

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 107**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2017 PCT/IB2017/051628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2017 WO17163179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2017 E 17721837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3433617**

54 Título: **Método para la evaluación cuantitativa en una muestra biológica de la forma fosforilada y no fosforilada de RKIP**

30 Prioridad:

21.03.2016 IT UA20161850

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

16.07.2020

73 Titular/es:

**FLUIDIA S.R.L. (100.0%)
Viale Giovanni Gentile 30
71122 Foggia, IT**

72 Inventor/es:

PAPALE, MASSIMO

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 774 107 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la evaluación cuantitativa en una muestra biológica de la forma fosforilada y no fosforilada de RKIP

5

La presente invención se refiere a un método para la evaluación cuantitativa única o combinada, en orina u otra muestra biológica, de una forma fosforilada y no fosforilada de una proteína llamada inhibidor de la cinasa RAF (RKIP, (por sus siglas en inglés).

Campo de la invención

10

Las mejoras en genómica, proteómica y patología molecular han producido muchos biomarcadores candidatos con un posible valor clínico, que de todos modos no se usan de manera rutinaria principalmente debido a una fuerte separación de enfoque y visión entre la investigación académica y la investigación de las industrias biotecnológicas, lo cual limita su colaboración.

15

La fuerte diferencia entre el número de posibles biomarcadores y sus pruebas desarrolladas que han llegado al mercado se puede apreciar llevando a cabo, a través del motor de búsqueda pubmed, un análisis comparativo entre los biomarcadores descritos en los principales fluidos biológicos y las pruebas actualmente disponibles en el mercado. Al ingresar palabras clave como biomarcadores y suero, aparecen más de un centenar de publicaciones en pubmed, de las cuales más de 7000 son revistas. Lo mismo ocurre con las orinas descritas como fluido biológico ideal para la investigación de biomarcadores patológicos del sistema urogenital en más de 21.000 publicaciones, de las cuales alrededor de 2.800 son revistas. La mayoría de los biomarcadores en suero y orina, descritos en la bibliografía, son de naturaleza proteínica (más de 75000 trabajos originales, de los cuales 5.000 son revistas de suero y alrededor de 10.000 trabajos originales y 1.400 revistas para la orina). Si se consideran solo los biomarcadores en suero y orina asociados con el cáncer, el número de trabajos científicos originales se reduce a aproximadamente 30.000 para los biomarcadores en suero y aproximadamente 4.500 para los de orina. Incluso si estos números tienen que considerarse de manera aproximada, debido a que, obviamente, para algunos biomarcadores muy estudiados hay cientos de publicaciones que describen su aplicación en diversos campos y para diferentes objetivos, es sorprendente que actualmente sólo haya 100 pruebas ELISA disponibles en el mercado, relacionadas con la mayor cantidad de biomarcadores tumorales aprobados para uso diagnóstico, pronóstico y/o predictivo de varias neoplasias. Recientemente Powers et al. han destacado que, en comparación con el ADN y transcripciones, las proteínas representan todavía, al día de hoy, moléculas capaces de describir con mayor precisión un fenotipo sano y/o patológico de un individuo, ya que son los efectores finales los cuales regulan los procesos celulares.

35

En particular, la bibliografía reciente informa un papel cada vez más importante para la proteína inhibidora de la cinasa Raf (RKIP) entre los marcadores tumorales. RKIP se expresa ampliamente en muchos tejidos (sobre todo testículos, cerebro, epidídimo, hígado y riñones) durante la edad de desarrollo. Se ha descrito RKIP en asociación con muchos tumores y se ha introducido en una nueva clase de proteínas, los supresores de metástasis, ya que su regulación negativa generalmente se correlaciona con un mayor riesgo de metástasis.

40

La reducción de RKIP se ha descrito en casi todos los tumores y, en particular, se ha correlacionado con la supervivencia a medio y largo plazo y con la aparición de recaídas en cáncer de próstata, colorrectal, y de mama, en melanoma, insulinoma, carcinoma hepatocelular, en cáncer de tiroides anaplásico y en carcinoma de células renales. Por lo tanto, RKIP se considera un biomarcador de pronóstico que cuanto más bajos son sus niveles de expresión, más agresivo e invasivo es el tumor. RKIP se puede encontrar en forma libre no fosforilada o en una forma fosforilada que media su dimerización y cambia también sus dianas moleculares intracelulares. Recientemente, la atención de muchos investigadores se ha centrado en la forma fosforilada de RKIP (p-RKIP) que, en algunos casos, muestra una capacidad de pronóstico mayor que la de la forma no fosforilada RKIP. Este papel se ha descrito para el cáncer de pulmón, cáncer de mama, melanoma y más recientemente para el carcinoma nasofaríngeo.

50

Los estudios efectuados hasta ahora se han concentrado en la evaluación tisular de los niveles de expresión de RKIP y p-RKIP utilizando principalmente técnicas inmunohistoquímicas. Incluso si esta técnica representa uno de los análisis más difundidos en el diagnóstico molecular, tiene algunas importantes limitaciones, tal como por ejemplo, la necesidad de obtener tejido mediante análisis invasivo como, por ejemplo, biopsia, y generalmente un valor semicuantitativo debido a la interpretación subjetiva de resultados, determinando la variabilidad entre centros. Debido a que para esta técnica, incluso si es ampliamente aceptada en los centros clínicos de todo el mundo, aún existe la necesidad de normalizar los procedimientos utilizados para la preparación de muestras, la ejecución del análisis y la interpretación de los resultados, está claro que la dosificación cuantitativa de RKIP y p-

60

RKIP necesita un enfoque diferente, aún no disponible hasta ahora.

La técnica ELISA (Inmunoensayo Ligado a Enzimas) es un método de análisis inmunológico, ampliamente utilizado en bioquímica para detectar la presencia de una sustancia mediante el uso de uno o más anticuerpos, a uno de los cuales se une una enzima: dicho método de análisis pertenece a las pruebas inmunoenzimáticas y se usa principalmente en inmunología para detectar y/o dosificar la presencia de proteínas, anticuerpos o antígenos en la muestra.

Al igual que la inmunohistoquímica y la citofluorimetría, ELISA es capaz de analizar más marcadores con alta sensibilidad y especificidad, al mismo tiempo. Existen pruebas ELISA de múltiples proteínas capaces de medir también varios marcadores al mismo tiempo, un ejemplo de las mismas es la prueba ELISA que al medir los niveles séricos de 6 marcadores es capaz de identificar el cáncer de ovarios con una sensibilidad y especificidad del 95,3 % y 99,4 %, respectivamente. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran su naturaleza cuantitativa, la rapidez de ejecución y la aplicación preferida para fluidos biológicos, lo cual se asocia con una menor invasividad en el muestreo y, como consecuencia, una mayor aceptación por parte del paciente.

