

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 089**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2015** **PCT/AU2015/050060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2015** **WO15120523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2015** **E 15748774 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020** **EP 3108256**

54 Título: **Procedimiento de detección del cáncer**

30 Prioridad:

17.02.2014 AU 2014900494

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

09.04.2021

73 Titular/es:

SIENNA CANCER DIAGNOSTICS LTD (100.0%)
C/o Small Technologies Cluster
Scoresby, Victoria 3179, AU

72 Inventor/es:

LALLA, MINESH;
TURATTI, FABIO y
WILSON, SHARYN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 818 089 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

Procedimiento de detección del cáncer

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente descripción se refiere a procedimientos para determinar si un sujeto tiene cáncer. Más particularmente, la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer cuando una evaluación citológica de la morfología celular no es concluyente para el cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desarrollo y la progresión del cáncer coloca una carga emocional y financiera significativa en la sociedad.

15 El cáncer de vejiga es el segundo tumor genitourinario más común en poblaciones humanas, con una incidencia de aproximadamente 261.000 casos nuevos cada año alrededor del mundo; alrededor de un tercio de los mismos probablemente sean una enfermedad invasiva o metastásica al momento del diagnóstico (Parkin y col., 1999).

Al igual que con muchos otros tipos de cáncer, el diagnóstico clínico del cáncer de vejiga puede ser un procedimiento difícil, particularmente en las primeras etapas del desarrollo del cáncer. En la actualidad, la cistoscopia y la citología urinaria son las herramientas más importantes en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de vejiga.

En la actualidad, la cistoscopia con biopsia generalmente se considera el estándar de oro para diagnosticar el cáncer de vejiga. Un inconveniente del uso de la cistoscopia es que requiere un procedimiento invasivo. Además de ser 25 invasiva, la obtención de una biopsia mediante cistoscopia puede tener posibles resultados adversos para el paciente. Dadas estas limitaciones, es muy difícil obtener muestras de pacientes a través de una cistoscopia, de manera repetida de un gran número de individuos.

En consecuencia, los médicos generalmente confían en la citología de rutina para identificar a los pacientes con riesgo 30 de desarrollar cáncer de vejiga antes de la cistoscopia. La citología de rutina tiene dos limitaciones bien aceptadas que reducen su utilidad como herramienta de diagnóstico para el cáncer en etapa temprana.

Primero, la citología tiene poca sensibilidad para el cáncer de bajo grado. En consecuencia, la citología de rutina devuelve un alto nivel de resultados negativos falsos en muestras de cáncer de bajo grado que carecen por completo 35 de anomalías morfológicas celulares. En segundo lugar, la utilidad de la citología para la detección de enfermedades de bajo grado, o lesiones difíciles de diagnosticar, es limitada. Por ejemplo, cuando se usa citología para el diagnóstico de cáncer de vejiga, una gran proporción de casos (20-25 %) se informan como atípicos, incluidas las "células uroteliales atípicas de significado desconocido" (AUCUS), y las "células uroteliales atípicas no pueden excluir el carcinoma urotelial de alto grado (AUHGC)" (Rosenthal y col., 2013). Un resultado informado de AUCUS o AUHGC 40 tiene poca o ninguna utilidad diagnóstica. Khalbuss y Goodison (2006) usaron la detección inmunohistoquímica de hTERT en sedimentos de orina como complemento de la citología en el diagnóstico de neoplasias uroteliales, sin embargo, los casos atípicos no se clasificaron de manera confiable.

Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento capaz de proporcionar un diagnóstico de cáncer más preciso, 45 temprano y económicamente viable. Dicho procedimiento podría proporcionar asistencia a los médicos para alcanzar un diagnóstico en etapa temprana antes de la representación de los indicadores morfológicos detectables. Además, el diagnóstico precoz del cáncer, antes de la invasión y la metástasis, generalmente se asocia con un mejor pronóstico. En consecuencia, existe un imperativo social y económico para proporcionar un procedimiento que pueda detectar el cáncer de manera más confiable en una etapa temprana, por lo que la terapia contra el cáncer se puede administrar 50 en un momento en que la carga de la enfermedad es leve.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente descripción puede usarse para ayudar a resolver una evaluación citológica no concluyente del cáncer, y 55 por lo tanto puede usarse como una prueba reflexiva para procedimientos de evaluación citológica no concluyentes. Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para resolver una evaluación citológica no concluyente de células clínicamente relevantes en una muestra obtenida de un paciente, el procedimiento comprende poner en contacto las células de la muestra con un anticuerpo anti-telomerasa y realizar una evaluación citológica de las células para detectar la unión del anticuerpo a las células clínicamente relevantes, 60 donde la unión del anticuerpo a las células clínicamente relevantes indica la presencia de células malignas.

El procedimiento de la presente descripción puede usarse para resolver una evaluación citológica no concluyente de células clínicamente relevantes en una muestra obtenida de un paciente.

5 Por ejemplo, los procedimientos de la presente descripción pueden comprender poner en contacto una muestra de paciente que comprende células clínicamente relevantes de citología no concluyente con un anticuerpo anti-telomerasa y detectar la presencia o ausencia de unión del anticuerpo a las células clínicamente relevantes de citología no concluyente, donde la unión del anticuerpo contra células clínicamente relevantes de citología no concluyente indica la presencia de células malignas.

10

En un ejemplo del aspecto anterior, la ausencia de unión de anticuerpos a células clínicamente relevantes indica que las células malignas no están presentes en la muestra.

15 En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer cuando una evaluación citológica de la morfología celular no es concluyente para el cáncer, comprendiendo el procedimiento:

- i) poner en contacto una muestra celular del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa;
- ii) realizar una evaluación citológica de la muestra celular para detectar la unión del anticuerpo a células clínicamente relevantes en la muestra; donde la unión del anticuerpo a una o más células clínicamente relevantes en la muestra indica que el sujeto tiene cáncer.

20

Cuando el cáncer se determina usando un procedimiento de la descripción, la determinación puede o no ser concluyente con respecto al diagnóstico definitivo sobre el cual un médico tratante determinará un curso de tratamiento. El diagnóstico definitivo del estado del cáncer de un sujeto que se determina que tiene cáncer se puede validar o confirmar si se justifica, como a través de técnicas de imagen que incluyen PET, MRI, ultrasonido, CT, PET/CT. En un ejemplo de los aspectos anteriores, cuando el cáncer que se está determinando es cáncer de vejiga, se puede usar una investigación adicional por medio de cistoscopia con biopsia o imágenes del tracto superior para obtener un diagnóstico definitivo del estado del cáncer.

30

La presente descripción también se puede usar como una prueba complementaria de primera línea, para determinar con mayor precisión la presencia de células malignas en un solo procedimiento. Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer, comprendiendo el procedimiento:

35

- i) realizar una evaluación citológica de la morfología celular en una muestra celular del sujeto para determinar la morfología de una o más células clínicamente relevantes en la muestra;
 - ii) poner en contacto una muestra celular del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa y realizar una evaluación citológica de la muestra celular para detectar la unión del anticuerpo a células clínicamente relevantes en la muestra;
- donde, cuando la evaluación citológica de la morfología celular no es concluyente para el cáncer, la unión del anticuerpo a una o más células clínicamente relevantes indica que el sujeto tiene cáncer.

40

45 En un ejemplo de los aspectos anteriores, la unión del anticuerpo a al menos aproximadamente el 5 % de células clínicamente relevantes en la muestra indica que el sujeto tiene cáncer.

