente incluso proporcionado a partir de un hibridoma, el anticuerpo (1) puede ponerse en contacto con una muestra biológica (2) para formar, como mínimo, un complejo anticuerpo-antígeno (3) que posteriormente puede detectarse con un detector (4).

Como solo un ejemplo de un procedimiento de inmunoensayo, realizaciones de la presente invención, que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones, pueden proporcionar la obtención de tejido de un animal o ser humano para ser probado (6), fijar o congelar dicho tejido (7), tratar dicho tejido fijado o congelado para desenmascarar epítomos contra uroplaquina III (8), poner en contacto dicho tejido tratado con un anticuerpo o fragmento del mismo, tal como se describe en la presente memoria descriptiva en una cantidad y en condiciones tales que un anticuerpo o fragmento del mismo se une a una proteína uroplaquina III si la proteína está presente en dicho tejido (9); y posiblemente incluso detectar la presencia de dichos anticuerpos unidos (10), tal como se representa esquemáticamente en la figura 35.

La presente invención puede proporcionar, en realizaciones que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones, un kit de prueba de diagnóstico o incluso de pronóstico que puede incluir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (tal como se describe en la presente memoria descriptiva) con un elemento de detección de anticuerpo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo posiblemente cuando se une a un antígeno. Esto puede proporcionar un procedimiento para poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo e incluso detectar la unión o incluso la presencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo unido a una proteína o con un antígeno en la muestra biológica utilizando posiblemente un elemento de detección de anticuerpos. Las realizaciones que no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones pueden proporcionar un procedimiento de inmunoensayo para detectar proteína uroplaquina II en un mamífero o ser humano, obteniendo posiblemente un tejido de un animal o un ser humano para probar, poner en contacto el tejido con un anticuerpo anti-UP II o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las diversas realizaciones presentadas en la presente memoria descriptiva posiblemente en una cantidad y en condiciones tales que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir a una proteína uroplaquina II si la proteína está presente en el tejido; e incluso detectar la presencia de anticuerpos unidos. Entre las muestras biológicas se pueden incluir sangre, orina, tejido urotelial, tejido de células de transición, tejido de vejiga, tejido normal, tejido neoplásico, tejido renal, tejido ovárico, tejido tiroideo, tejido endometrial, tejido renal, tejido de amígdala, tejido de páncreas, tejido de colon, tejido de ganglio linfático, tejido pancreático neoplásico, tejido de estómago, tejido de próstata, tejido de pulmón o tejido de mama, dependiendo posiblemente del anticuerpo o incluso del cóctel utilizado.

Se observa que la utilización de términos tales como UP II, anticuerpo UP II, UP III, anticuerpo UP III, BC21, BC17, pueden estar relacionados con anticuerpos anti-UP II, anticuerpos anti-UP III, según sea apropiado como lo entendería un experto en la materia.

Tal como puede entenderse fácilmente a partir de lo anterior, los conceptos básicos de la presente invención pueden incorporarse de varias formas. Estas involucran tanto técnicas de anticuerpos como dispositivos para lograr el anticuerpo apropiado. En la presente solicitud, las técnicas de anticuerpos se describen como parte de los resultados que se muestran que se consiguen mediante los diversos dispositivos descritos y como etapas que son inherentes a la utilización. Simplemente son el resultado natural de utilizar los dispositivos como se pretende y se describe. Además, aunque se dan a conocer algunos dispositivos, debe entenderse que estos no solo cumplen ciertos procedimientos, sino que también pueden variar de diversas maneras. Es importante destacar que, en cuanto a todo lo anterior, debe entenderse que todas estas facetas están abarcadas por la presente divulgación.

La discusión incluida en la presente solicitud tiene la intención de servir como una descripción básica. El lector debe tener en cuenta que la discusión específica puede no describir explícitamente todas las formas de realización posibles; muchas alternativas están implícitas. También puede no explicar completamente la naturaleza genérica de la presente invención y no puede mostrar explícitamente cómo cada característica o elemento puede ser realmente representativo de una función más amplia o de una gran variedad de elementos alternativos o equivalentes. De nuevo, estos están incluidos implícitamente en la presente divulgación. Cuando la presente invención se describe en terminología orientada a dispositivos, cada elemento del dispositivo desempeña implícitamente una función. Las reivindicaciones de los aparatos no solo se pueden incluir para el dispositivo descrito, sino que también se pueden incluir reivindicaciones de procedimientos o procesos para referirse a las funciones que realiza la presente invención y cada elemento. Ni la descripción ni la terminología pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones que se incluirán en cualquier solicitud de patente posterior.

**PATENTES DE EE. UU.**

Número de Patente	Código de clase	Fecha de la publicación	Nombre del titular o solicitante del documento citado
7846762	B2	07-12-2010	Li y otros

**PUBLICACIONES DE SOLICITUDES DE PATENTE DE EE. UU.**

5

Número de publicación	Código de clase	Fecha de la publicación	Nombre del titular o solicitante del documento citado
20070015908	A1	18-01-2007	Fischer y otros

**PUBLICACIONES DE SOLICITUDES DE PATENTE DE EE. UU.**

Número de publicación	Código de país	Código de clase	Fecha de la publicación	Nombre del titular o solicitante del documento citado
2012154983	WO	A2	15-11-2012	Biocare Medical, LLC

10 **DOCUMENTOS DE BIBLIOGRAFÍA NO DE PATENTES**

Brown, H. M. Y otros Uroplakin-III to Distinguish Primary Vulvar Paget Disease From Paget Disease Secondary to Urothelial Carcinoma, <i>Human Path.</i> 2002;33:545-548.
Koga, F. y otros Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, <i>Clin Cancer Res.</i> 2003;9:5501-5507.
Logani, S. y otros Immunoprofile of Ovarian Tumors With Putative Transitional Cell (Urothelial) Differentiation Using Novel Urothelial Markers Histogenetic and Diagnostic Implications, <i>Am J Surg Pathol</i> 2003;27:1434-1441
Matsumoto, K. y otros Loss Expression of Uroplakin III is Associated with Clinicopathologic Features of Aggressive Bladder Cancer, <i>Urology.</i> 2008;72:444-449.
Mhaweck, P. y otros Immunohistochemical Profile of High-Grade Urothelial Bladder Carcinoma and Prostate Adenocarcinoma, <i>Human Path.</i> 2002;33:1136-1140.
Ogawa, K. y otros Immunohistochemical Analysis of Uroplakins, Urothelial Specific Proteins, in Ovarian Brenner Tumors, Normal Tissues, and Benign and Neoplastic Lesions of the Female Genital Tract, <i>Am J Pathol.</i> 1999; 155:1047-1050.
Ohtsuka, Y. y otros Loss of uroplakin III expression is associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract, <i>BJU International</i> , 2006;97: 1322-1326
Parker, D. C. y otros Potential Utility of Uroplakin III, Thrombomodulin, High Molecular Weight Cytokeratin, and Cytokeratin 20 in Noninvasive, Invasive, and Metastatic Urothelial (Transitional Cell) Carcinomas, <i>Am J Surg Pathol</i> 2003;27:1-10.
Wu, X. R. y otros Mammalian Uroplakins, A group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins, <i>J Biol Chem.</i> 1994;269:13716-13724.
Moll, R. y otros Uroplakins, Specific Membrane Proteins of Urothelial Umbrella Cells, as Histological Markers of Metastatic Transitional Cell Carcinomas, <i>American Journal of Pathology</i> , Vol. 147, No. 5, Noviembre de 1995.
Kaufmann, O. y otros Uroplakin III Is a Highly Specific and Moderately Sensitive Immunohistochemical Marker for Primary and Metastatic Urothelial Carcinomas, <i>Am J Clin Pathol</i> 2000;113:683-687
Wu XR, Kong XP, Pellicer A, Kreibich G, Sun TT.; Uroplakins in urothelial biology, function, and disease; <i>Kidney Int.</i> Junio 2009; 75 (11):1153-65.
Wu X, Kakehi Y, Zeng Y, Taoka R, Tsunemori H, Inui M. J; Uroplakin II as a promising marker for molecular diagnosis of nodal metastases from bladder cancer: comparison with cytokeratin 20.; <i>Urol.</i> Diciembre 2005; 174(6): 2138-42.
Olsburgh J, Harnden P, Weeks R, Smith B, Joyce A, Hall G, Poulson R, Selby P, Southgate J.J; Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer <i>Pathol.</i> Enero de 2003; 199(1):41-9.
Lu JJ, Kakehi Y, Takahashi T, Wu XX, Yuasa T, Yoshiki T, Okada Y, Terachi T, Ogawa O; Detection of circulating cancer cells by reverse transcription-polymerase chain reaction for uroplakin II in peripheral blood of patients with urothelial cancer; <i>Clin Cancer Res.</i> Agosto de 2000;6(8):3166-71.
Li SM, Zhang ZT, Chan S, McLenan O, Dixon C, Taneja S, Lepor H, Sun TT, Wu XR; Detection of circulating uroplakin-positive cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder; <i>J. Urol.</i> Septiembre de 1999; 162 (3 Pt 1): 931-5.
Kong XT, Deng FM, Hu P, Liang FX, Zhou G, Auerbach AB, Genieser N, Nelson PK, Robbins ES, Shapiro E, Kachar B, Sun TT.; Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. <i>J Cell Biol.</i> Diciembre de 2004 20;167(6):1195-204.
Okegawa T, Kinjo M, Nutahara K, Higashihara E.; Value of reverse transcription polymerase chain assay in peripheral blood of patients with urothelial cancer. <i>J Urol.</i> Abril de 2004;171(4):1461-6.
Hong-Ying Huang, Shahrokh F. Shariat, * Tung-Tien Sun, Herbert Lepor, Ellen Shapiro, Jer-Tsong Hsieh, Raheela Ashfaq, Yair Lotan, y Xue-Ru Wu, ; Persistent Uroplakin Expression in Advanced Urothelial Carcinomas: Implications

in Urothelial Tumor Progression and Clinical Outcome. Hum Pathol. Noviembre de 2007; 38(11): 1703-1713.
Hoang , L. L. y otros, A Newly Developed Uroplakin II Antibody with Increased Sensitivity in Urothelial Carcinoma of the Bladder, título de la publicación: Uroplakin II in Urothelial Bladder Carcinoma, presentada para publicación a los "Archives of Pathology and Laboratory Medicine" el 17 de Abril de 2013
Solicitud no provisional de los Estados Unidos Número 13/830.473 presentada el 14 de marzo de 2013; titulada Sistemas y Procedimientos para Anticuerpos Antiuroplaquina III.
Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número 61/706.312 presentada el 27 de septiembre de 2012; titulada Sistemas y Procedimientos para Anticuerpos Antiuroplaquina II
Certificado de depósito restringido de Budapest. Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los efectos del procedimiento internacional de patente. Recibo en el caso de un depósito original emitido de conformidad con la regla 7.3 y declaración de viabilidad emitida de conformidad con la regla 10.2, Hibridoma de ratón anti-UP II humana: BC21, PTA-13181, 25 viales, depositados en nombre de: Biocare Medical, Inc., Fecha de recepción de semillas/cepas por la ATCC@: 6 de septiembre de 2012