Incluso si en el mercado existen pruebas ELISA que miden los niveles de RKIP, tienen la evaluación de RKIP en extractos de proteínas celulares como indicación principal de uso. Además, hasta ahora no está disponible en el mercado una prueba ELISA específica para determinar la dosis cuantitativa de p-RKIP. Finalmente, incluso si muchas compañías proporcionan pruebas ELISA útiles para la dosificación combinada de proteínas específicas en forma fosforilada y no fosforilada, no hay ninguna prueba en el mercado, capaz de medir simultáneamente RKIP/p-RKIP por este método. En el estado de la técnica, existen ejemplos de evaluación conocidos por medio de análisis de transferencia Western de la expresión de RKIP y p-RKIP, que de todos modos tienen limitaciones que los hacen no repetibles y/o no cuantitativos.

Un primer ejemplo se describe en VENERA CARDILE et. Al: "Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and phospho-RKIP expression in melanomas" (ACTA HISTOCHEMICA, vol. 115, n.º 8 - 2013 - pág. 795-802). En la sección "transferencia Western" se afirma que la expresión de RKIP y pRKIP se ha evaluado mediante análisis de transferencia Western de melanocitos WM35, mediante un método que usa anticuerpos policlonales obtenidos por un conejo y el cual conduce a valores no cuantitativos, expresados como *unidades densitométricas arbitrarias*. En la patente WO2011/058136 se describe un método para medir proteínas en muestras biológicas, el cual utiliza un reactivo de calibración capaz de reconocer un epítipo de interés. En el método descrito, el reactivo de calibración comprende: un péptido que contiene un epítipo de interés fosforilado de entre 12 y 25 aminoácidos de longitud; un enlazador (péptido de entre 2 y 10 aminoácidos); una proteína transportadora la cual está unida a la matriz. En el método descrito en la patente 2011/058136, para detectar la curva patrón de calibración, el reactivo de calibración se une primero a los diversos pocillos de la matriz con una pluralidad de concentraciones conocidas y después se añade un segundo reactivo detectable que es afín al reactivo de calibración. Después, es medida la densidad óptica de la señal para cada concentración del reactivo de calibración.

En este momento, para medir la presencia de una proteína en una muestra biológica, se unen una o más muestras biológicas a los pocillos de la matriz y se añade un anticuerpo, que es afín a la proteína a detectar. A continuación, se mide la densidad óptica de la señal y es comparada con las densidades ópticas medidas para la curva patrón.

El método recién descrito presenta algunos inconvenientes técnicos: de hecho, cuando la muestra biológica es añadida directamente a una placa de microtitulación ELISA, como se sugiere, la presencia, en la muestra, de una pluralidad de proteínas (cuyo tipo y cantidad no se conocen) determina una competencia entre los mismos para unirse a la superficie del pocillo. Por lo tanto, suponiendo aplicar este método a la dosificación de RKIP y p-RKIP, siempre que estas proteínas estén presentes en la muestra biológica en trazas con respecto a otras proteínas más representadas, ni siquiera podrían unirse al pocillo. De cualquier modo, en particular para la cantidad de RKIP fosforilada (p-RKIP) que generalmente representa menos del 1 % de la cantidad de RKIP, las cantidades bien unidas son tan bajas que el método no es reproducible. Además, el método conocido en el estado de la técnica posee una limitación vinculada a la posibilidad de reacciones cruzadas. De hecho, la presencia hipotética en la muestra de una proteína distinta de RKIP y pRKIP, y que aún contenga una secuencia (epítipo) muy similar a la presente en RKIP y p-RKIP y reconocida por el anticuerpo añadida a la muestra biológica para la detección, podría producir una señal específica no distinguible por la señal producida por RKIP y p-RKIP. Por lo tanto, la identidad de una sola secuencia de aminoácidos es suficiente para producir un positivo falso.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método cuantitativo para medir la forma fosforilada de la proteína RKIP (p-RKIP) en una muestra biológica.

De acuerdo con otro objetivo, la presente invención proporciona un método cuantitativo para medir la

proteína RKIP en su forma fosforilada y no fosforilada, en una muestra biológica. De acuerdo con otro objetivo, la presente invención proporciona una nueva prueba ELISA, específica para la dosificación cuantitativa de RKIP en forma no fosforilada (RKIP) y fosforilada (p-RKIP) en una muestra biológica para obtener la medición cuantitativa de cada forma y la relación entre ellas.

5 No obstante, otro objetivo de la invención es proporcionar un par de péptidos recombinantes patrón utilizables para la detección de la curva de calibración tanto de RKIP como de p-RKIP, por medio del enlace al mismo anticuerpo de captura y al mismo anticuerpo trazador utilizado para la detección de RKIP y p-RKIP en la muestra biológica a probar, respectivamente, de modo que se incremente la sensibilidad y especificidad del método.

10 No obstante, la presente invención proporciona un método para dosificar de manera cuantitativa RKIP y p-RKIP en una muestra biológica, en la cual prácticamente no hay posibilidades de obtener señales específicas producidas por proteínas distintas de RKIP y p-RKIP. El método propuesto también permite unir selectivamente las proteínas de interés a los pocillos de placas de microtitulación ELISA, después de la adición de un anticuerpo de captura, de modo que la muestra se enriquezca y se puedan reproducir las mediciones.

15 De acuerdo con otro objetivo más, la presente invención proporciona una prueba ELISA la cual, midiendo los niveles en orina de RKIP y p-RKIP individualmente y/o en combinación, permite obtener el diagnóstico y/o pronóstico de carcinoma de células renales.

20 La invención cumple los objetivos prefijados ya que es un método para la medición cuantitativa de la proteína RKIP y de la proteína p-RKIP en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) recubrir con dos soportes distintos: a1) un anticuerpo que reconoce una primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP y a2) un anticuerpo que reconoce una primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP;

25 b) añadir una solución de bloqueo a ambos soportes,

c) añadir la muestra biológica;

d) añadir, en los respectivos soportes d1) un anticuerpo que reconoce una segunda secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP y d2) un anticuerpo que reconoce una segunda secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP, siendo una de dichas secuencias de aminoácidos primera y segunda común entre RKIP y p-RKIP, y siendo la otra una secuencia que contiene la fosforilación de la serina 153, y por lo tanto, diferente para p-RKIP y RKIP;

30 e) añadir un marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas proporcional a la cantidad de dicho anticuerpo unido a dicha segunda secuencia de aminoácidos, cuando está en contacto con dicho anticuerpo que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos;

f) medir una propiedad óptica de las dos muestras y compararla con una curva de calibración obtenida midiendo la misma propiedad óptica de dos series de soportes, en los cuales se han añadido, en el orden:

40 i) un anticuerpo que reconoce dicha primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP para la primera de dichas series y dicha primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP para la segunda de dichas series

ii) una solución de bloqueo

45 iii) cantidades conocidas y crecientes de un patrón híbrido recombinante que comprende dichas secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína p-RKIP para la primera de dichas series y dichas secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína RKIP para la segunda de dichas series;

iv) anticuerpos que reconocen específicamente dicha segunda secuencia de aminoácidos presente en p-RKIP o dicha segunda secuencia presente en RKIP, respectivamente;

50 v) un marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas proporcional a la cantidad de dicho anticuerpo unido a dicha segunda secuencia de aminoácidos, cuando está en contacto con dicho anticuerpo que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos.