Además, la evaluación morfológica citológica y la detección de telomerasa se pueden realizar en cualquier orden o simultáneamente en las mismas células.

50 En un ejemplo, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a las células con una citología atípica indica que el sujeto tiene cáncer. Por ejemplo, los procedimientos de la presente descripción identifican al sujeto que tiene un cáncer maligno cuando se detecta la unión del anticuerpo a las células con una citología atípica o indeterminada.

55 En un ejemplo, la ausencia de unión de anticuerpos anti-telomerasa a células clínicamente relevantes indica que las células en la muestra no son malignas. Por ejemplo, los procedimientos de la presente descripción identifican que el sujeto no tiene células cancerosas malignas cuando no se detecta la unión del anticuerpo a las células clínicamente relevantes.

60 En otro ejemplo, los procedimientos de la presente descripción comprenden dirigir el tratamiento del sujeto a un cáncer maligno, cuando se detecta la unión del anticuerpo a las células con una citología atípica o indeterminada.

Como apreciará un experto en la materia, la evaluación citológica implica la evaluación de células individuales. Por consiguiente, al realizar el presente procedimiento, las células individuales se evalúan citológicamente para detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes. La evaluación citológica de la telomerasa permite excluir de la evaluación los tipos de células teñidas con telomerasa que se sabe que son no cancerosas en función de su morfología. Por ejemplo, los procedimientos de la presente descripción comprenden excluir células no clínicamente relevantes de la evaluación citológica.

Las células excluidas se consideran no clínicamente relevantes para determinar si un sujeto tiene cáncer. Las células excluidas dependerán del cáncer que se detecte. Más específicamente, la persona experta estará al tanto de los tipos de células en una muestra relacionada con un cáncer en particular. Los ejemplos de células excluidas incluyen, pero no se limitan necesariamente a, una o más o todas las células T, células B, neutrófilos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, mastocitos, células de memoria, células plasmáticas, eosinófilos, tubulares renales. células, células de la vesícula seminal, esperma y células escamosas. Por ejemplo, las células enumeradas anteriormente se excluirán al evaluar el cáncer de vejiga usando los procedimientos de la descripción.

La muestra puede ser de cualquier tipo adecuado conocido por incluir potencialmente células malignas. Las muestras que se describen en esta invención abarcan material de biopsia, material de resección, orina, lavados de vejiga, depuraciones de vejiga, sangre, esputo, líquido cefalorraquídeo, derrames pleurales, ascitis abdominal, hígado, tiroides, ovario, ganglios linfáticos, mama, cuello uterino, pulmón, árbol biliar, páncreas, pulmón y colon. En una realización, el vector es un vector viral. Según la invención, el cáncer es cáncer de vejiga. En una realización, la muestra es orina, lavados de vejiga o depuraciones de vejiga.

El anticuerpo puede tener una variedad de formas diferentes, tales como, entre otros, puede ser monoclonal, policlonal, biespecífico, quimérico, recombinante, antiidiotípico, humanizado, molécula de anticuerpo de cadena única o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los ejemplos de anticuerpos adecuados para su uso en la descripción incluyen, pero no se limitan a, SCD-A7, 2D8, C-12, H-231, subconjunto catalítico anti-telomerasa, 10E9-2, 2C4 y tel 3 36-10. En una realización, el anticuerpo es SCD-A7 o un fragmento de unión a la telomerasa del mismo.

El cáncer, como se describe en esta invención, puede ser cualquier cáncer en el que puedan estar presentes células clínicamente relevantes que pueden dar como resultado una evaluación citológica no concluyente para el cáncer. Por ejemplo, el cáncer puede ser un cáncer epitelial. Otros ejemplos de cánceres incluyen, entre otros, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de riñón, linfoma y cáncer colorrectal. Según la invención el cáncer es cáncer de vejiga.

La presente invención proporciona un procedimiento para resolver una evaluación citológica no concluyente de células epiteliales de vejiga en una muestra obtenida de un paciente, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células de la muestra con un anticuerpo anti-telomerasa, donde la muestra comprende células epiteliales de vejiga que tienen una morfología celular que es indeterminada en cuanto a su malignidad, y detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga, donde la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga indica la presencia de células epiteliales de la vejiga malignas.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer de vejiga cuando una evaluación citológica de la morfología de las células epiteliales de la vejiga no es concluyente para el cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento: i) contactar una muestra de células epiteliales de la vejiga obtenidas del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa; ii) realizar una evaluación citológica de las células epiteliales de la vejiga para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga en la muestra; donde la unión del anticuerpo a una o más células epiteliales de la vejiga en la muestra indica que el sujeto tiene cáncer de vejiga. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento: i) realizar una evaluación citológica de la morfología celular en una muestra de células epiteliales de vejiga obtenidas del sujeto para determinar la morfología de uno o más células epiteliales de la vejiga en la muestra; ii) poner en contacto una muestra de células epiteliales de la vejiga obtenidas del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa y realizar una evaluación citológica de la muestra celular para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga en la muestra; donde, cuando la evaluación citológica de la morfología celular es indeterminada del cáncer de vejiga, la unión del anticuerpo a una o más células epiteliales de la vejiga indica que el sujeto tiene cáncer de vejiga.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para resolver una evaluación citológica no concluyente de células epiteliales de vejiga en una muestra de orina obtenida de un paciente, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una muestra de paciente que comprende células epiteliales de vejiga de citología no concluyente con un anticuerpo anti-telomerasa y detectar la presencia o ausencia de unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga de citología no concluyente, donde la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga de citología no concluyente indica la presencia de células malignas.

En una realización, las células epiteliales de la vejiga son células uroteliales de la vejiga.

10 De ahora en adelante, la invención se describirá mediante los siguientes ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS

15 FIGURA 1: No se observó tinción celular en la muestra WH11-107 (clínicamente negativa; Figura 1A). La primera evidencia de inmunotinción de telomerasa y su correlación clínica se muestra en la muestra clínicamente positiva WH11-122 usando el anticuerpo anti-hTERT (Clon 2C4) (Figura 1B). Se observó una tinción nuclear positiva en el 40-75 % de las células uroteliales presentes, bajo concentraciones óptimas de anticuerpos.

20 FIGURA 2: Tipos de células positivas y negativas observadas en muestras clínicas de alto grado (Panel A y B) y de bajo grado (Panel C y D). Las células uroteliales atípicas se tiñeron nuclearmente positivas por inmunotinción de telomerasa (Panel A y B). Las células uroteliales de aspecto citológicamente normal mostraron una tinción nuclear positiva mediante la inmunotinción de telomerasa (Panel C) y, dentro de la misma muestra, hubo células uroteliales de aspecto citológico normal sin teñir (Panel D, flecha del recuadro).

25 FIGURA 3: Células teñidas para la proteína hTERT de la telomerasa de una muestra clínica de un paciente con cáncer de vejiga de bajo grado (G1). Panel A: Células escamosas (no de vejiga); Panel B: Células normales de la vejiga (y pequeño glóbulo marrón); Panel C: Célula de vejiga de aspecto normal positiva para la prueba de Sienna; Panel D: Célula de vejiga citológicamente anormal positiva para la inmunotinción de telomerasa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 **Técnicas generales y definiciones seleccionadas**

A menos que específicamente se defina lo contrario, debe entenderse que todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que comúnmente entendería cualquier experto en la materia (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química proteica y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, el inmunoensayo, la preparación de muestras y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos estándares, bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican a lo largo de la literatura, en fuentes tales como J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), TA Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), DM Glover y BD Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1-4, IRL Press (1995 y 1996) y FM Ausubel y col. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluidas todas las actualizaciones hasta ahora), Ed Harlow y David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988) y JE Coligan et al. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluidas todas las actualizaciones hasta ahora).