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Biocare Medical, LLC  
 <120> Sistemas y procedimientos de anticuerpos antiuroplaquina II  
 <130> Uroplaquina-2-PCT

10 <150> USA 61/706.312  
 <151> 27-09-2012  
 <160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 323  
 <212> ADN  
 20 <213> Mus musculus  
 <400> 1

```

tctggggggag gcttagtgca gcctggaggg tcccggaaac tctcctgtgc agcctctgga      60
ttcactttca gtagctttgg aatgcactgg gttcgtcagg ctccagagaa ggggctggag      120
tgggtcgcac acattagtag tggcagtagt accatctact atgcagacac agtgaagggc      180
cgattcacca tctccagaga caatcccaag aacaccctgt tcttgcaaat gaccagtcta      240
aggtctgagg acacggccat gtattactgt gcaagaaggt actactttga ctactggggc      300
caaggcacca ctctcacagt ctc                                             323
  
```

25 <210> 2  
 <211> 335  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

30 <400> 2

ES 2 682 345 T3

gatattgtgc tgacacaatc tcctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 60  
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctagct atagttatat gcactggtac 120  
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180  
ggggtcacctg ccagggtcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240  
cctgtggagg aggaggatac tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300  
acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaacg 335

<210> 3  
<211> 319  
5 <212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 3

gatattgtgc tcacacagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga aaaggtcacc 60  
atgacctgca gtgccagttc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagtcaagc 120  
acctccccca aactctggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180  
ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa 240  
gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactcacggt cggctcgggg 300  
10 acaaagttgg atataaaac 319

<210> 4  
<211> 15  
15 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Ser Pro Ala Leu Thr Glu Ser Leu Leu Val Ala Leu Pro Pro  
1 5 10 15

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo antiuroplaquina II o fragmento de unión a antígeno del mismo, producido por el hibridoma depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) bajo la designación de depósito de patente ACCT No. PTA-13181.
- 10 2. Procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal, según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:  
cultivar dicho hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal capaz de reconocer específicamente uroplaquina II;  
y  
10 permitir que dicho hibridoma produzca el anticuerpo monoclonal.
- 15 3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un polipéptido de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico seleccionada de un grupo que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.
- 20 4. Anticuerpo antiuroplaquina II o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a, como mínimo, un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ. ID NO: 4.
- 30 6. Composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1, 3, 4 ó 5 y, como mínimo, un anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del mismo para crear un cóctel de anticuerpos primarios.
- 35 7. Composición, según la reivindicación 6, en la que dicho, como mínimo, anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno seleccionado de un grupo que comprende GATA-3, p63, uroplaquina III, PAX8, NKX3.1, PSA, p40 y cualquier combinación de los mismos.
- 40 8. Composición, según la reivindicación 6, en la que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y dicho, como mínimo, anticuerpo adicional o fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a proteínas seleccionadas de un grupo que comprende:  
- uroplaquina II y GATA-3;  
- uroplaquina II y p63;  
- uroplaquina II y uroplaquina III;  
40 - uroplaquina II y PAX8;  
- uroplaquina II y NKX3.1;  
- uroplaquina II y PSA;  
- uroplaquina II y uroplaquina III y GATA-3;  
- uroplaquina II y PAX8 y PSA;  
45 - uroplaquina II y PAX8 y NKX3.1; y  
- uroplaquina II y p40.
- 50 9. Anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico seleccionada de un grupo que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 3.
- 55 10. Anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un polipéptido de secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 .
- 60 11. Anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a, como mínimo, un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 4.
- 65 12. Anticuerpo, según la reivindicación 1, 3, 4 ó 5, en el que dicho anticuerpo comprende un anticuerpo monoclonal.
13. Anticuerpo, según la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo monoclonal se selecciona de un grupo que comprende un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo monoclonal de conejo, un anticuerpo monoclonal de cabra, un anticuerpo monoclonal de caballo, un anticuerpo monoclonal de pollo, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo quimérico y cualquier combinación de los mismos.

14. Anticuerpo, según la reivindicación 1, 3, 4 ó 5, en el que dicho anticuerpo comprende un anticuerpo policlonal.

15. Utilización de un anticuerpo, según la reivindicación 1, 3, 4 ó 5 para el diagnóstico de cáncer en muestras de tejido.