De acuerdo con una primera preferida realización, el método puede realizarse utilizando una placa de microtitulación ELISA.

55 En una segunda realización preferida, el método puede realizarse mediante un ensayo de inmunocromatografía de flujo lateral. En este caso, los soportes son cartuchos cromatográficos, la muestra es añadida al papel absorbente en un extremo del cartucho, el anticuerpo el cual reconoce la primera de dichas secuencias de aminoácidos recubre una región del cartucho cromatográfico distal al papel absorbente y el anticuerpo que reconoce dichas segundas secuencias de aminoácidos está en una porción de la superficie cromatográfica en una región próxima al papel absorbente.

Además, preferiblemente pero no de manera limitativa, en el caso de usar una placa de microtitulación ELISA, se pueden añadir proporcionalmente dichos anticuerpos que reconocen dichas segundas secuencias de aminoácidos (tanto para medir en una muestra biológica como para determinar la curva de calibración), anticuerpos conjugados con HRP específicos para dichos anticuerpos y un cromógeno (TMB) como marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas cuando está en contacto con dicho anticuerpo HRP, a la cantidad de anticuerpo HRP unido a dichos anticuerpos que reconocen dichas segundas secuencias de aminoácidos. En este caso, la propiedad óptica medida es la densidad óptica a 450 nm.

De acuerdo con otra realización, en lugar de usar anticuerpos conjugados con HRP, pueden usarse sondas fluorescentes con varias longitudes de onda entre las disponibles en el mercado, como por ejemplo las de la familia Alexa Fluor, como marcadores de anticuerpos que reconocen la segunda secuencia de aminoácidos. En este caso, la detección de la señal es obtenida por medio de un lector de fluorescencia, y la propiedad óptica modificada es la fluorescencia a una longitud de onda determinada.

Estas y otras ventajas serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención, la cual se refiere a las figuras 1 a 3.

Ahora se describirá una primera realización con referencia a la realización de la prueba con una placa de microtitulación ELISA. Debe repetirse que, sin apartarse del alcance de la presente invención, la prueba puede llevarse a cabo utilizando diferentes soportes, tal como por ejemplo inmunocromatografía de flujo lateral (Sajida M et al., Journal of Saudi Chemical Society 2015; 19 (6) 689-705) o un dispositivo microfluídico (Sardesai NP, et al. Anal Bioanal Chem. abril de 2013; 405 (11): 3831-3838). En primer lugar, debe indicarse también que la muestra biológica a la cual se hace referencia a continuación es preferiblemente orina, pero puede ser cualquier otro fluido biológico (como por ejemplo suero, plasma, saliva, líquido broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, heces, semen) u otra muestra biológica (tal como por ejemplo extracto de proteína celular o tisular o medio de cultivo celular) donde está contenido el analito de interés.

Aún otro preámbulo válido para las diversas realizaciones siguientes está relacionado con el enfoque utilizado para la detección de la señal. En la realización preferida, es considerado un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y un método cromogénico basado en la adición de sustrato 3,3'-5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para la detección. Se pretende que la detección se pueda llevar a cabo también por quimioluminiscencia (utilizando, por ejemplo, un sistema luminol/H₂O₂/potenciador) o por quimifluorescencia (conjugando el anticuerpo con sustratos como, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas) o podría basarse también en el uso de sensores interferométricos, como por ejemplo los descritos por Duval et al (Silicon Photonic Based Biosensors: The Future of Lab-on-a-Chip Diagnostic devices; IEEE PHOTONICS SOCIETY NEWLETTER, agosto de 2012) sin apartarse del alcance de la presente invención.

De manera similar, los procedimientos experimentales detallados para la implementación práctica de las realizaciones descritas podrían definirse de acuerdo con los estándares de buena técnica, sin apartarse de los objetivos de la presente invención. Solo a modo de ejemplo, las placas de microtitulación ELISA recubiertas previamente con proteína A o G podrían usarse para unir el anticuerpo de captura de manera más estable.

Medición de la cantidad de RKIP y p-RKIP en la muestra biológica

De acuerdo con una realización preferida, la dosificación cuantitativa de RKIP y p-RKIP en la muestra biológica a probar utiliza un anticuerpo, definido a continuación como anticuerpo de captura (9) que reconoce un epítipo presente en la región compartida por RKIP/p-RKIP, que tiene preferiblemente, pero no de una manera limitativa, la secuencia de aminoácidos indicada a continuación (Id1 en el listado de secuencias adjunto):

DPDAPSRKDPKYRE

El anticuerpo de captura (9) recubre los pocillos (1) de la placa de microtitulación ELISA, donde a continuación se añade la solución de bloqueo la cual está compuesta de BSA, leche o suero bovino fetal en una concentración óptima entre 1 y 5 %, la cual sirve para saturar los sitios de unión y no permitir la adhesión de analitos distintos de los reconocidos por el anticuerpo de captura.

A continuación, la muestra biológica es introducida para obtener la captura del analito antes de la dosificación. De hecho, debe especificarse que después de haber recubierto previamente los pocillos de la placa de microtitulación ELISA con el anticuerpo de captura, sólo pueden unirse las proteínas presentes en la muestra biológica y reconocidas por el anticuerpo de captura. Entonces, son solo RKIP y p-RKIP, o proteínas que contienen la misma secuencia de aminoácidos común a RKIP y p-RKIP. De modo similar, cuando, después de la muestra biológica, se añaden los anticuerpos trazadores específicos para RKIP y p-RKIP (véase la siguiente sección), estos se unen a la región peculiar de RKIP o p-RKIP. Por lo tanto, es absolutamente improbable que una proteína distinta de las

de interés pueda producir una señal, ya que debe contener tanto la secuencia exacta reconocida por el anticuerpo de captura como la secuencia exacta reconocida por el anticuerpo trazador, y las probabilidades de que esto se produzca para una proteína distinta de RKIP y p-RKIP son casi nulos.