El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entiende que significa ya sea "X e Y" o "X o Y" y se tomará para proporcionar apoyo explícito a ambos significados o para cualquier significado.

50 Como se usa en esta invención, el término "alrededor", a menos que se indique lo contrario, hace referencia a +/- el 10 %, más preferentemente +/- el 5 %, más preferentemente +/- el 1 %, más preferentemente +/- el 0,5 % del valor designado.

55 A lo largo de esta invención, la palabra "comprender", o variaciones de la misma tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implicará la inclusión de un elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

Evaluación citológica

60

La "evaluación citológica" de la morfología celular en el diagnóstico del cáncer busca identificar células malignas en función de las características morfológicas. La evaluación citológica de la morfología celular es un procedimiento que forma parte del estándar de atención y se usa junto con, o como reflejo de, una investigación adicional para la detección de recurrencia o el diagnóstico de cáncer. No es una prueba *per se*, sino una consulta de patología basada en una muestra particular o conjunto de muestras. El procedimiento de evaluación es complejo y requiere experiencia y cuidado en la recolección de muestras para proporcionar una evaluación correcta. En el contexto del cáncer de vejiga, la evaluación citológica se puede usar junto o como reflejo de la cistoscopia para la detección de recurrencia o el diagnóstico de cáncer de vejiga.

10 Al realizar una evaluación citológica de la morfología celular, una muestra celular generalmente se fija a un portaobjetos y se observa con un microscopio para evaluar visualmente la morfología y las características celulares. Por ejemplo, las células uroteliales de la vejiga pueden recogerse de una muestra de orina, fijarse a un portaobjetos y, a continuación, evaluarse visualmente.

15 Antes, al evaluar visualmente el portaobjetos, la muestra puede teñirse para ayudar a visualizar los cambios morfológicos en las células y los componentes celulares (por ejemplo., núcleos). Estas tinciones pueden incluir una tinción de hematoxilina y eosina o una tinción de Papanicolaou (tinción de Pap).

Históricamente, el rendimiento de la citología se describió como extremadamente bueno con el cáncer de alto grado, pero estudios más recientes han desafiado esa percepción. Por otro lado, la mayoría de los estudios hasta la fecha están de acuerdo con respecto a la baja sensibilidad de la citología en el cáncer de bajo grado. En consecuencia, la evaluación citológica a menudo puede no ser concluyente y no lograr su objetivo previsto para ayudar en el diagnóstico de cáncer. Además, dada la baja sensibilidad de la evaluación citológica, un resultado de citología negativo o no concluyente no excluye la presencia de cáncer (especialmente cáncer de bajo grado).

25

Evaluación citológica no concluyente de la morfología celular

Como se usa en esta invención, una "evaluación citológica no concluyente de la morfología celular" no es concluyente para el cáncer y, por lo tanto, no es informativa para llegar a un diagnóstico de cáncer. Más particularmente, una "evaluación citológica no concluyente de la morfología celular" se refiere a una evaluación que identifica las células que han perdido su apariencia normal pero que no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas.

Las células que han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas se denominan comúnmente en la técnica como células con citología atípica o indeterminada. Por lo tanto, en el contexto de los procedimientos actuales, una "evaluación citológica no concluyente de la morfología celular" es aquella que revela que una o más células clínicamente relevantes en una muestra obtenida del sujeto tienen citología atípica o indeterminada.

Los términos "citología atípica" o "citología indeterminada" se pueden usar indistintamente para indicar una evaluación citológica no concluyente. En el contexto de la presente descripción, las células con "citología atípica" han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas.

Un experto en la materia estaría al tanto de varias señales morfológicas que indican dicha citología. Un experto en la materia determina una denominación atípica en citología e indica que cree que las señales morfológicas están suficientemente mal definidas para permitir una denominación definitiva como positiva o negativa por citología. La denominación en estos casos variará según el laboratorio o el especialista, y puede incluir, por ejemplo, "citología atípica" o "citología atípica", "atipia", "citología indeterminada" o "citología indeterminada", "citología no concluyente" o "no concluyente", "equivoca" o "desconocida". Tales denominaciones son evaluaciones citológicas no concluyentes.

A continuación, se proporcionan ejemplos de características de citología atípica. "Atípico" o "atipia" son términos patológicos para una anormalidad morfológica en una célula. Los cambios morfológicos, a nivel celular, que pueden estar asociados con la atipia y, por lo tanto, la "citología atípica" puede incluir núcleos densamente teñidos, núcleos pleomórficos, relaciones de núcleo:citoplasma alteradas, mitosis aberrante, mitosis frecuente, mitosis suprabasal, desdiferenciación, pérdida de adhesión celular, pérdida de polaridad celular, apoptosis.

55

En las evaluaciones citológicas para el cáncer, como el carcinoma de tiroides, el cáncer de mama o el cáncer de vejiga, una evaluación citológica no concluyente se puede informar como "citología atípica".

Por ejemplo, las muestras de tiroides con una cantidad moderada de coloide y celularidad moderada y/o las células foliculares presentes en grupos que muestran hacinamiento y superposición significativos pueden ser difíciles de

clasificar como benignas o malignas y, por lo tanto, a menudo se informan como "indeterminadas".

Para muchos tipos de cáncer, las características celulares asociadas a la "citología atípica" pueden depender del citólogo y su práctica clínica. Esto puede dar como resultado que la "citología atípica" se divida en varias clasificaciones.

5

Por ejemplo, varias clasificaciones asociadas con la "citología atípica" en el carcinoma de tiroides se ejemplifican en la Tabla 1.

- En el cáncer de vejiga, la "citología atípica" se puede separar en atipia de bajo grado o atipia de alto grado. Las características histológicas asociadas con atipia de bajo grado en el cáncer de vejiga incluyen, papiloma, hiperplasia papilar y neoplasia urotelial papilar de bajo potencial maligno. Las características histológicas asociadas con la atipia de alto grado en el cáncer de vejiga incluyen atipia que no alcanza al carcinoma *in situ*, pero con una marcada atipia citológica focal y arquitectura desorganizada. Las características histológicas definidas como atípicas, que también son indicativas de carcinoma urotelial de alto grado pueden incluir células anormales individuales, núcleos hiper cromáticos, bordes nucleares irregulares, aumento de la relación nuclear: citoplasmática relación, anisonucleosis, núcleos alargados y grupos de células.

Tabla: 1 - Características ejemplares asociadas con la "citología atípica" para el carcinoma de tiroides.