5

16. Utilización de un anticuerpo, según la reivindicación 15, en el que el cáncer es carcinoma de células de transición.

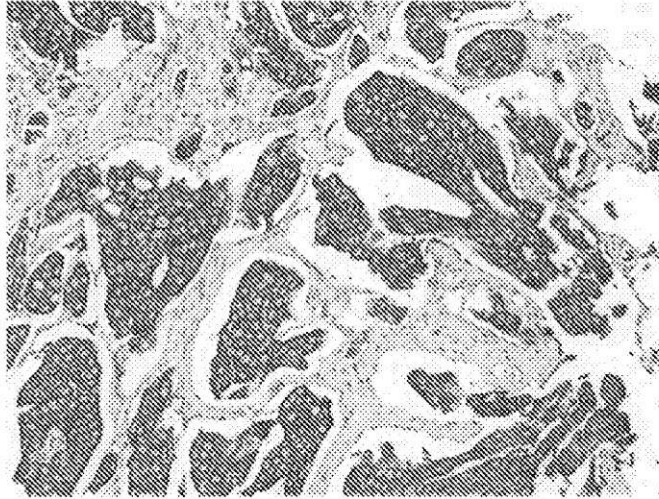


FIG. 1

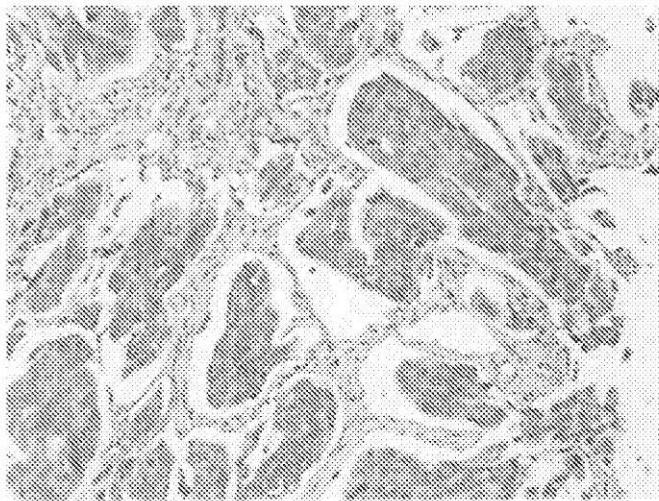


FIG. 2



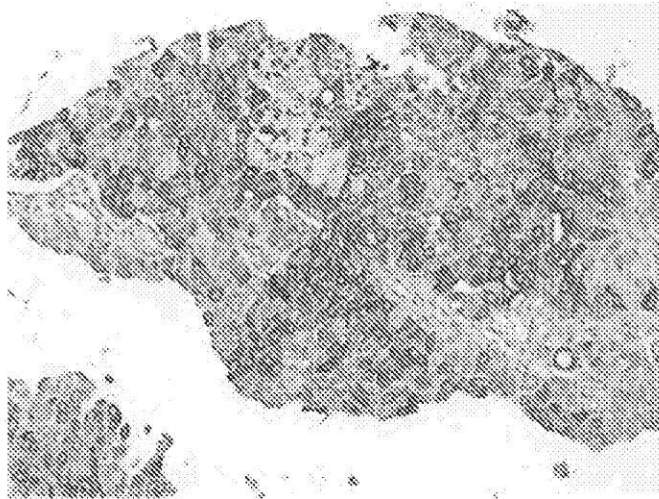


FIG. 3

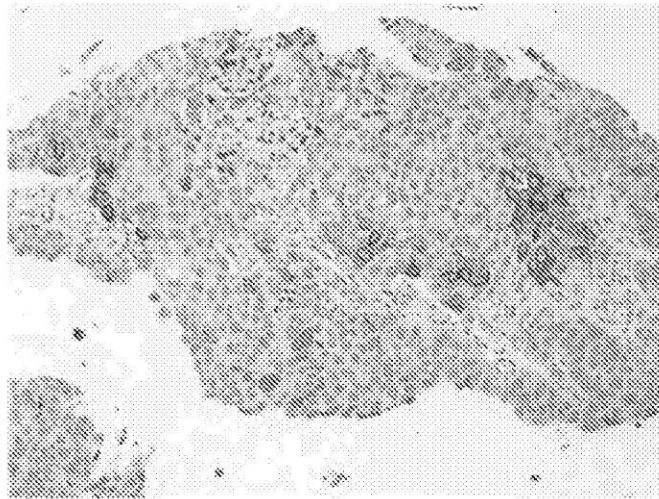


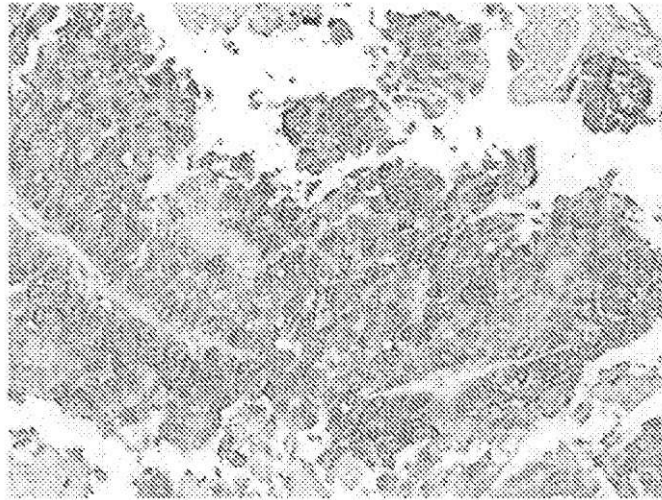
FIG. 4



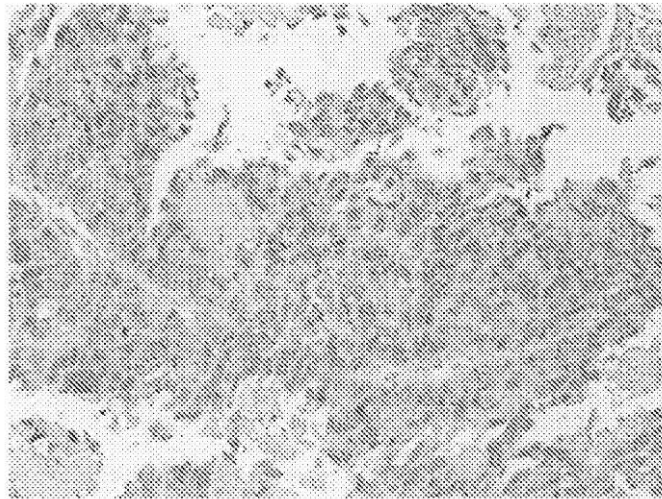
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**

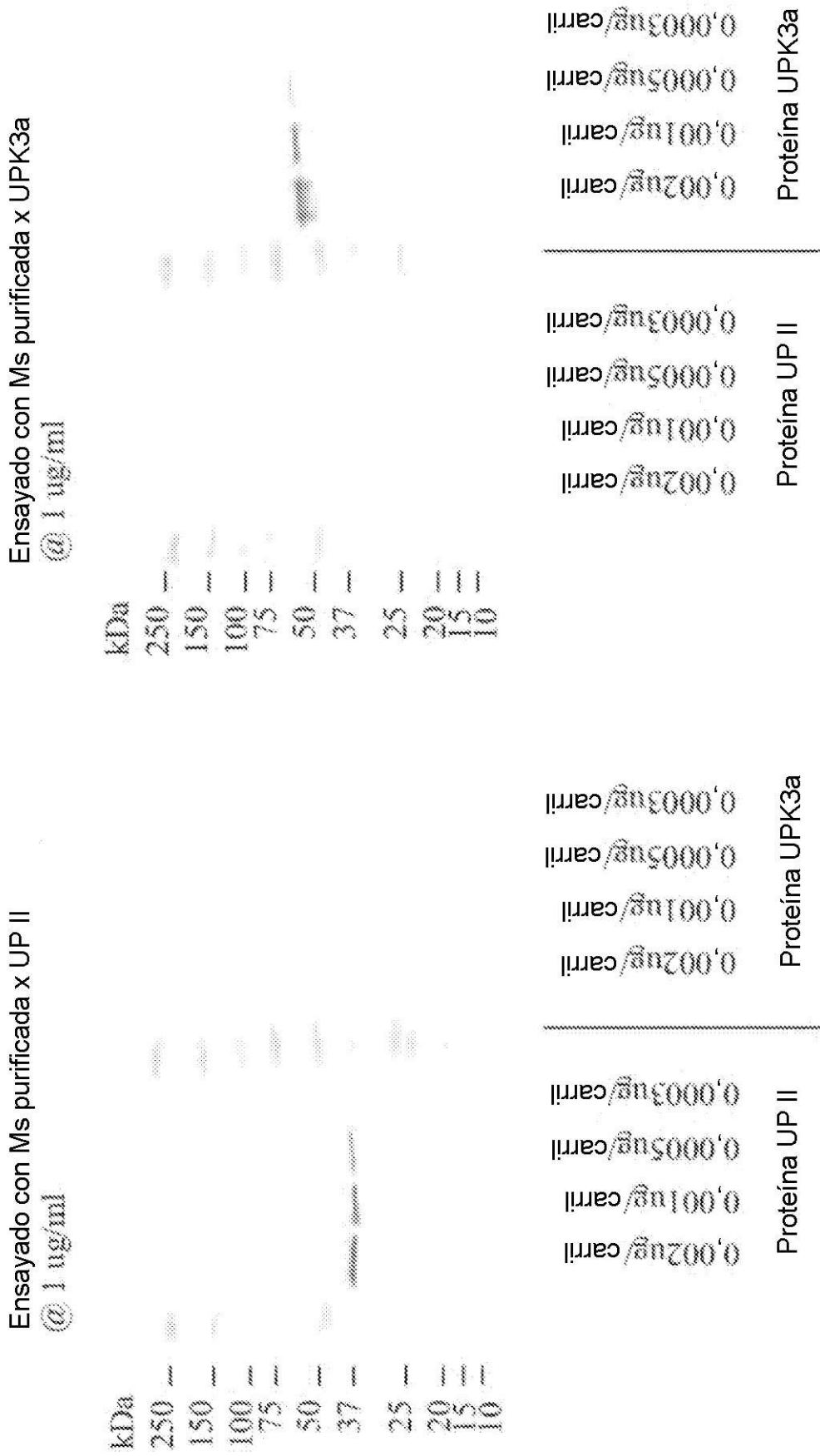
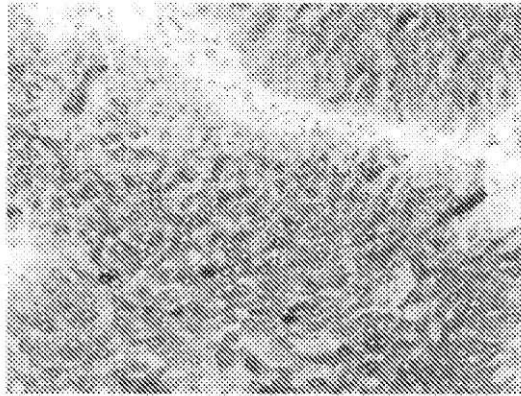
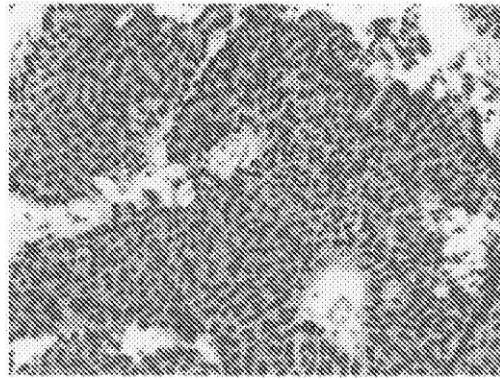