Después, se añaden a la muestra biológica, en primer lugar, anticuerpos trazadores específicos para RKIP (3) y p-RKIP (6) respectivamente, y a continuación, anticuerpos conjugados con HRP específicos para RKIP (4) y p-RKIP (7).

Los anticuerpos trazadores son anticuerpos los cuales reconocen específicamente una secuencia presente en forma no fosforilada (anticuerpo trazador específico para RKIP) o en forma fosforilada (anticuerpo trazador específico para p-RKIP) de la proteína.

Los anticuerpos conjugados con HRP se unen específicamente a los anticuerpos trazadores, y modifican la absorbancia (densidad óptica) medida dentro del pocillo mediante una reacción colorimétrica de manera proporcional a la cantidad de anticuerpos trazadores unidos.

Después de la adición de anticuerpos conjugados con HRP, se añade un cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbencidina-TMB), el cual actúa como donante de electrones para la reducción de dióxido de hidrógeno a agua por medio de una enzima con acción peroxidasa como la peroxidasa de rábano picante (HRP). Por lo tanto, el cromógeno adquiere una coloración azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpo con HRP presente en cada pocillo, el cual, después de la parada de la reacción, obtenida mediante la adición de un ácido (ácido sulfúrico o ácido clorhídrico) se vuelve amarillo y puede leerse la absorbancia a 450 nm de absorbancia.

La comparación de la densidad óptica de la muestra con la de los pocillos utilizados para determinar la curva de calibración (véase la sección dedicada) permite determinar la cantidad de proteína RKIP y p-RKIP presente en la muestra.

Detección de la curva de calibración

A continuación se describe el procedimiento a seguir para detectar la curva de calibración a utilizar para determinar la presencia cuantitativa de RKIP y p-RKIP.

Antes de la descripción, se debe dar la definición de péptido (o patrón) híbrido recombinante: un péptido híbrido recombinante para una proteína de interés es un péptido que presenta:

- i) una secuencia conservada de la proteína de interés la cual puede unirse a un anticuerpo de captura específico para dicha secuencia;
- ii) una segunda secuencia de la proteína de interés, la cual puede contener modificaciones postraduccionales específicas tales como fosforilación, acetilación, glicosilación y que puede unirse al segundo anticuerpo (anticuerpo trazador) capaz de reconocer de manera selectiva la presencia o no de modificación.

En el caso del método de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos trazadores serán específicos para la secuencia de RKIP con o sin fosforilación en la serina 153 de la cadena peptídica de RKIP.

La curva de calibración es obtenida utilizando dos patrones híbridos recombinantes cuya secuencia es señalada a continuación:

patrón híbrido recombinante de RKIP (2): DPDAPSRKDPKYRE-(enlazador)-GDHRGKFKVASFRKKEYELRA
 patrón híbrido recombinante de p-RKIP (5): DPDAPSRKDPKYRE-(enlazador)-GDHRGKFKVApSFRKKEYELRA

Haciendo referencia al listado de secuencias adjunto, el patrón híbrido recombinante de RKIP tiene las secuencias: Id2 - enlazador - Id3 mientras que el patrón híbrido recombinante de p-RKIP tiene las secuencias: Id4 - enlazador - Id5.

Por lo tanto, cada uno de los dos péptidos híbridos tiene:

- una región común (Id2 = Id4), que puede unirse al anticuerpo de captura (9);
- un enlazador
- una región peculiar (Id3 e Id5) que puede unirse al anticuerpo trazador específico de RKIP en un caso y al anticuerpo trazador específico de p-RKIP en el otro caso.

Para detectar la curva de calibración, el anticuerpo de captura (9) recubre dos series de pocillos (1) de la placa de microtitulación ELISA y, a continuación, se lleva a cabo el bloqueo de los sitios de unión a la superficie de los pocillos con BSA, leche o suero fetal bovino. A continuación, se añaden cantidades crecientes de patrón híbrido recombinante de RKIP (en una de las dos series de pocillos) o patrón híbrido recombinante de p-RKIP (en la otra).

El anticuerpo de captura (9) se unirá a ambos patrones recombinantes por medio de la región común (DPDAPSRKDPKYRE).

La siguiente adición de los dos anticuerpos trazadores, uno específico para RKIP y el otro específico para p-RKIP permitirá unir las regiones peculiares del patrón híbrido recombinante de RKIP (GDHRGKFKVASFRKKEYELRA - Id3 en el listado de secuencias) y del patrón híbrido recombinante de

p-RKIP (GDHRGKFKVApSFRKKYELRA - Id5 en el listado de secuencias).

Finalmente, los anticuerpos conjugados con HRP y la adición de cromógeno permitirán medir la densidad óptica correspondiente a la cantidad de patrón recombinante añadida en cada pocillo, definiendo así las curvas de calibración patrón, en las cuales una densidad óptica específica es asociada con cada concentración conocida de patrón recombinante.

5 Después del bloqueo de los sitios de unión, la muestra biológica a probar (8) es añadida en diferentes pocillos, recubiertos con anticuerpo (9). En estos pocillos, después de la adición de anticuerpos trazadores para RKIP (3) y p-RKIP (6), anticuerpos conjugados con HRP que reconocen el trazador de RKIP (4) y el trazador de p-RKIP (7) y el cromógeno, respectivamente, se medirá la densidad óptica, y la concentración de RKIP y p-RKIP será definida comparando las densidades ópticas medidas con las curvas patrón.

10 Debe observarse que, sin alejarse del campo de la invención, el método descrito puede proporcionar la inversión de los anticuerpos utilizados de manera que los dos anticuerpos trazadores puedan recubrir los pocillos, convirtiéndose así en anticuerpos de captura y el anticuerpo de captura podría usarse para la detección, convirtiéndose así en el trazador.

15 Obviamente, será necesario usar anticuerpos conjugados con HRP adecuados. Independiente del tipo de realización, la prueba alcanza el objetivo de proporcionar la determinación cuantitativa de RKIP y de p-RKIP. Para el mejor conocimiento de los presentes inventores, hasta ahora no hay una prueba inmunoenzimática que mida p-RKIP cuantitativamente, ni una prueba que mida los niveles de RKIP/p-RKIP al mismo tiempo.

20 En una realización preferida, la aplicación de esta prueba a la muestra de orina puede permitir el diagnóstico temprano y el pronóstico del carcinoma de células renales (CCR), definiendo así un parámetro de diagnóstico basado en la concentración de p-RKIP dentro de la muestra biológica y un pronóstico basado en los niveles de RKIP.