Clasificación citológica	Características
Células atípicas presentes	Principalmente células benignas, pero se incluyen algunas de apariencia atípica, donde la malignidad es una posibilidad poco probable.
Atipia de importancia indeterminada	Población prominente de micro folículos en un aspirado que de otro modo no cumple con los criterios para "neoplasia folicular/sospecha de neoplasia folicular.
	Puede aparecer una población de micro folículos más prominente de lo normal (y puede ser desproporcionadamente aparente en una minoría de frotis) en una muestra celular moderada o marcada, pero la proporción general de micro folículos no es suficiente para un diagnóstico de neoplasia folicular/sospecha de neoplasia folicular.
	Un predominio de las células de Hürthle en un aspirado escasamente celular con escaso coloide.
	La interpretación de la atipia de las células foliculares se ve obstaculizada por el artefacto de preparación de la muestra.
	La muestra celular moderada o marcada está compuesta por una población prácticamente exclusiva de células de Hürthle, aunque el entorno clínico sugiere un nódulo de células de Hürthle benigno.
	Hay características focales sugestivas de carcinoma papilar, que incluyen surcos nucleares, núcleos agrandados con cromatina pálida y alteraciones en el contorno y la forma nucleares en una muestra de apariencia predominantemente benigna.
	Hay células que recubren los quistes que pueden aparecer atípicas debido a la presencia de surcos nucleares, nucléolos prominentes, núcleos alargados y citoplasma, y/o inclusiones citoplasmáticas intranucleares en una muestra de apariencia predominantemente benigna.
	Una población menor de células foliculares muestra agrandamiento nuclear, a menudo acompañado de nucléolos prominentes.
Neoplasia folicular/sospecha de neoplasia folicular	Hay un infiltrado linfocítico atípico (en el que es deseable un aspirado repetido para citometría de flujo), pero el grado de atipia es insuficiente para la categoría general "sospechoso de malignidad".
	La muestra contiene células con características citomorfológicas que las distinguen de los nódulos foliculares benignos.
	Citoarquitectura perturbada: las células foliculares están dispuestas predominantemente en arreglos micro foliculares o trabeculares.
	Apiñamiento celular y superposición con células foliculares más grandes de lo normal.
	La mayoría de las células foliculares están dispuestas en agrupaciones arquitectónicas

Clasificación citológica	Características
	anormales.
Sospechoso de malignidad	La muestra contiene algunas células de apariencia maligna que están mal conservadas, o muy pocas células para un diagnóstico confiable, o está oscurecida por inflamación, sangre o restos celulares. La muestra es adecuada y hay algunas características de malignidad, pero carece de células abiertamente malignas. La historia clínica sugiere precaución a pesar de la presencia de algunas células de apariencia maligna (por ejemplo, TB o bronquiectasia cavitantes, efecto citopático viral y efecto de quimioterapia o radioterapia) El fondo del frotis sugiere necrosis tumoral, aunque no se identifican células malignas bien conservadas Los criterios citológicos de malignidad se superponen con lesiones benignas.

Todas las categorías descritas en la Tabla 1 pueden describirse como atípicas e indeterminadas para el cáncer y, por lo tanto, no son informativas para llegar a un diagnóstico de cáncer. En el contexto de la presente descripción, estas categorías son una "evaluación citológica no concluyente de la morfología celular".

5

Resolución de una evaluación citológica no concluyente de la morfología celular

Como se usa en esta invención, el término "resolución" se refiere a la resolución de una evaluación citológica no concluyente para determinar el estado clínico de una muestra. Anteriormente, ha sido difícil resolver una evaluación citológica no concluyente de la morfología celular para identificar células malignas y determinar si un sujeto tiene cáncer. Por ejemplo, los principales laboratorios de uropatología informan que el 20-25 % de todas las citologías urinarias no son concluyentes. Sin embargo, esta cifra puede variar entre el 10 y el 40 % (Raab y col., 2007; Zaak y col., 2001; Schneeweiss y col., 1999). El uso y la precisión de la citología es fundamental en la práctica convencional para el diagnóstico y el manejo posterior de pacientes con cáncer de vejiga. En consecuencia, resolver evaluaciones citológicas "no concluyentes" para determinar el estado clínico sería extremadamente valioso en hasta el 40 % de todos los casos.

Ahora se ha descubierto que una evaluación citológica no concluyente sobre la base de la morfología se puede resolver para determinar el estado clínico usando una prueba de inmunotinción de telomerasa y una evaluación citológica adicional para detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes.

Una ventaja de esta estrategia es que la unión de un anticuerpo anti-telomerasa se puede detectar en células clínicamente relevantes individuales. Por ejemplo, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa se puede detectar en células uroteliales de vejiga individuales obtenidas de una muestra de orina.

25

En particular, los presentes inventores han descubierto que la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una o más células clínicamente relevantes en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer. Como apreciaría un experto en la materia, una indicación de cáncer también indica la presencia de células malignas en la muestra. Al realizar el presente procedimiento, la telomerasa puede estar presente en más de una célula clínicamente relevante e indicar que un sujeto tiene cáncer. En varias realizaciones, la unión del anticuerpo anti-telomerasa a al menos alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 20, alrededor de 30, alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 200 células clínicamente relevantes evaluadas citológicamente en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer. Por el contrario, la ausencia de unión de anticuerpos anti-telomerasa a células clínicamente relevantes indica que no hay células malignas en la muestra.

Más particularmente, los presentes inventores han descubierto que la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una o más células clínicamente relevantes en una muestra con citología "atípica" de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer. En varias realizaciones, la unión del anticuerpo anti-telomerasa a al menos alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 20, alrededor

de 30, alrededor de 40, alrededor de 50, alrededor de 60, alrededor de 70, alrededor de 80, alrededor de 90, alrededor de 100, alrededor de 200 células clínicamente relevantes con citología "atípica" en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer. Por el contrario, la ausencia de unión de anticuerpos anti-telomerasa a células clínicamente relevantes con citología "atípica" indica que no hay células malignas en la muestra.

5

Además, la telomerasa puede estar presente en un porcentaje del número total de células clínicamente relevantes evaluadas citológicamente e indicar que un sujeto tiene cáncer. En varias realizaciones, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a al menos alrededor del 1 %, al menos alrededor del 2 %, al menos alrededor del 3 %, al menos alrededor del 4 %, al menos alrededor del 5 %, al menos alrededor del 6 %, al menos alrededor del 7 %, al menos alrededor del 8 %, al menos alrededor del 9 %, al menos alrededor del 10 %, al menos alrededor del 11 %, al menos alrededor del 12 %, al menos alrededor del 13 %, al menos alrededor del 14 %, al menos alrededor del 15 %, al menos alrededor del 20 %, al menos alrededor del 30 %, al menos alrededor del 40 %, al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 90 % de células clínicamente relevantes evaluadas citológicamente en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer, .

15

En un ejemplo, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a al menos aproximadamente el 5 % de las células clínicamente relevantes evaluadas citológicamente en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer. Para evitar dudas, se prevé que la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una célula por cada 20 células clínicamente relevantes indica que el sujeto tiene cáncer.

20

En varias realizaciones, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a al menos alrededor del 1 %, al menos alrededor del 2 %, al menos alrededor del 3 %, al menos alrededor del 4 %, al menos alrededor del 5 %, al menos alrededor del 6 %, al menos alrededor del 7 %, al menos alrededor del 8 %, al menos alrededor del 9 %, al menos alrededor del 10 %, al menos alrededor del 11 %, al menos alrededor del 12 %, al menos alrededor del 13 %, al menos alrededor del 14 %, al menos alrededor del 15 %, al menos alrededor del 20 %, al menos alrededor del 30 %, al menos alrededor del 40 %, al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 90 % de células clínicamente relevantes con citología atípica en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer.

25

30 Nuevamente, para evitar dudas, se prevé que la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una célula con citología "atípica" por cada 20 células clínicamente relevantes indica que el sujeto tiene cáncer.

En un ejemplo, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a al menos aproximadamente el 5 % de las células clínicamente relevantes con citología "atípica" evaluadas citológicamente en una muestra de un sujeto indica que el sujeto tiene cáncer.