Fig. 9B

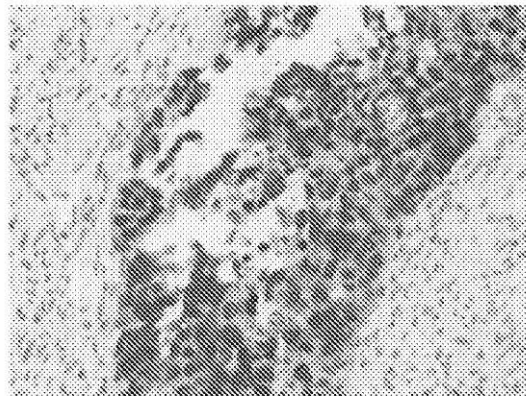
Fig. 9A



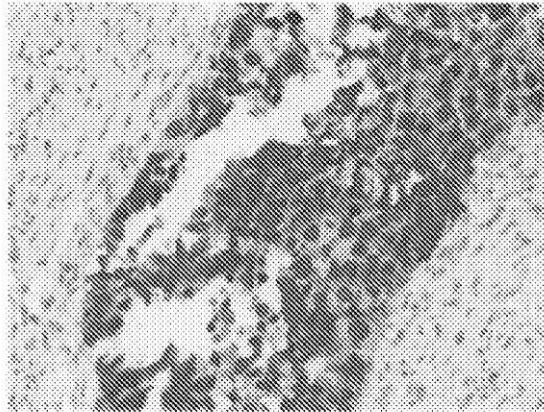
**FIG. 10**



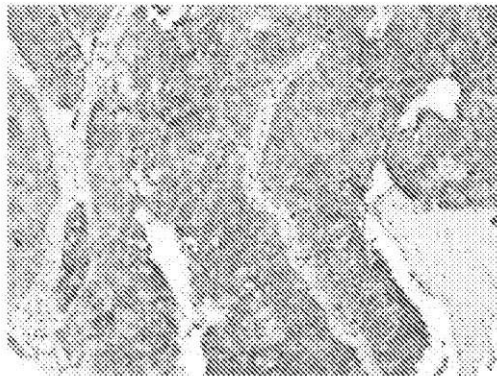
**FIG. 11**



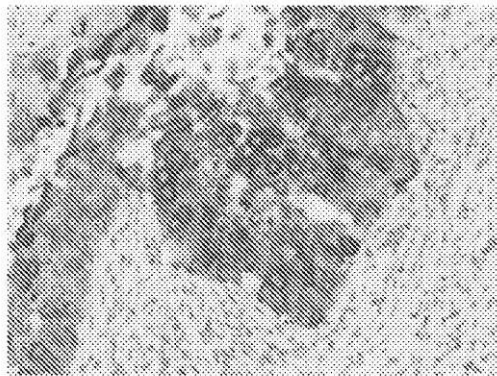
**FIG. 12**



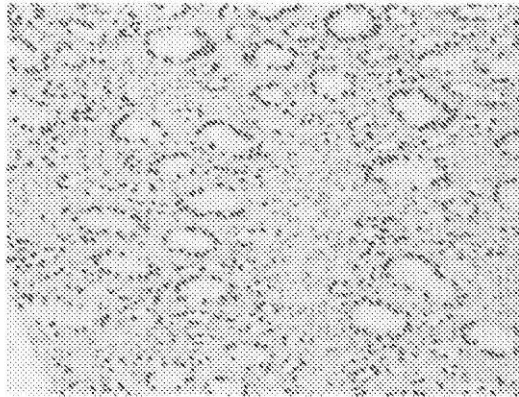
**FIG. 13**



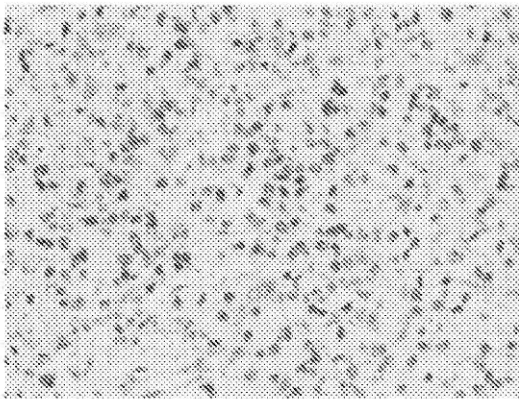
**FIG. 14**



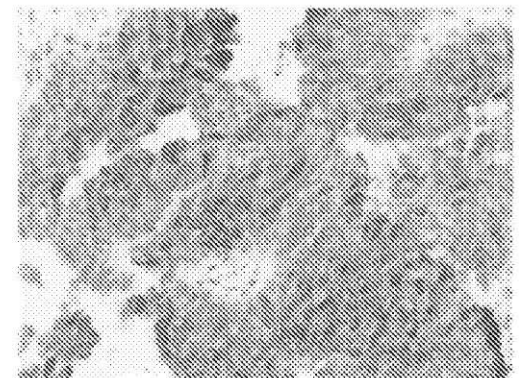
**FIG. 15**



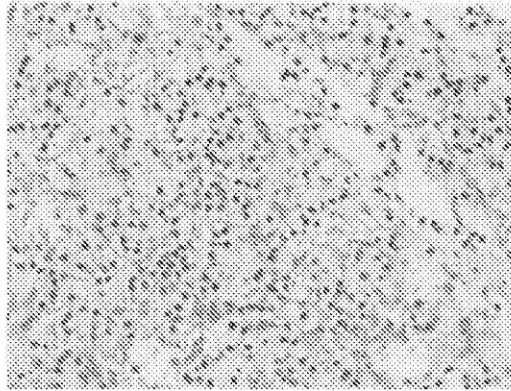
**FIG. 16**



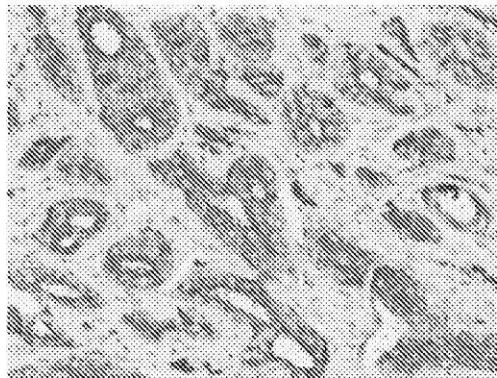
**FIG. 17**



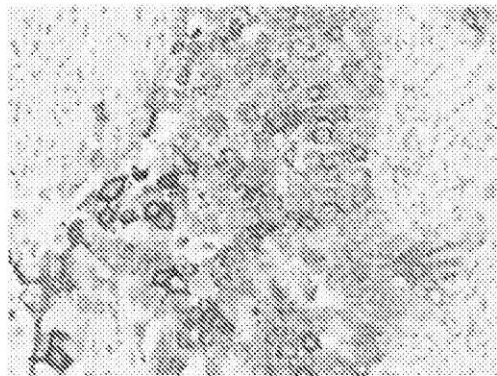
**FIG. 18**



**FIG. 19**



**FIG. 20**



**FIG. 21**



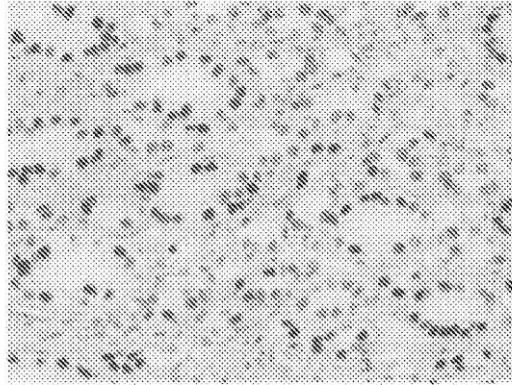


FIG. 22

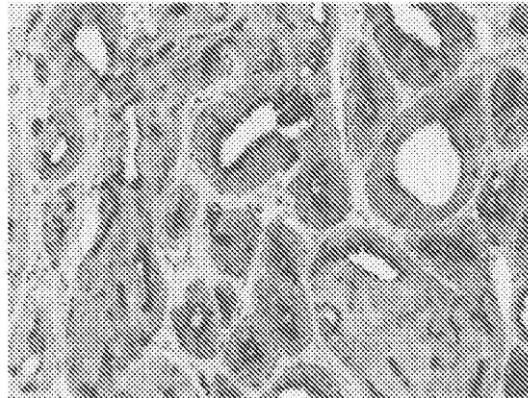
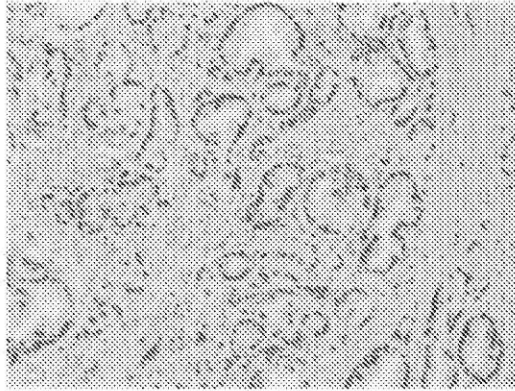