25 Este aspecto resulta muy importante si se considera que el diagnóstico de CCR suele ser un evento casual y, hasta ahora, sólo se puede determinar mediante la realización de una biopsia renal. La invención propuesta puede permitir la exploración de CCR de forma simple, rápida y poco invasiva, permitiendo, así, una ampliación significativa del diagnóstico de CCR en las primeras etapas de desarrollo de la enfermedad con la consiguiente mejora en el pronóstico y la esperanza de vida del paciente. Aún más importante, en términos de economía y prevención, es la aplicación de prueba para clases específicas de pacientes de alto riesgo, tal como por ejemplo personas obesas, personas con hipertensión y pacientes con enfermedad renal terminal, que se someten a ultrasonido renal solamente ocasional para individualizar la enfermedad de manera temprana, mientras que mediante la prueba de RKIP/p-RKIP, podrían obtener indicaciones rápidas y no invasivas sobre el riesgo de desarrollar el carcinoma de células renales y, en caso de ser positivo, sobre el pronóstico el cual es más favorable cuanto más rápido sea el diagnóstico. Sólo teniendo en cuenta las personas obesas y las personas con hipertensión, la población potencialmente apta para la exploración sería de más de un billón de individuos en todo el mundo. Además, el impacto que la presente invención podría tener en el diagnóstico de cáncer se muestra en la bibliografía reciente que ha destacado un papel cada vez más importante de RKIP y p-RKIP en la génesis y progresión de varios tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de pulmón (más de 1,8 millones de casos anualmente en el mundo), el cáncer de mama (más de 1,6 millones de casos) y el cáncer colorrectal (casi 1,4 millones de casos).

35 El objetivo de la presente invención puede usarse para determinar la expresión intracelular de RKIP y p-RKIP en cualquier tipo de célula y tejido. En este caso, la única variación sería la adición en los pocillos (1) de la placa de microtitulación ELISA, como muestra biológica, de extracto de proteína celular en el cual se determinará la proteína RKIP y p-RKIP. Por lo tanto, la prueba podría ser ampliamente utilizada por equipos de investigadores comprometidos en la caracterización del papel funcional RKIP y p-RKIP en diversas patologías, ya que es un método simple, rápido y cuantitativo.

45 En particular, la presente invención proporciona un método de diagnóstico para el diagnóstico de carcinoma de células renales de células claras basándose en la medición cuantitativa en una muestra de orina de proteína p-RKIP y un método para el pronóstico del carcinoma de células renales de células claras basándose en la medición cuantitativa en una muestra de orina de proteína RKIP. Ambas mediciones pueden realizarse convenientemente de acuerdo con cualquiera de los modos recién descritos.

55 El método de diagnóstico para el carcinoma de células renales de células claras comprende las etapas de:

- medir la cantidad de p-RKIP en una muestra de orina;
- en caso de ausencia de p-RKIP en la muestra de orina, diagnosticar un carcinoma de células renales de células claras.

60 En caso de presencia de p-RKIP en la muestra de orina, el diagnóstico es negativo (no hay carcinoma

renal).

Se debe precisar que en este caso, para la ausencia de p-RKIP en la muestra se pretende la ausencia de una señal medible (densidad óptica medida en la muestra comparable con la obtenida en ausencia de muestra biológica) en las condiciones de trabajo de prueba con el método de acuerdo con la presente invención, mediante el uso de anticuerpo de captura + anticuerpo trazador + anticuerpo conjugado con HRP + TMB.

Esto no excluye que al usar un sistema de detección capaz de amplificar la señal (por ejemplo, estreptavidina-biotina; fluorescencia, etc.) es posible detectar la presencia de p-RKIP también en muestras de orina de pacientes con carcinoma de células renales de células claras. La diferencia entre la concentración mínima detectable sin amplificar la señal y la concentración mínima detectable con el método de acuerdo con la presente invención es de todos modos tan alta que la concentración de p-RKIP en orina del paciente puede considerarse igual a cero si no se detecta señal con el método de acuerdo con la invención.

El método de pronóstico para anticipar el desarrollo de un carcinoma de células renales de células claras comprende las siguientes etapas:

- medir la cantidad de RKIP en una muestra de orina;
- si la cantidad de RKIP es mayor que un valor umbral, se deduce un pronóstico favorable;
- si la cantidad medida de RKIP es inferior a un valor umbral, se deduce un pronóstico no favorable.

Con respecto a la definición exacta del valor umbral que se utilizará como punto de corte, debe precisarse que hasta ahora no es posible definir un valor umbral para el contenido de RKIP en la muestra de orina, ya que se necesitarían miles de mediciones para definirlo exactamente. De cualquier modo, es cierto que se puede definir este valor umbral, ya que la muestra de orina refleja generalmente lo que sucede en el tejido renal. Esto se confirmó en un trabajo, recién aceptado para su publicación en la revista *Oncotarget* (*Urinary RKIP/p-RKIP is a potential diagnostic and prognostic marker of clear cell Renal Cell Carcinoma*) Papale et. al, *Oncotarget* 2017) que ha demostrado la correlación directa entre niveles de expresión tisular y excreción en orina de RKIP y pRKIP en pacientes con carcinoma de células renales de células claras.

Hill B et al (*Oncotarget*. 15 de septiembre de 2014;5(17):7406-19, "Common reduction of the Raf kinase inhibitory protein in clear cell renal cell carcinoma") han demostrado que existe una correlación lineal entre los niveles de RKIP y la progresión del carcinoma renal. Mediante un análisis de Micromatrices tisulares (TMA, por sus siglas en inglés), realizado en más de 600 tejidos de pacientes con carcinoma de células renales de células claras, han demostrado que una puntuación H (parámetro comúnmente utilizado para el análisis de datos producidos por experimentos de TMA) superior a 260 identifica el tejido normal, una puntuación de 220 identifica la presencia de CCR, una puntuación de 204 identifica la presencia de CCR metastásico primario y una puntuación de 181 la aparición de metástasis a largo plazo. Además, los pacientes con una puntuación H > 204 tuvieron un pronóstico generalmente favorable, mientras que aquellos con una puntuación H < 204 tuvieron un pronóstico no favorable (muerte en el 50% de los casos). Siempre usando un análisis de TMA, Papale et al. han evaluado los niveles de RKIP y p-RKIP en tejido renal de 40 pacientes con carcinoma de células renales de células claras (CCRcc), 19 pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y 5 tejidos aparentemente sanos dando una puntuación = 0 por ausencia de señal, 1 para señal baja, 2 para señal media y 3 para señal alta. Con este enfoque, todos los tejidos normales tuvieron una puntuación de 3 para RKIP, los tejidos con ERC obtuvieron una puntuación entre 2 y 3, mientras que sólo 8/40 CCRcc tuvieron una puntuación de 1-2 (media-baja), mientras que en los otros la proteína resultó no detectable. Lo mismo ocurre con p-RKIP, que resultó muy expresado en tejido normal, reducido en ERC y totalmente ausente en todos los tejidos con CCRcc independientemente del grado, presencia de metástasis visceral, tamaño del tumor y afectación de ganglios linfáticos.