35

En contraste, la ausencia de unión de anticuerpos anti-telomerasa a células clínicamente relevantes indica que las células en la muestra no son malignas.

40 En algunas realizaciones, la sensibilidad y/o la especificidad se mide contra un diagnóstico clínico de cáncer.

En varias realizaciones, la sensibilidad lograda por el procedimiento actualmente reivindicado para pronosticar o determinar si un sujeto tiene cáncer es al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %.

45

50

En varias realizaciones, la especificidad lograda por el procedimiento actualmente reivindicado para pronosticar o determinar si un sujeto tiene cáncer es al menos alrededor del 50 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %.

55

60

Detección de la unión de anticuerpos anti-telomerasa

La telomerasa es una enzima natural que mantiene la longitud de los telómeros al final de un cromosoma. En los humanos, la telomerasa se sobreexpresa en las células madre humanas, en las células de la línea germinal y en las células malignas. La función de la telomerasa es sintetizar nuevas repeticiones TTAGGG monocatenarias al final de cada cromosoma. En las células normales, la telomerasa juega un papel protector al permitir que una célula se multiplique, evitando, por consiguiente, el acortamiento de los telómeros y evitando la senescencia celular (Bodnar y col., 1998). En contraste, aunque con el mismo modo de acción, la telomerasa también puede exhibir propiedades promotoras de cáncer en células que son o pueden volverse malignas. En ausencia de senescencia, las células (tumores) se replican indefinidamente, introduciendo y propagando mutaciones (Blackburn y col., 2005). Esta propiedad promotora del cáncer de la telomerasa ayuda a la inmortalidad de la célula y al desarrollo del cáncer. Su asociación con el cáncer es evidente porque su presencia se observa como una característica común en casi todas las células tumorales.

La presente descripción busca resolver una evaluación citológica no concluyente de la morfología celular detectando si la telomerasa está presente en una muestra. Para detectar la telomerasa, se pone en contacto una muestra celular de un sujeto con un anticuerpo que se une a la telomerasa, también conocido como anticuerpo anti-telomerasa. Se considera que términos como "contactar", "exponer" o "aplicar" son términos que, en contexto, pueden usarse indistintamente en la presente descripción. El término contacto requiere que el anticuerpo anti-telomerasa se ponga en contacto con una muestra celular para detectar si la telomerasa está presente en una o más células de la muestra. La unión de un anticuerpo a la telomerasa indica que la telomerasa está presente en la célula. Además, la presencia de telomerasa en una muestra también puede denominarse telomerasa positiva o positiva para telomerasa. La unión de un anticuerpo a la telomerasa se detecta mediante evaluación citológica. Por ejemplo, se puede usar un microscopio óptico para detectar la unión de un anticuerpo a la telomerasa en una célula clínicamente relevante.

La detección de la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes en los procedimientos de la descripción se puede realizar mediante cualquier técnica de detección de unión a anticuerpo/antígeno conocida en la técnica donde la unión del anticuerpo al antígeno en células clínicamente relevantes puede detectarse mediante una evaluación citológica. Por ejemplo, puede usarse un inmunoensayo que incorpora un anticuerpo anti-telomerasa. En este ejemplo, la citología se usa para detectar la unión del anticuerpo anti-telomerasa a la telomerasa. En los procedimientos, de la descripción, la telomerasa es el "antígeno". También se prevé que los procedimientos de detección de telomerasa se puedan incorporar en un sistema automatizado de detección de telomerasa. Dicho sistema de inmunoensayo automatizado proporcionaría el procesamiento automático de una muestra y la detección citológica de la telomerasa. Se prevé que dicho sistema permitiría un análisis de alto rendimiento de la telomerasa en muestras.

Inmunoensayo

Para la evaluación clínica de rutina, se prevé que se usarán procedimientos basados en un formato de inmunoensayo para detectar la presencia de telomerasa en una muestra. En el contexto de la presente descripción, un inmunoensayo es una prueba bioquímica que mide la presencia o concentración de un antígeno en una solución mediante el uso de un anticuerpo o inmunoglobulina.

El anticuerpo usado en la presente descripción puede ser cualquier anticuerpo que pueda detectar si la telomerasa está presente en una o más células de la muestra. Varios anticuerpos disponibles comercialmente que pueden detectar si la telomerasa está presente en una célula están disponibles para su uso en los procedimientos de la descripción. Dichos anticuerpos se pueden obtener de Sapphire Biosciences, Life Span Biosciences, Novus Biologicals, Australian Biosearch, Epitomics, Santa Cruz, EMD Millipore, GenWay Biotech Inc, Jomar Biosciences, Sigma-Aldrich, BioCore Pty Ltd, US Biologicals, Thermo Scientific, Life Research, Resolving Images, Leica microsystems y Sienna Cancer Diagnostics Ltd. En un ejemplo, el anticuerpo se une al complejo de telomerasa (incluyendo cada una de la transcriptasa inversa de telomerasa humana, ARN de telomerasa (TR o TERC) y diskarina (DKC1) y/o transcriptasa inversa de telomerasa (hTERT). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-hTERT. Más preferentemente, el anticuerpo que se une a la telomerasa es SCD-A7, 2D8, C-12, H-231, subconjunto catalítico anti-telomerasa, 10E9-2, 2C4 y tel 3 36-10.

Estos anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo anti-hTERT (tel 3) es un anticuerpo monoclonal producido a partir del clon de hibridoma, 36-10. Para purificar el anticuerpo, la fracción de IgG de ascitis se purificó por cromatografía de afinidad con proteína G. El anticuerpo anti-hTERT (Clon SCD-A7) es un mAb IgM, producido a partir del clon de hibridoma, HJ123-2C4 (Masutomi y col., 2003) cultivado en cultivos de fibra hueca. En la producción de este anticuerpo, se usó hTERT marcada con un epítipo FLAG amino terminal purificado a partir de

células de insecto infectadas con el vector de baculovirus como inmunógeno para estimular la producción del mAb SCD-A7 de clon anti-hTERT.

El anticuerpo anti-hTERT (Clon 2C4) se describe en (Masutomi y col., 2003). En la producción de este anticuerpo, se usó hTERT marcada con el epítipo FLAG amino terminal purificado a partir de células de insecto infectadas con vector de baculovirus como inmunógeno para estimular la producción del mAb anti-hTERT de clon 2C4. El 2C4 es un mAb de IgM, producido a partir del clon de hibridoma, HJ123-2C4, cultivado en cultivos de fibra hueca.

Los anticuerpos usados en los procedimientos de la presente descripción también están comercialmente disponibles, tales como 2D8 (Novus NB 100-297), C-12 (Santa Cruz 377511), H-231 (Santa Cruz 7212), subconjunto catalítico anti-telomerasa (Rockland 600 -401-252), 10E9-2 (MBL M216-3), 2C4 (Novus NB100-317), SCD-A7 (Sienna Cancer Diagnostics P/N 01-5001).

En un ejemplo, los anticuerpos de la presente descripción están marcados de manera detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen la conjugación de un tinte, fluoróforo u otra molécula indicadora para ensayos, seguimiento o formación de imágenes.

El anticuerpo usado en la presente descripción no se limita a anticuerpos monovalentes y anticuerpos multivalentes representados por IgM, sino que también incluye anticuerpos bivalentes representados por IgG, siempre que se unan a la telomerasa.