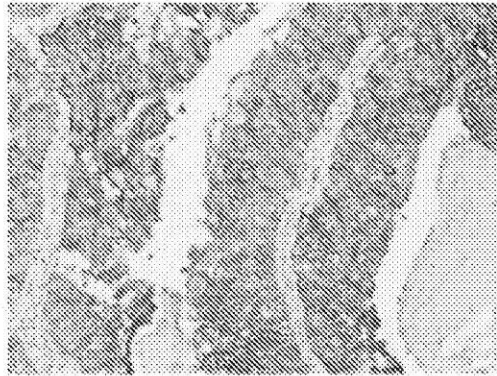
FIG. 23



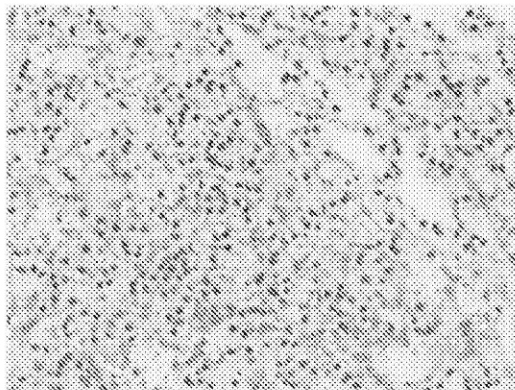
FIG. 24



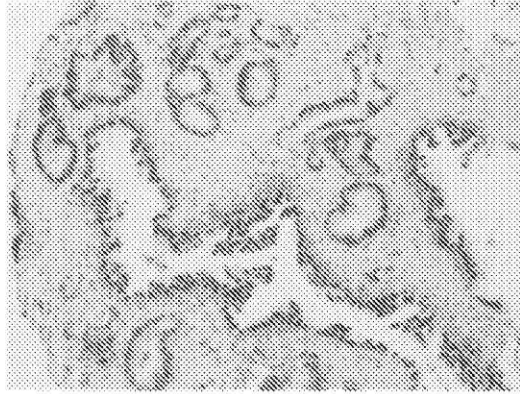
**FIG. 25**



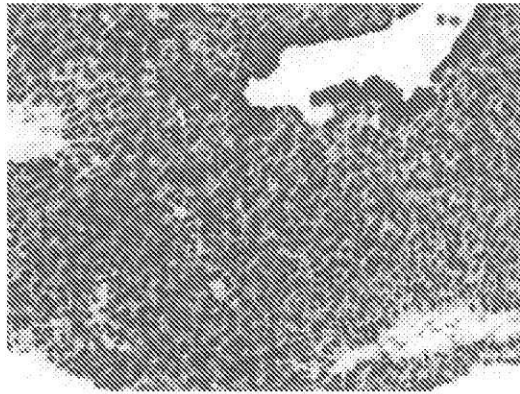
**FIG. 26**



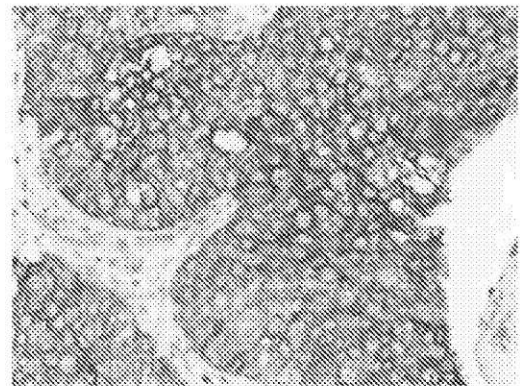
**FIG. 27**



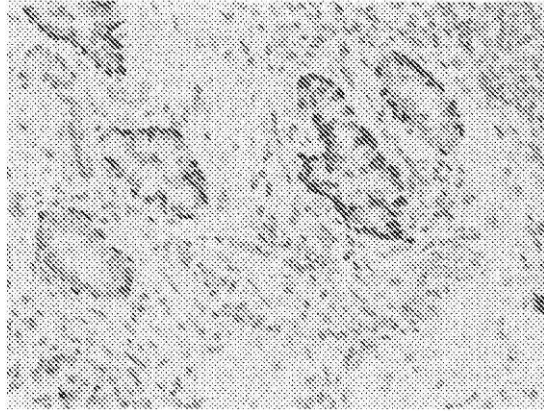
**FIG. 28**



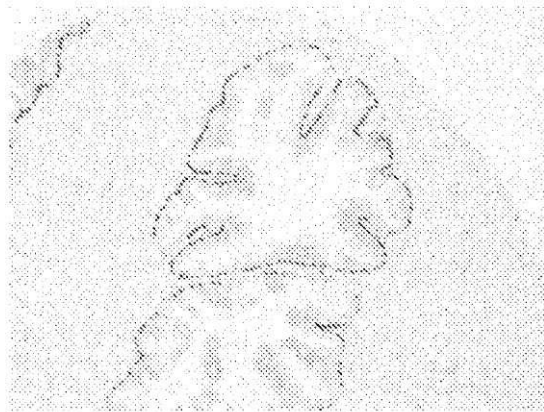
**FIG. 29**



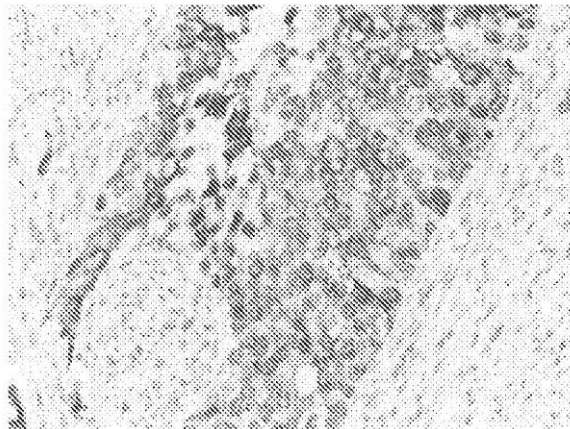
**FIG. 30**



**FIG. 31**



**FIG. 32**



**FIG. 33**

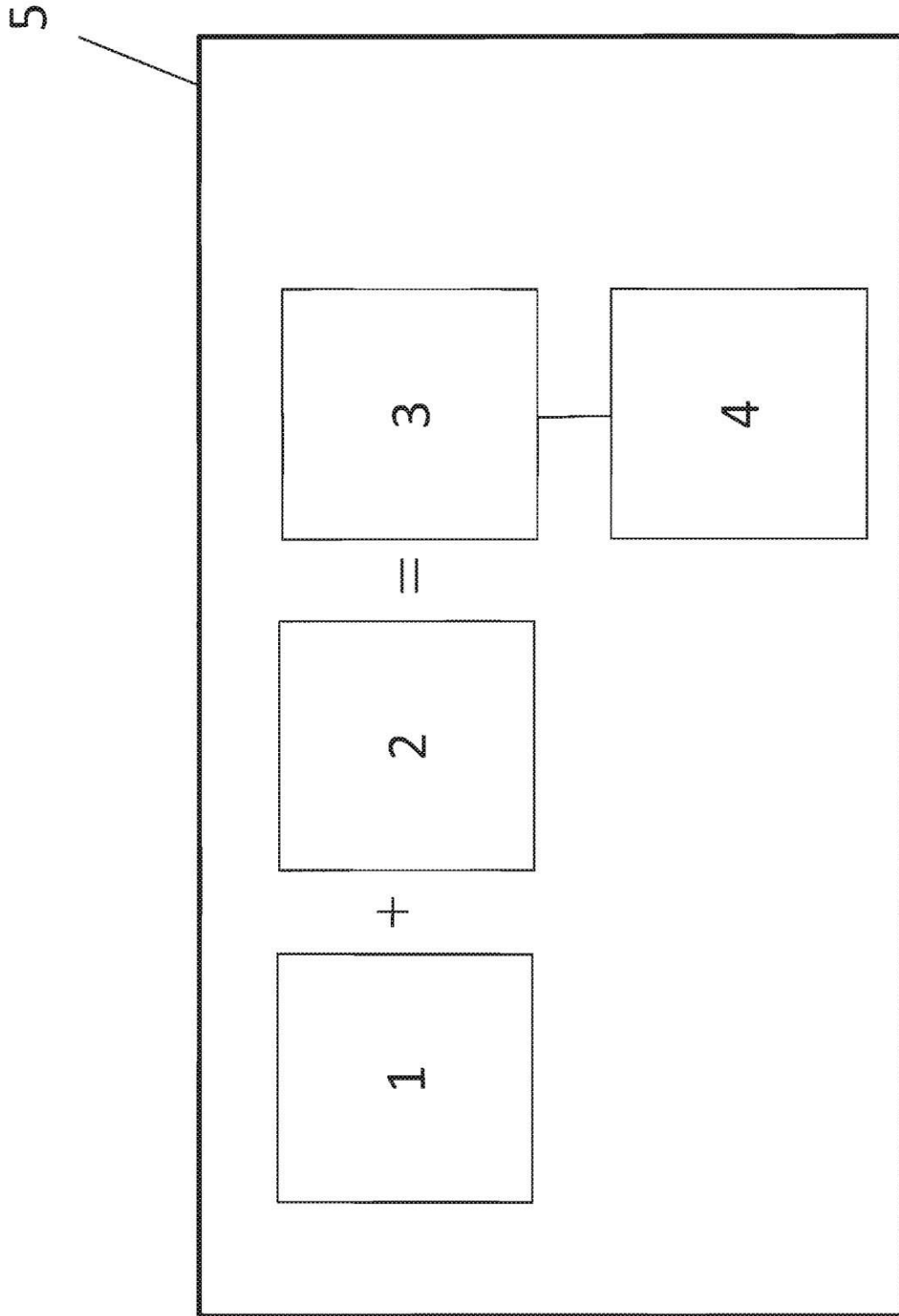


Fig. 34

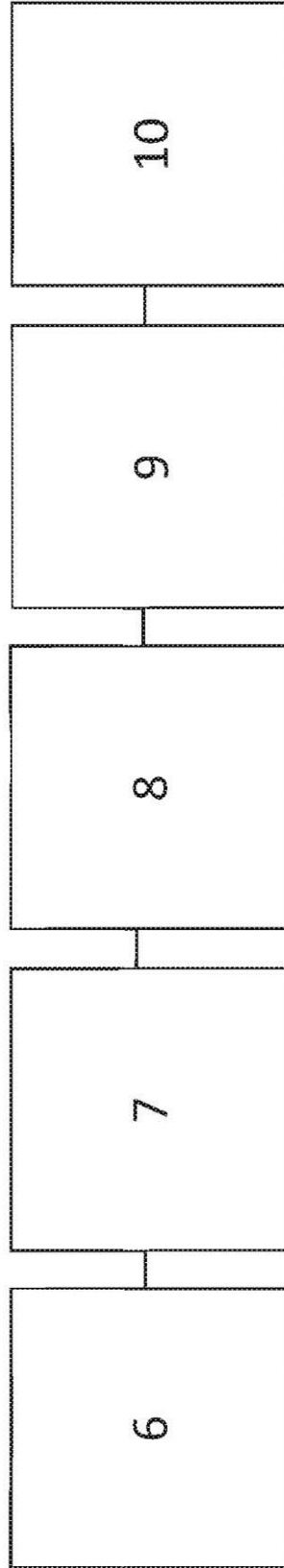
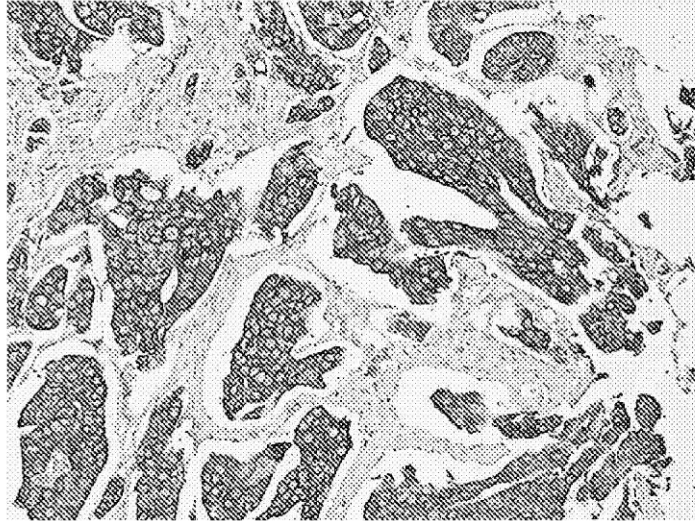
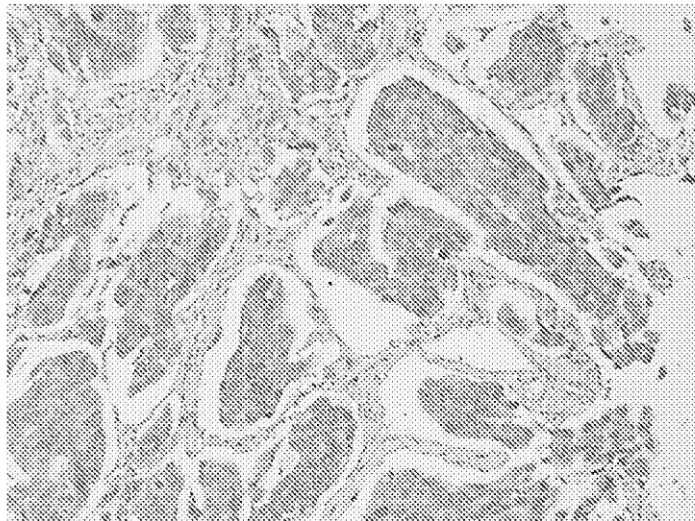