Como ya se dijo, la muestra de orina refleja generalmente lo que se puede encontrar también en el tejido renal, de todos modos las técnicas de medición actuales no han permitido difundir la medición cuantitativa de RKIP y p-RKIP en la muestra de orina. Esto es posible, en cambio, por el método de acuerdo con la presente invención. En el estado de la técnica, en cambio, el dato cuantitativo sólo puede obtenerse mediante inmunotransferencia, una técnica semicuantitativa cuyos límites de dificultad y reproducibilidad son bien conocidos.

El objetivo de la presente invención introduce algunas innovaciones técnicas con respecto a los ensayos ELISA, actualmente disponibles en el mercado, para el análisis de fosfoproteínas, de cualquier otra forma que no sea pRKIP. De hecho, incluso si las principales compañías de biotecnología (ThermoFisher, SigmaAldrich, R&D systems, Raybiotech) han lanzado recientemente al mercado pruebas ELISA específicas para la dosificación de fosfoproteínas, en la mayoría de los casos no se proporciona el uso de un patrón de referencia, lo que limita el análisis a la dosificación

simultánea de la forma total y fosforilada de la misma proteína que se lleva a cabo cargando el pocillo con el mismo volumen de extracto celular para las diversas afecciones a analizar. Incluso si este enfoque puede ser útil para comprender la cantidad de proteína diana fosforilada en un contexto determinado, de todos modos no es adecuado para llevar a cabo la dosificación cuantitativa de biomarcadores.

5 Sin embargo, hay empresas que usan un patrón de referencia: en la mayoría de los casos, el patrón está compuesto de extractos celulares estimulados con factores de crecimiento específicos para obtener la fosforilación de la proteína diana. Las diluciones en serie del extracto celular estimulado se utilizan para crear una curva de referencia patrón la cual, de todos modos, no permite la cuantificación absoluta de la proteína y su forma fosforilada.

10 Otra ventaja de la solución recién descrita se destaca en que ahora sólo unas pocas compañías, entre ellas NOVEX, han desarrollado pruebas ELISA que usan la proteína recombinante relativa como patrón, pero para un número limitado de fosfoproteínas (alrededor de 32). Un ejemplo lo proporciona la prueba del kit TAU de Fosfo-ELISA [pS199] (Novex-Thermofisher, número de catálogo KHB7041).

15 Este aspecto es muy importante porque destaca cómo no existen patrones adecuados para todas las proteínas para hacer que la prueba sea cuantitativa. De hecho, no todas las instalaciones que producen recombinantes pueden proporcionar tanto la forma nativa como la fosforilada. Además, es importante subrayar una ventaja económica de la solución propuesta: la síntesis de proteína recombinante es mucho más larga y más costosa que la síntesis de péptido híbrido como se propone en la presente invención (alrededor de 7000 euros para la síntesis en E. Coli de proteína natural y, siempre que sea posible, de la forma fosforilada de la proteína de interés con respecto a aproximadamente 1500 euros para obtener la síntesis de aproximadamente 5 mg de péptido híbrido y aproximadamente 5 mg de péptido híbrido de p-RKIP). Por lo tanto, con el mismo rendimiento, el enfoque propuesto parece ser más conveniente y más eficaz que las soluciones actuales.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FLUIDIA S.r.l.

<120> Método para la evaluación cuantitativa en una muestra biológica de la forma fosforilada y no fosforilada de RKIP.

30

<130> 1306

<160> 5

35

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región común de RKIP - pRKIP

45

<400> 1

Asp Pro Asp Ala Pro Ser Arg Lys Asp Pro Lys Tyr Arg Glu
1 5 10

<210> 2

<211> 14

50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Patrón híbrido recombinante de RKIP - parte 1

55

<400> 2

Asp Pro Asp Ala Pro Ser Arg Lys Asp Pro Lys Tyr Arg Glu
1 5 10

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Patrón híbrido recombinante de RKIP - parte 2
 <400> 3
 Gly Asp His Arg Gly Lys Phe Lys Val Ala Ser Phe Arg Lys Lys Tyr
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Ala
 20
 10
 <210> 4
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Patrón híbrido recombinante de p-RKIP - parte 1
 <400> 4
 Asp Pro Asp Ala Pro Ser Arg Lys Asp Pro Lys Tyr Arg Glu
 1 5 10
 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Patrón híbrido recombinante de p-RKIP - parte 2
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> 11
 <223> FOSFORILACIÓN
 30
 <400> 5
 35
 Gly Asp His Arg Gly Lys Phe Lys Val Ala Ser Phe Arg Lys Lys Tyr
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Ala
 20

REIVINDICACIONES

1. Método para la medición cuantitativa de la proteína RKIP y de la proteína p-RKIP en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 5 a) recubrir con dos soportes distintos:
- a1) un anticuerpo que reconoce una primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP y
- a2) un anticuerpo que reconoce una primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP;
- 10 b) añadir una solución de bloqueo a ambos soportes,
- c) añadir dicha muestra biológica;
- d) añadir, en los respectivos soportes
- d1) un anticuerpo que reconoce una segunda secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP y
- 15 d2) un anticuerpo que reconoce una segunda secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP;
- siendo una de dichas secuencias de aminoácidos primera y segunda común entre RKIP y p-RKIP, y siendo la otra una secuencia que contiene la fosforilación de la serina 153, y por lo tanto, diferente para p-RKIP y RKIP;
- 20 e) añadir un marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas proporcional a la cantidad de dicho anticuerpo unido a dicha segunda secuencia de aminoácidos, cuando está en contacto con dicho anticuerpo que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos;
- f) medir una propiedad óptica de las dos muestras y compararla con una curva de calibración obtenida midiendo la misma propiedad óptica de dos series de soportes, en los cuales se han
- 25 añadido, en el orden:
- i) un anticuerpo que reconoce dicha primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína p-RKIP para la primera de dichas series y dicha primera secuencia de aminoácidos presente en la proteína RKIP para la segunda de dichas series
- 30 ii) una solución de bloqueo
- iii) cantidades conocidas y crecientes de un patrón híbrido recombinante que comprende dichas secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína p-RKIP para la primera de dichas series y dichas secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína RKIP para la segunda de dichas series;
- 35 iv) anticuerpos que reconocen específicamente dicha segunda secuencia de aminoácidos presente en p-RKIP o dicha segunda secuencia presente en RKIP, respectivamente;
- v) un marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas proporcional a la cantidad de dicho anticuerpo unido a dicha segunda secuencia de aminoácidos, cuando está en contacto con dicho anticuerpo que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos.
- 45 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho patrón híbrido recombinante que comprende las secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína p-RKIP tiene la secuencia de aminoácidos indicada a continuación:
DPDAPSRKDPKYRE-(enlazador)-GDHRGKFKVApSFRKKYELRA
- 50 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado porque** dicho patrón híbrido recombinante que comprende las secuencias de aminoácidos tanto primera como segunda presentes en la proteína RKIP tiene la secuencia de aminoácidos indicada a continuación:
DPDAPSRKDPKYRE-(enlazador)-GDHRGKFKVASFRKKYELRA
- 55 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado porque** tanto dicha primera secuencia presente en RKIP como dicha primera secuencia presente en p-RKIP son iguales a la secuencia indicada a continuación:
DPDAPSRKDPKYRE.
- 60 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado porque** dicha segunda secuencia presente en RKIP es la siguiente:

GDHRGKFKVASFRKKYELRA

mientras que dicha segunda secuencia presente en p-RKIP es la siguiente:

GDHRGKFKVApSFRKKYELRA

- 5 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dichos soportes son pocillos de una placa de microtitulación ELISA, **en el que** después del punto d) se introduce la etapa de:
- d3) añadir en los respectivos soportes, anticuerpos conjugados con HRP específicos para dichos anticuerpos que reconocen dichas segundas secuencias de aminoácidos,
- 10 y después del punto iv) a dicha serie de pocillos, se añaden anticuerpos conjugados con HRP específicos para anticuerpos que reconocen dichas segundas secuencias de aminoácidos, **y en el que** dicho marcador es capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas cuando está en contacto con dicho anticuerpo que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos es TMB y dicha propiedad óptica es la densidad óptica.
- 15 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dichos soportes son cartuchos cromatográficos, **en el que** dicha muestra biológica se añade a un extremo del cartucho, **en el que** dichos anticuerpos que reconocen dichas primeras secuencias de aminoácidos se recubren en una región de dicho cartucho distal al papel absorbente,
- 20 y **en el que** dichos anticuerpos que reconocen dichas segundas secuencias de aminoácidos se adhieren a la superficie cromatográfica de dicho cartucho en una región próxima al papel absorbente, y **en el que** dicho marcador capaz de determinar una variación de las propiedades ópticas cuando entra en contacto con dicho anticuerpo
- 25 que reconoce dicha segunda secuencia de aminoácidos es una sonda fluorescente y dicha propiedad óptica es una fluorescencia a una longitud de onda específica.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha muestra biológica es una entre orina, suero, plasma, saliva, líquido broncoalveolar, líquido cefalorraquídeo, deposiciones, semen, extracto de proteínas celulares o tisulares o un medio de cultivo celular.
- 30 9. El método de diagnóstico para el diagnóstico de carcinoma de células renales de células claras, que comprende las etapas de:
- 35 - medir la cantidad de p-RKIP en una muestra de orina con el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- en caso de ausencia de p-RKIP en la muestra de orina, diagnosticar un carcinoma de células renales de células claras.
- 40 10. El método de pronóstico para anticipar el desarrollo de un carcinoma de células renales de células claras, que comprende las siguientes etapas de:
- medir la cantidad de RKIP en una muestra de orina con el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
- 45 - si la cantidad de RKIP es mayor que un valor umbral, se deduce un pronóstico favorable;
- si la cantidad medida de RKIP es inferior a un valor umbral, se deduce un pronóstico no favorable.