Además, el anticuerpo usado en la presente descripción no se limita a moléculas de anticuerpo completas, sino que incluye minicuerpos, diacuerpos y productos modificados de los mismos, siempre que se unan a la telomerasa.

Un minicuerpo comprende fragmentos de anticuerpos que carecen de una porción de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa), y no está particularmente limitado siempre que tenga capacidad de unión a la telomerasa. Con la excepción de la capacidad de unión de la telomerasa, no existen limitaciones particulares en los fragmentos de anticuerpos de la presente descripción, siempre que sean porciones de un anticuerpo completo, pero que preferentemente contengan una región variable de cadena pesada (VH) y/o una región variable de cadena ligera (VL). Además, siempre que tenga capacidad de unión al antígeno de telomerasa, parte de la VH y/o la VL puede ser eliminada. La región variable puede ser quimerizada o humanizada. Los ejemplos específicos de los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Los ejemplos específicos de minicuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv (cadena simple Fv), diacuerpo y sc(Fv)₂ (cadena simple (Fv)₂). Los multímeros de estos anticuerpos (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros y polímeros) también se incluyen en los minicuerpos que se pueden usar para detectar la telomerasa.

Un diacuerpo es un dímero compuesto por dos cadenas de polipéptidos y, en general, las cadenas de polipéptidos están unidas individualmente por un conector de, por ejemplo, cinco residuos, que es lo suficientemente corto como para evitar la unión entre VL y VH en la misma cadena. La VL y la VH que están codificadas por la misma cadena de polipéptidos tienen un conector corto entre ellos y forman un dímero porque no pueden formar un fragmento de región variable de cadena única. Por lo tanto, los diacuerpos tienen dos sitios de unión al antígeno.

Preferentemente, el anticuerpo que se une a la telomerasa es una molécula de anticuerpo de cadena sencilla monoclonal, policlonal, biespecífica, quimérica, recombinante, antiidiotípica, humanizada, o fragmentos de unión a antígeno de la misma.

En una realización preferida según la presente descripción, el procedimiento para la detección de telomerasa usa un anticuerpo primario específico de telomerasa. La unión del anticuerpo primario a la telomerasa se puede visualizar a través de varios procedimientos conocidos. Por ejemplo, podría usarse un anticuerpo secundario marcado que reconoce el anticuerpo primario. En este ejemplo, la etiqueta podría ser una enzima como la peroxidasa de rábano picante, un isótopo radiactivo, un indicador fluorescente, una etiqueta electroquimioluminiscente. La unión del anticuerpo secundario marcado al anticuerpo primario se detectaría mediante evaluación citológica.

En un ejemplo particular, se pone en contacto una muestra con un anticuerpo anti-hTERT primario específico de telomerasa. A continuación, se lava la muestra para eliminar cualquier anticuerpo primario no unido y, después, se aplica a la muestra un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario y se une a una enzima peroxidasa. A continuación, la muestra se lava para eliminar cualquier anticuerpo secundario no unido y se aplica 3,3'-diaminobencidina (DAB) a la muestra. La conversión de DAB en un producto coloreado se visualiza mediante una evaluación citológica de rutina con la presencia de un producto coloreado que indica que la telomerasa está presente en la muestra.

Tipo de cáncer

- Como se describe en esta invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer siempre que las células cancerosas en cuestión expresen telomerasa. Como se describe en esta invención, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, linfoma. Según la invención, el cáncer es cáncer de vejiga.
- 10 Como apreciaría un experto en la materia, cada tipo de cáncer tiene varias características asociadas con el grado de cáncer. Estos grados generalmente están dictados por el nivel de propagación o invasión del cáncer en los tejidos circundantes. Por ejemplo, los grados posteriores de cáncer o "alto grado" generalmente se asocian con un mayor potencial de metástasis y un peor pronóstico. Los cánceres de alto grado generalmente se han diseminado desde el tejido u órgano de origen hacia el tejido circundante o por todo el cuerpo. Por el contrario, el cáncer de "bajo grado"
- 15 puede caracterizarse como un carcinoma *in situ* (CIS), lo que significa que las células proliferan de manera anormal, pero aún están contenidas dentro del tejido u órgano de origen.

- En el contexto del cáncer de vejiga, el cáncer de vejiga de "alto grado" o "grado superior" se refiere a un cáncer de vejiga que tiene más probabilidades de reaparecer y/o evolucionar y/o convertirse en invasivo en un sujeto, incluidos
- 20 los cánceres malignos con mayor potencial de metástasis (cáncer de vejiga que se considera más agresivo). Los cánceres que no se limitan a la vejiga (es decir, el cáncer de vejiga invasivo muscular) se consideran cánceres de vejiga más agresivos.

- Los grados bajos de cáncer de vejiga pueden caracterizarse como un carcinoma *in situ* (CIS), lo que significa que las células proliferan de manera anormal, pero aún están contenidas dentro de la vejiga. El cáncer de vejiga de "grado bajo" o "grado inferior" se refiere al cáncer de vejiga, incluidos los cánceres malignos, con menor potencial de
- 25 recurrencia, progresión e invasión y/o metástasis (es decir, un cáncer de vejiga que se considera menos agresivo). Los cánceres confinados a la vejiga (es decir, el cáncer de vejiga no invasivo muscular, NMIBC) se consideran como cánceres de vejiga menos agresivos.

- 30 El cáncer de vejiga de bajo grado puede clasificarse como benigno. El cáncer de vejiga benigno constituye una masa de células que, en el momento del diagnóstico, carece de la capacidad de invadir el tejido vecino o hacer metástasis. Los cánceres de vejiga benignos generalmente tienen una tasa de crecimiento más lenta que los cánceres malignos y las células benignas generalmente están bien diferenciadas.

- 35 Se prevé que la presente descripción pueda usarse para determinar si un sujeto tiene cáncer de bajo grado.

Preparación de muestras y análisis

- 40 Al realizar los procedimientos de la descripción, se requiere una muestra celular de un sujeto.

- Como se usa en esta invención, el término "muestra" se refiere a una célula o población de células o una cantidad de tejido o fluido de un sujeto. Muy a menudo, la muestra se ha eliminado de un sujeto. La "muestra" incluye extractos y/o derivados y/o fracciones de la muestra. Se considera que términos como "muestra" y "espécimen" son términos
- 45 que, en contexto, pueden usarse indistintamente en la presente descripción. En la presente descripción, cualquier material biológico puede usarse como la muestra mencionada anteriormente siempre que pueda recogerse del sujeto. Se contempla que la muestra usada en la presente descripción sea una muestra biológica de un ser humano.

- La muestra puede incluir material obtenido de una biopsia o resección. Preferentemente, la muestra es una muestra
- 50 fluida. Las muestras descritas en esta invención abarcan una variedad de materiales biológicos seleccionados, entre otros, de entre el grupo que consiste en sangre (incluida sangre completa), plasma sanguíneo, suero sanguíneo, hemolizado, linfa, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, orina, lavados de vejiga, depuraciones de vejiga, líquido cefalorraquídeo, semen, heces, esputo, moco, líquido amniótico, líquido lagrimal, líquido quístico, secreción de glándulas sudoríparas, bilis, leche, lágrimas o saliva. En el contexto del cáncer de vejiga, la muestra de líquido es una
- 55 muestra de lavado o depuración de vejiga urinaria.