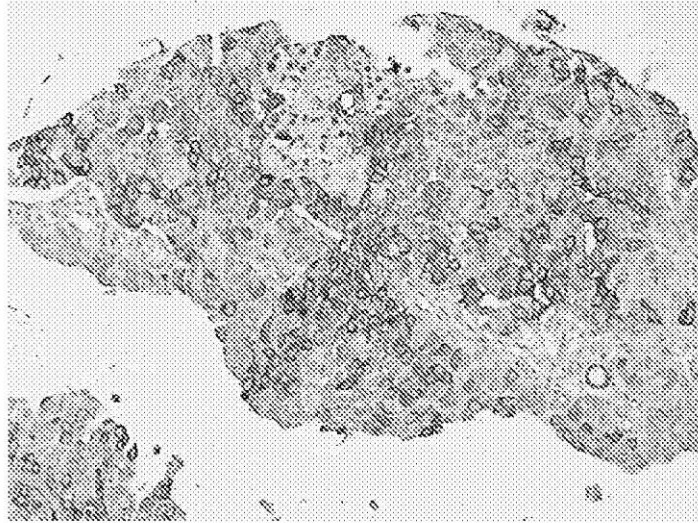
Fig. 35



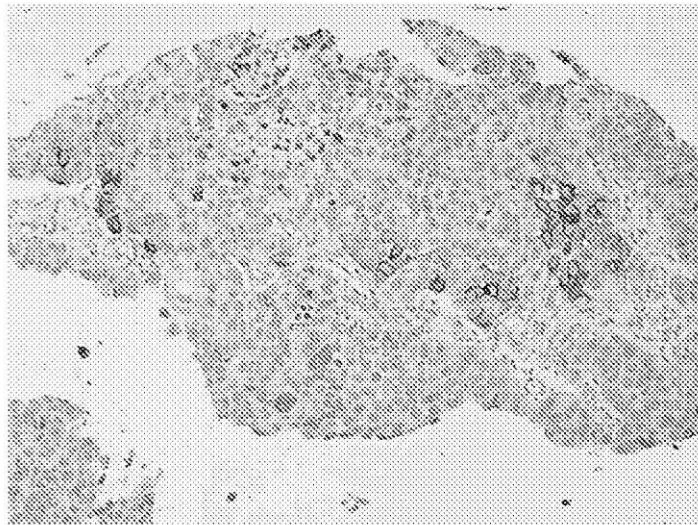
**FIG. 36**



**FIG. 37**

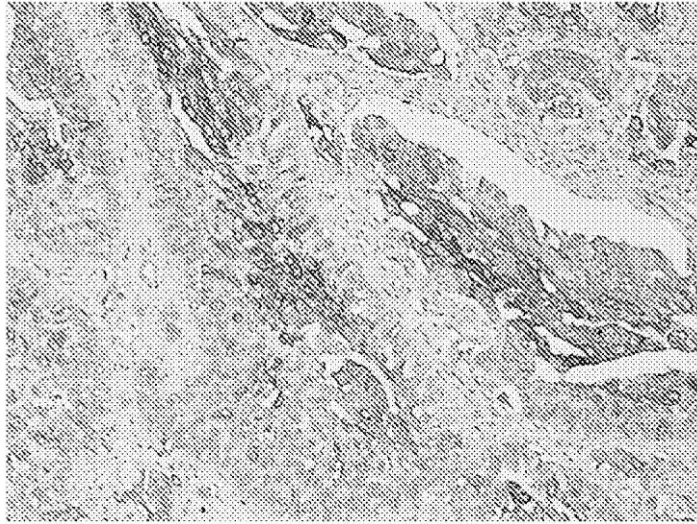


**FIG. 38**



**FIG. 39**

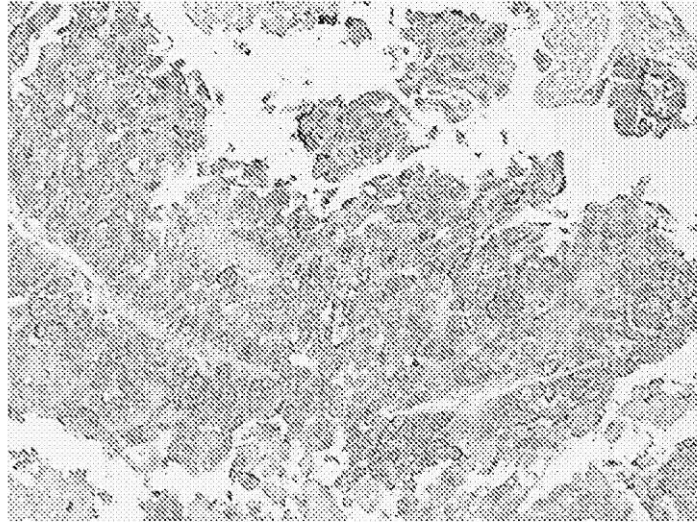




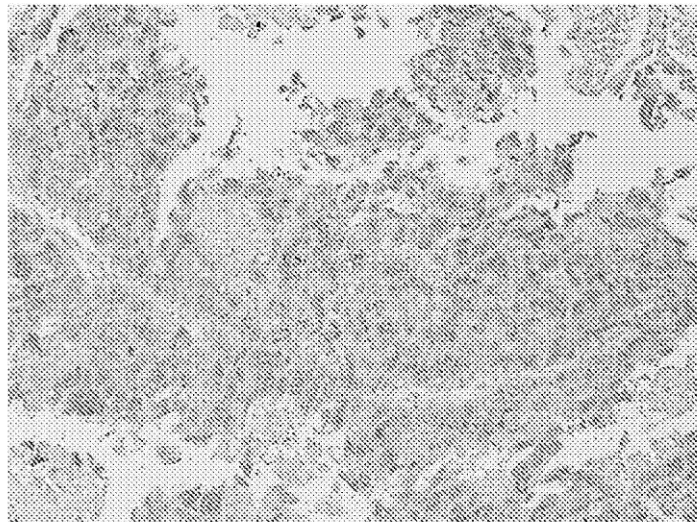
**FIG. 40**



**FIG. 41**



**FIG. 42**



**FIG. 43**

Ensayado con Ms purificada x UPK3a  
@ 1 ug/ml

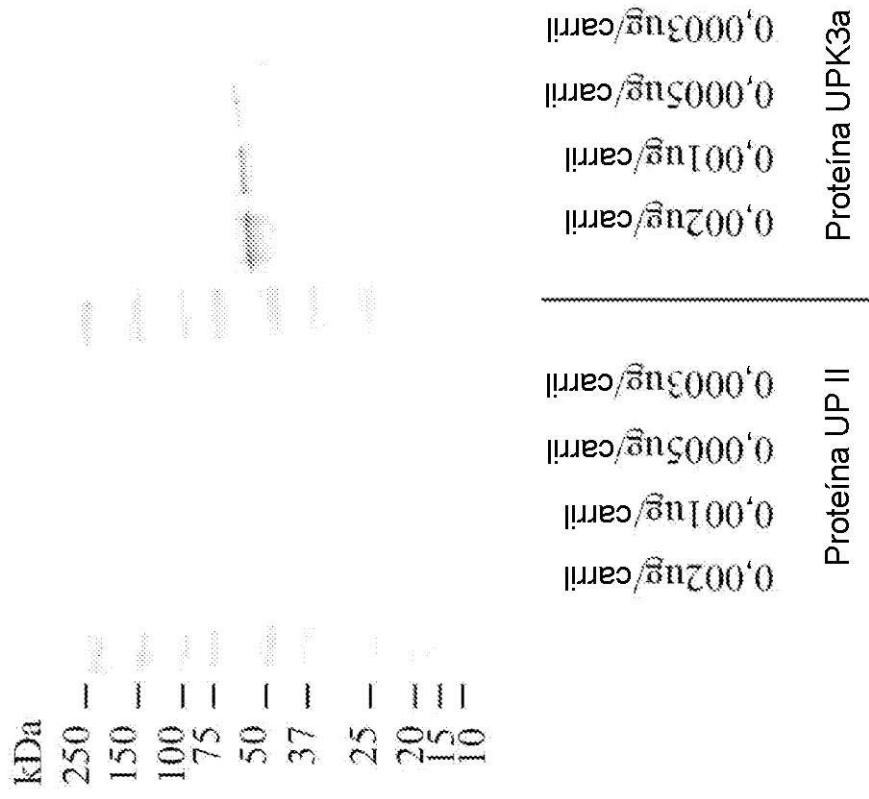


FIG. 44B

Ensayado con Ms purificada x UPII  
@ 1 ug/ml

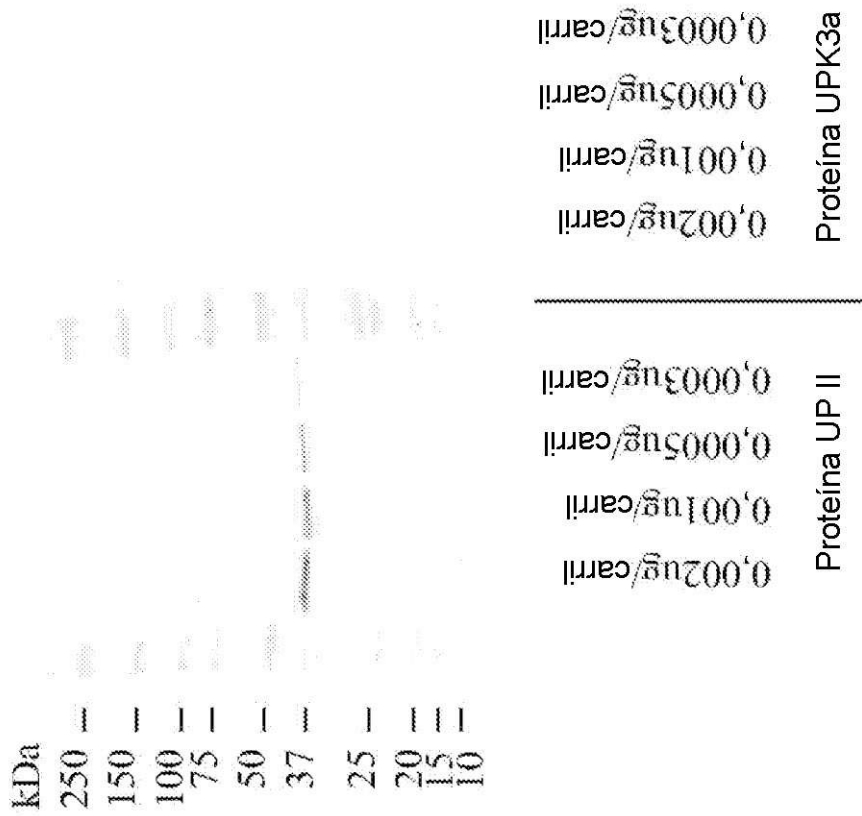
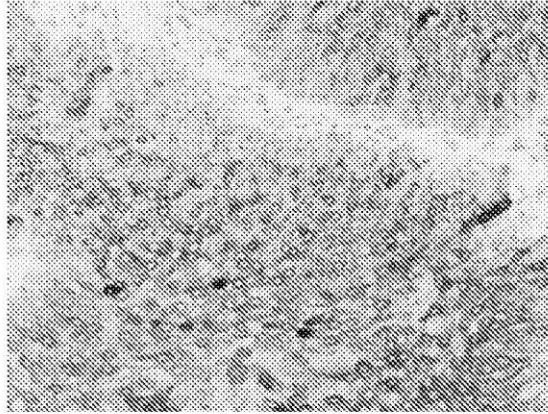
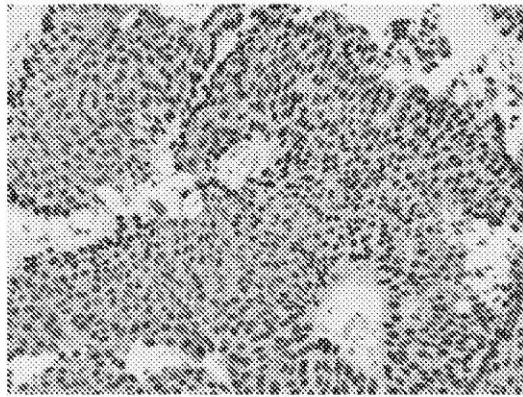