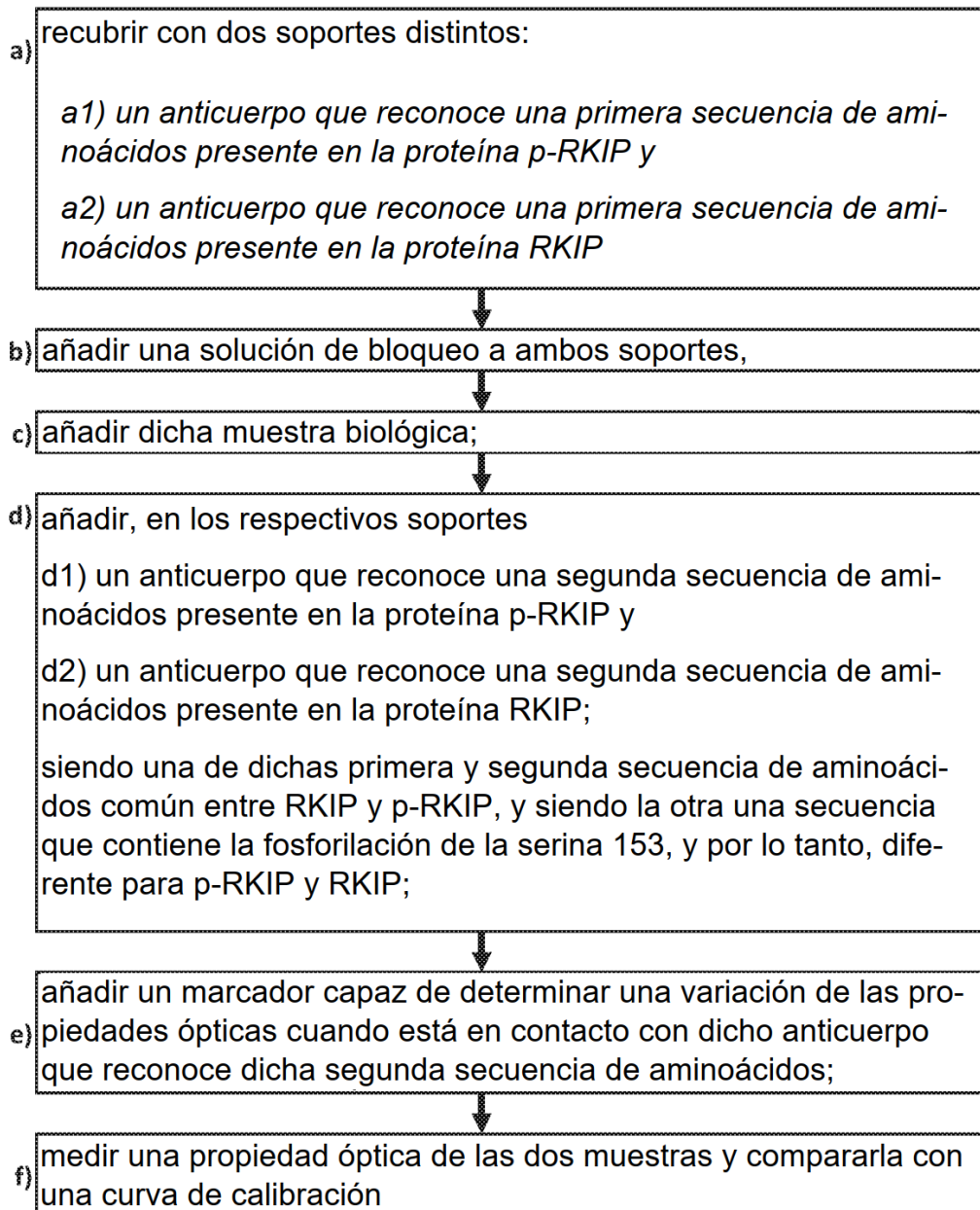


Fig. 1

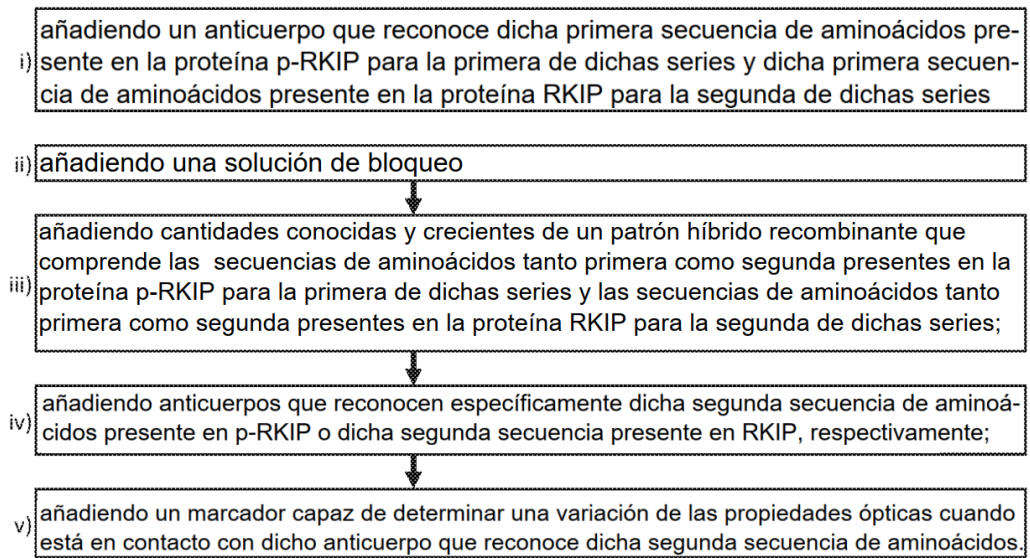


Fig. 2

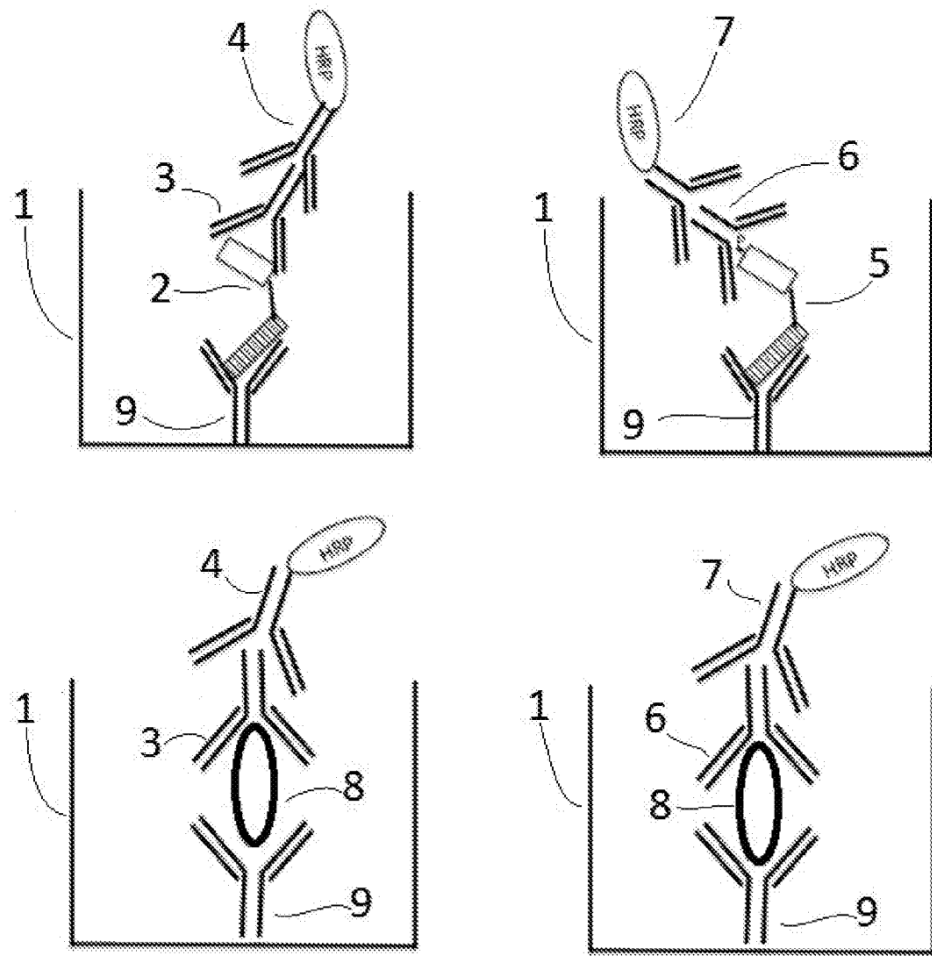


Fig. 3

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2011058136 A [0010]

Bibliografía no especificada en la descripción de la patente

- VENERA CARDILE. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and phospho-RKIP expression in melanomas. *ACTA HISTOCHEMICA*, 2013, vol. 115 (8), 795-802 [0010]
- SAJIDA M et al. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2015, vol. 19 (6), 689-705 [0024]
- SARDESAI NP et al. *Anal Bioanal Chem.*, vol. 405 (11), 3831-3838 [0024]
- DUVAL et al. Silicon Photonic Based Biosensors: The Future of Lab-on-a-Chip Diagnostic devices. *IEEE PHOTONICS SOCIETY NEWLETTER*, August 2012 [0025]
- HILL B et al. *Oncotarget*, 15 September 2014, vol. 5 (17), 7406-19 [0059]