- Se prevé que las muestras usadas en los procedimientos de la presente descripción se puedan obtener mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, en el contexto del cáncer de vejiga, se puede obtener la biopsia y el material de resección mediante cistoscopia. En el contexto del cáncer de mama o de tiroides, la muestra se puede
- 60 obtener mediante aspiración con aguja fina. Alternativamente, las células uroteliales de la vejiga se pueden obtener

de una muestra de orina suministrada por un sujeto.

En un ejemplo, una muestra usada en los procedimientos de la presente descripción es una muestra de paciente que comprende células clínicamente relevantes de citología no concluyente. En este ejemplo, las células clínicamente relevantes de citología no concluyente se identifican antes de contactar la muestra con un anticuerpo anti-telomerasa y detectar la presencia o ausencia de unión del anticuerpo a las células clínicamente relevantes de citología no concluyente.

Se prevé que, al realizar el presente procedimiento, la evaluación citológica de la morfología celular y la evaluación citológica destinada a la detección de telomerasa se puedan realizar en muestras separadas obtenidas del mismo paciente. Por ejemplo, un sujeto puede proporcionar dos muestras, enviando una para la evaluación citológica de la morfología celular y la otra para la evaluación citológica destinada a la detección de la telomerasa. En este ejemplo, una evaluación citológica de la morfología celular que no es concluyente para el cáncer puede resolverse mediante la evaluación citológica destinada a la detección de telomerasa, con la detección de telomerasa en células clínicamente relevantes que indica que el sujeto tiene cáncer.

Sin embargo, en un entorno clínico, la obtención de una muestra adicional para pruebas adicionales, por ejemplo, de un paciente cuya evaluación citológica de la morfología celular reveló que una o más células clínicamente relevantes en la muestra tenían una evaluación citológica atípica para la morfología celular, puede ser difícil y puede retrasar pruebas adicionales deseables. Además, cuando se necesita procesar muestras adicionales antes de la prueba, es conveniente minimizar los costos asociados con el procesamiento (por ejemplo, reactivos y similares).

En consecuencia, es preferible que la evaluación citológica de la morfología celular y la evaluación citológica destinada a la detección de telomerasa se realicen en la misma muestra obtenida del sujeto.

Se prevé que el presente procedimiento pueda realizarse preparando dos portaobjetos separados con células de la misma muestra. En este caso, se envía un portaobjetos para la evaluación citológica de la morfología celular y el otro para la evaluación citológica destinada a la detección de la telomerasa. Los procedimientos analizados a continuación, en el Ejemplo 2, pueden usarse para preparar los portaobjetos.

Los presentes inventores han descubierto que, cuando una evaluación citológica de la morfología celular no es concluyente para el cáncer, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a estas células indica que el sujeto tiene cáncer. En consecuencia, es preferible que se use el mismo portaobjetos para la evaluación citológica de la morfología celular y la evaluación citológica destinada a la detección de la telomerasa.

Células clínicamente relevantes

La frase "células clínicamente relevantes" se refiere a aquellas células que el citólogo o citopatólogo está examinando para determinar el estado del cáncer del paciente.

Las células clínicamente relevantes dependerán del cáncer que se esté investigando y, en el contexto de la presente descripción, pueden incluir células ductales y lobulares de la mama, células respiratorias del pulmón, células de la mucosa del tracto digestivo, células del conducto y de los islotes del páncreas, hepatocitos, células foliculares, células mesoteliales, células germinales, células granulosas y células epiteliales del ovario, células glandulares y basales de la próstata, células epiteliales del uréter, células uroteliales, células ductales y tubulares del riñón, células endometriales.

La determinación del cáncer puede realizarse debido al principio general de que las células normales no expresan la telomerasa, mientras que las células malignas expresan la telomerasa. Sin embargo, como apreciaría un experto en la materia, hay excepciones a este principio general ya que ciertos tipos de células no malignas también expresan telomerasa. Estas células no se consideran clínicamente relevantes y deben excluirse de la evaluación. Preferentemente, las células excluidas se seleccionan de entre el grupo que comprende células T, células B, neutrófilos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, mastocitos, células de memoria, células plasmáticas, eosinófilos, células de vesículas seminales, espermatozoides. Más preferentemente, las células excluidas son neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, células de vesículas seminales y espermatozoides. Estas células no son clínicamente relevantes para la evaluación del cáncer y tienen una morfología claramente diferente de las células clínicamente relevantes y, por lo tanto, pueden excluirse fácilmente visualmente cuando se realiza la evaluación citológica.

Por ejemplo, cuando se usan los procedimientos actuales para determinar el cáncer de vejiga, hay varios tipos de

células que un experto en la materia excluiría visualmente del análisis citológico. Estas células incluyen células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, así como células tubulares renales, células de vesículas seminales, espermatozoides y células escamosas. Estas células no son clínicamente relevantes para la evaluación del cáncer de vejiga y tienen una morfología claramente diferente de las células uroteliales normales clínicamente relevantes (células de la pared de la vejiga) y, por lo tanto, pueden excluirse visualmente con facilidad al realizar la evaluación citológica.

Prueba reflexiva

- 10 Se prevé que el procedimiento reivindicado se pueda realizar como una prueba reflexiva. Una "prueba reflexiva" se refiere a una prueba posterior (por ejemplo, una segunda prueba) que se realiza en base a los resultados obtenidos en una prueba previa (por ejemplo, una primera prueba). Al determinar si un sujeto tiene cáncer, la evaluación citológica de una muestra puede conducir a un deseo de analizar otra diana. En el contexto de la presente descripción, el deseo de probar otra diana (es decir, detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes) se debe a una evaluación citológica de la morfología celular que no es concluyente para el cáncer que revela uno o más células atípicas en una muestra.

Pruebas complementarias

- 20 Se prevé que el procedimiento reivindicado se pueda realizar como una prueba complementaria. Una prueba que proporciona información que se suma o ayuda en la interpretación de los resultados de otras pruebas, y proporciona información útil para resolver una evaluación anterior no concluyente puede clasificarse como una prueba complementaria. En un entorno clínico, se puede solicitar una evaluación citológica de la morfología celular para determinar si un sujeto tiene cáncer. Sin embargo, la evaluación citológica puede no ser concluyente para el cáncer.
- 25 Por lo tanto, para ayudar a determinar si el sujeto tiene cáncer, se realiza una evaluación citológica adicional para detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes en una muestra del sujeto como un complemento de la evaluación citológica de la morfología celular. En este contexto, la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una o más células clínicamente relevantes indica que el sujeto tiene cáncer, lo que resuelve la evaluación citológica no concluyente de la morfología celular.
- 30 Al realizar pruebas complementarias, se prevé que la evaluación citológica de la morfología celular se pueda realizar aproximadamente o al mismo tiempo que la detección citológica de la telomerasa. Sin embargo, estas etapas se pueden realizar por separado.

35 Sujetos

- Como se usa en esta invención, el "sujeto" puede ser cualquier organismo que pueda tener cáncer. En una realización preferida, el sujeto es un mamífero. El mamífero puede ser un animal de compañía como un perro o un gato, o un animal de ganado como un caballo o una vaca. En una realización, el sujeto es un ser humano. Términos como "sujeto", "paciente" o "individuo" son términos que, en contexto, pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

- Si se identifican células malignas en un sujeto usando los procedimientos de la presente descripción, el sujeto puede recibir un tratamiento dirigido a o prescrito para el cáncer. Por ejemplo, si se identifica un cáncer de vejiga en un sujeto, el sujeto puede recibir tratamientos dirigidos, como una intervención quirúrgica, una cistectomía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia con anticuerpos o combinaciones de los mismos.