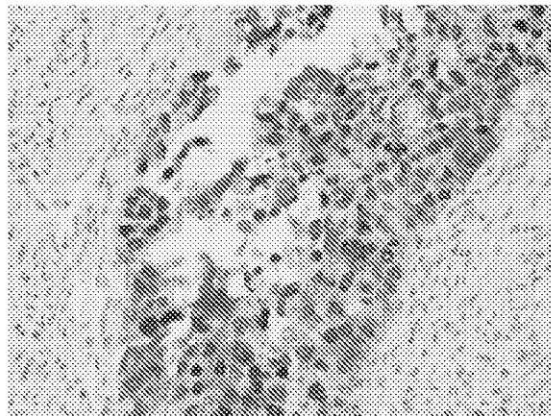
FIG. 44A



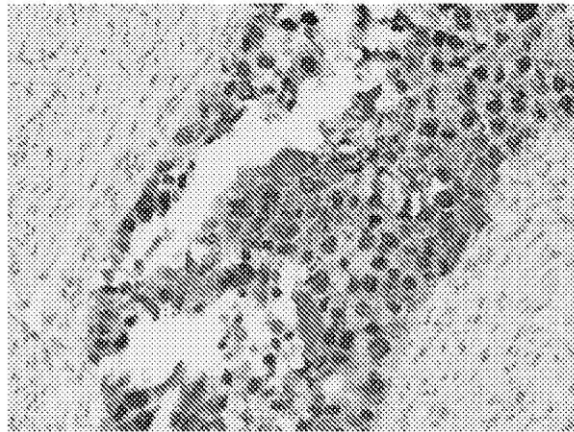
**FIG. 45**



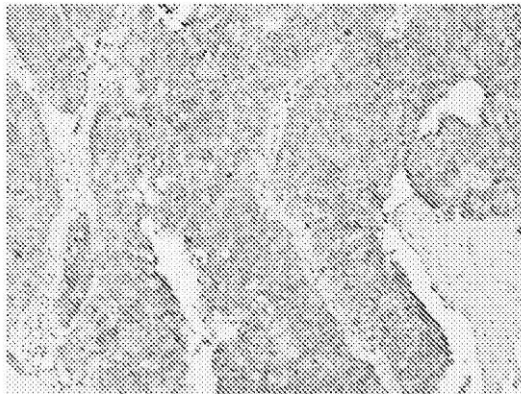
**FIG. 46**



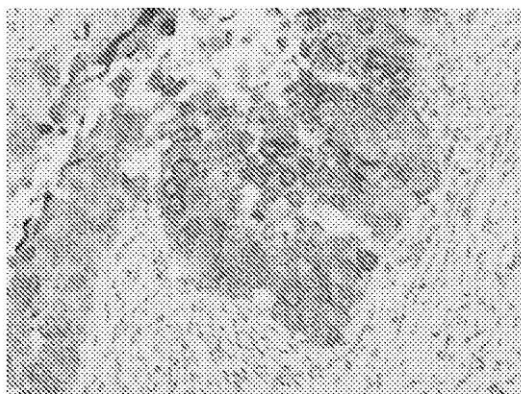
**FIG. 47**



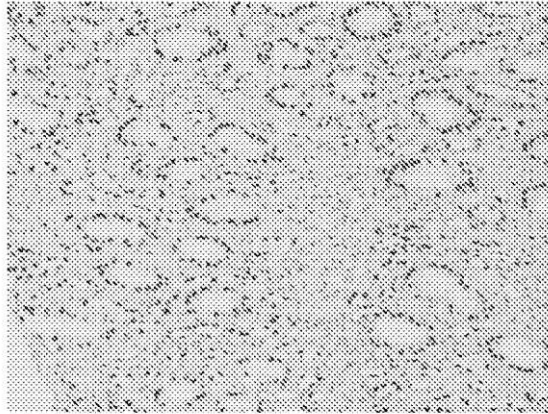
**FIG. 48**



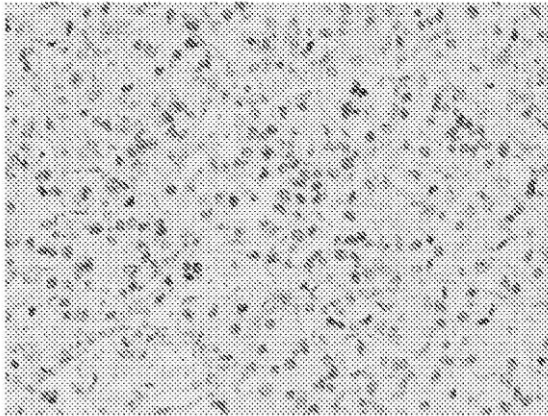
**FIG. 49**



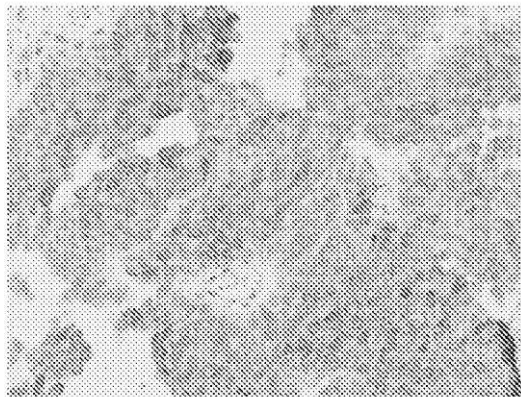
**FIG. 50**



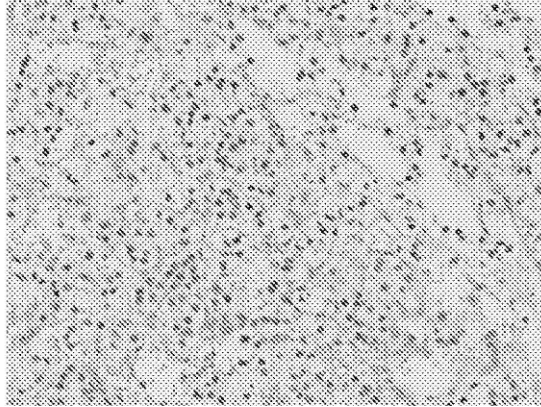
**FIG. 51**



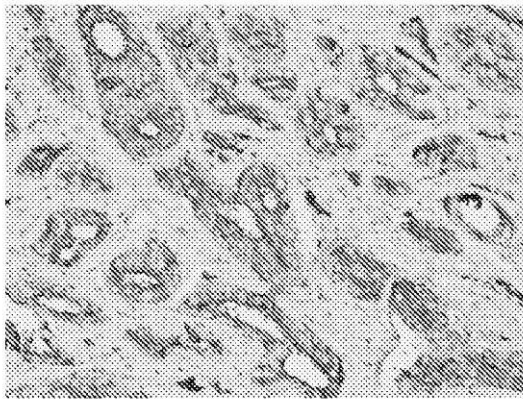
**FIG. 52**



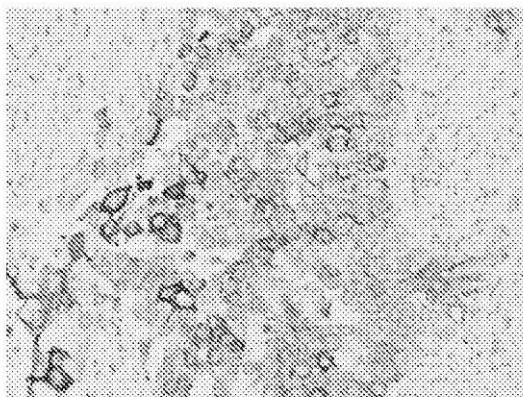
**FIG. 53**



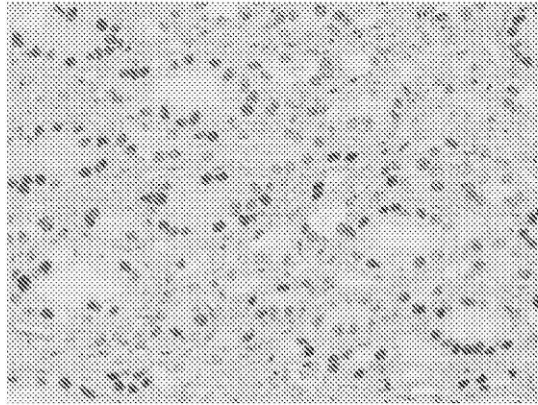
**FIG. 54**



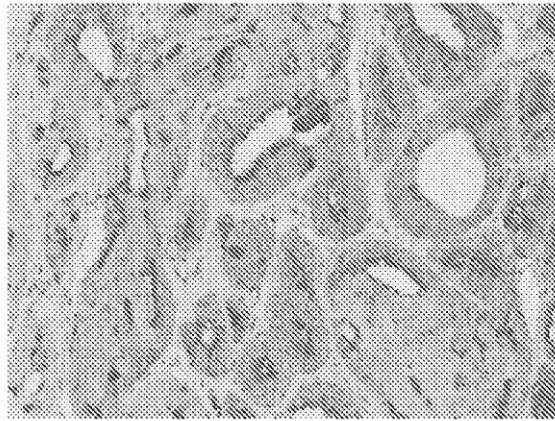
**FIG. 55**



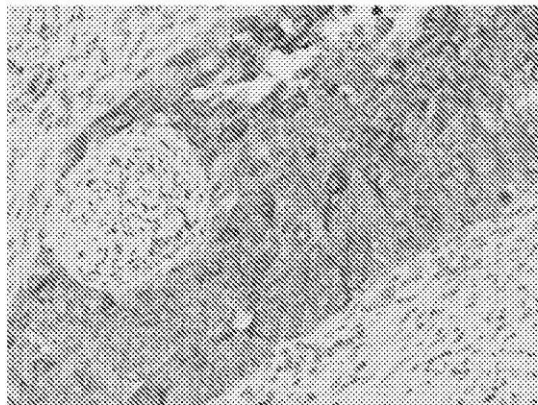
**FIG. 56**



**FIG. 57**

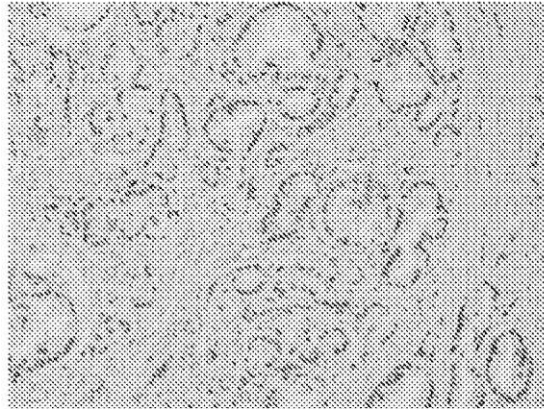


**FIG. 58**

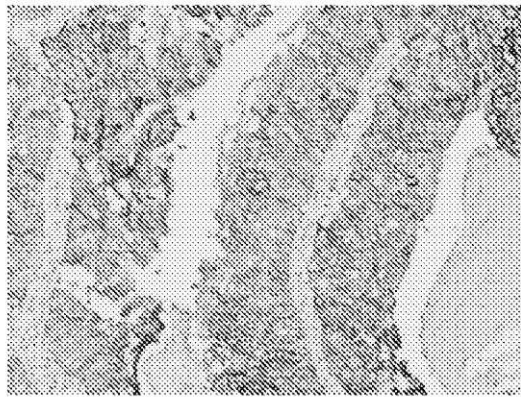


**FIG. 59**

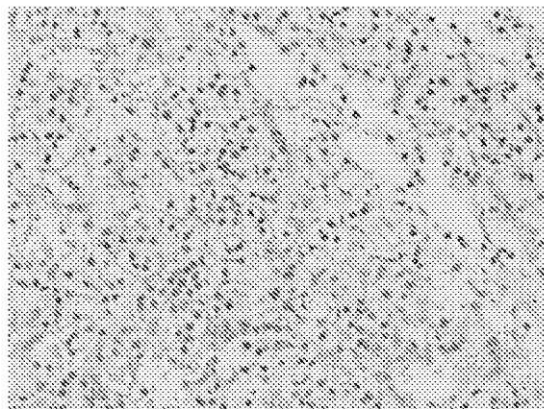




**FIG. 60**



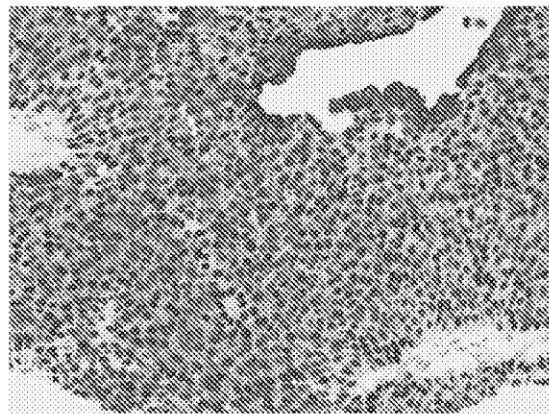
**FIG. 61**



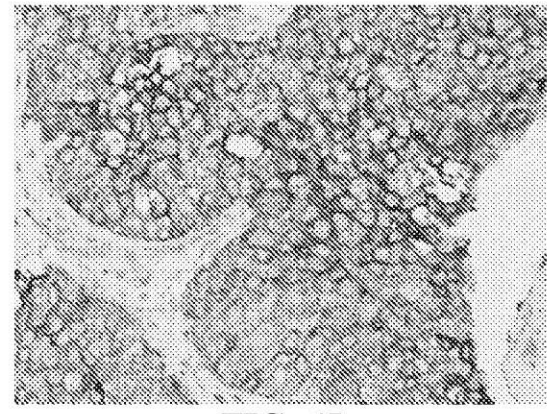
**FIG. 62**



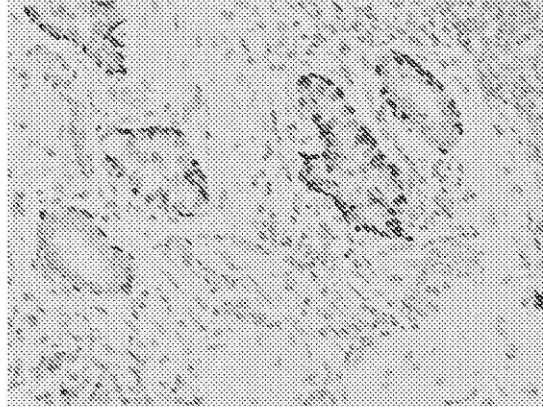
**FIG. 63**



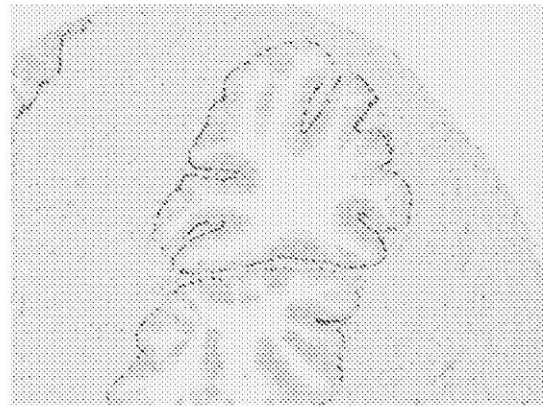
**FIG. 64**



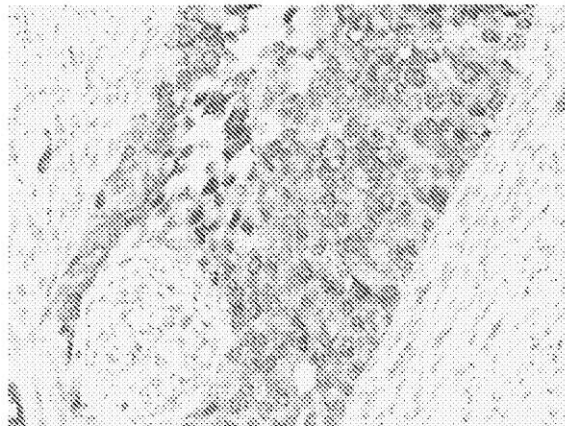
**FIG. 65**



**FIG. 66**



**FIG. 67**



**FIG. 68**