- Se prevé que el procedimiento de la presente descripción pueda usarse para determinar si algún sujeto tiene cáncer. Preferentemente, el procedimiento se usa para determinar el cáncer en un sujeto con síntomas que son indicativos de cáncer. Por ejemplo, en el contexto del cáncer de vejiga, el presente procedimiento sería aplicable a un sujeto que se presente en la clínica con síntomas indicativos de enfermedad de la vejiga, como hematuria (sangre en la orina); urgencia de frecuencia urinaria; sensación de ardor al orinar.

- Una muestra usada en la presente descripción también puede obtenerse de un sujeto que requiere vigilancia regular para controlar el cáncer nuevo o recurrente. Por ejemplo, los sobrevivientes de cáncer pueden requerir vigilancia regular para controlar lesiones nuevas o recurrentes. Los clínicos actualmente confían en los cambios morfológicos en las muestras recuperadas de estos pacientes. Una vez que se identifica una evaluación citológica anormal de la morfología celular en una muestra, el paciente se somete a una investigación adicional para obtener otra muestra de citología y/o biopsia para identificar y confirmar la fuente de la primera población celular anormal. Si se identifica cáncer, el paciente se maneja mediante un procedimiento quirúrgico y/o quimioterapia o inmunoterapia intravesical para erradicar las células malignas. Si una evaluación citológica de la morfología celular no es concluyente para el cáncer,

un médico puede obtener una muestra del sujeto bajo vigilancia y aplicar el presente procedimiento para determinar si tienen cáncer. Si se determina el cáncer, el paciente puede someterse a una investigación adicional para confirmar la fuente de la población de células positivas de telomerasa.

- 5 En el contexto del cáncer de vejiga, la vigilancia después del tratamiento comienza con la evaluación citológica urinaria de la morfología celular cada 3 meses durante uno o dos años, dependiendo de los factores de riesgo del paciente y la estadificación del cáncer. Los intervalos de detección para la evaluación citológica de la morfología celular se extienden, dependiendo de los hallazgos celulares y cistoscópicos previos. Se prevé que la evaluación citológica para detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes se empareje con el régimen de
- 10 vigilancia de citología mencionado anteriormente. Si se resuelve una evaluación citológica no concluyente de la morfología celular al detectar la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes, el paciente puede someterse a una cistoscopia para confirmar la fuente de la población de células positivas para la telomerasa.

Determinación del diagnóstico

- 15 Se prevé que, al realizar el procedimiento, los resultados particulares para la evaluación citológica de la telomerasa y la evaluación citológica de la morfología celular se asociarán con una determinación diagnóstica específica para cada sujeto. Los resultados de la telomerasa y la morfología celular que se pueden obtener al realizar el procedimiento reivindicado se resumen a continuación en la Tabla 2.

20 **Tabla 2:** Determinación diagnóstica y resultado clínico asociado con la evaluación citológica de la morfología celular y la evaluación citológica de los resultados de la telomerasa

Evaluación citológica de la telomerasa	Evaluación citológica de la morfología celular	Determinación del diagnóstico y resultado clínico
+ve	+ve	Los resultados positivos de la telomerasa y la citología indican que el sujeto tiene cáncer. La investigación cistoscópica o la imagen del tracto superior están garantizadas.
+ve	-ve	El resultado positivo de la telomerasa indica que el sujeto tiene cáncer. La investigación cistoscópica o la imagen del tracto superior están garantizadas.
+ve	atípica	El resultado positivo de la telomerasa indica que el sujeto tiene cáncer. La investigación cistoscópica o la imagen del tracto superior están garantizadas
-ve	+ve	El alto valor predictivo positivo y la especificidad de la citología de la morfología celular por sí solos sugieren que el sujeto tiene cáncer. La investigación cistoscópica o la imagen del tracto superior están garantizadas
-ve	-ve	El sujeto está libre de enfermedad.
-ve	atípica	El sujeto potencialmente tiene cambios reactivos/benignos que no están relacionados con el cáncer.

- Los siguientes resultados indican que el sujeto tiene cáncer y, por lo tanto, se justifica la investigación cistoscópica o
- 25 la imagen del tracto superior:

- La unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y la evaluación citológica positiva de la morfología celular
- La unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y la evaluación citológica negativa de la
- 30 morfología celular
- La unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y la evaluación citológica no concluyente de la morfología celular
- Aunque es poco probable que ocurra dada la sensibilidad correspondiente tanto de la evaluación citológica positiva de la morfología celular como de la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes; la
- 35 ausencia de unión de anticuerpos anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y evaluación citológica positiva

de la morfología celular.

La ausencia de unión del anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y la evaluación citológica negativa de la morfología celular indican que las células en la muestra no son malignas. Además, la ausencia de la unión del anticuerpo anti-telomerasa a las células clínicamente relevantes y una evaluación citológica no concluyente de la morfología celular indican que el sujeto tiene potencialmente cambios reactivos/benignos que no están relacionados con el cáncer. En consecuencia, no se justifica una investigación adicional a través de la cistoscopia.

En el contexto de la presente descripción, la evaluación citológica positiva de la morfología celular se refiere a la identificación de células que tienen cambios morfológicos indicativos de cáncer. Los cambios morfológicos que pueden estar asociados con el cáncer incluyen núcleos agrandados con tamaño y forma irregulares, nucléolos prominentes, citoplasma escaso que puede ser de color intenso o pálido. En contraste, la evaluación citológica negativa de la morfología celular se define como la ausencia de cambios morfológicos indicativos de atipia o cáncer.

15 **Diagnóstico definitivo**

Al aplicar los procedimientos de la presente descripción para resolver una evaluación citológica no concluyente para el cáncer y determinar el estado clínico de una muestra si un sujeto tiene cáncer, se considera que una determinación diagnóstica con respecto a la presencia de un cáncer puede hacerse en base a la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a una o más células clínicamente relevantes de una muestra celular obtenida de un sujeto. Sin embargo, la determinación del diagnóstico puede o no ser concluyente con respecto al diagnóstico definitivo sobre el cual un médico tratante determinará un curso de tratamiento. Dicho de otra manera, un experto en la materia entenderá que una determinación de diagnóstico obtenida usando las técnicas de la descripción se refiere al procedimiento de intentar determinar o identificar un posible cáncer.

Los procedimientos de la presente descripción se pueden usar para proporcionar asistencia en la evaluación del riesgo de desarrollo de cáncer y se consideraría que ayudan a hacer una evaluación de una determinación preclínica con respecto a la presencia o naturaleza de una predisposición o un precursor del cáncer. Se consideraría que esto se refiere a hacer un hallazgo de que un sujeto tiene una probabilidad significativamente mayor de desarrollar cáncer.

Se contemplaría que los procedimientos de la presente descripción también podrían usarse en combinación con otros procedimientos de evaluación clínica del cáncer conocidos en la técnica para proporcionar una evaluación de la presencia de cáncer o un mayor riesgo de cáncer.

El diagnóstico definitivo del estado del cáncer de un sujeto que se determina que tiene cáncer se puede validar o confirmar si se justifica, como a través de técnicas de imagen que incluyen PET, MRI, ultrasonido, CT, PET/CT. Por consiguiente, los procedimientos de la presente descripción se pueden usar de manera previa a la detección o al pronóstico para evaluar si un sujeto tiene cáncer y, si está justificado, se puede realizar un diagnóstico definitivo adicional. En el contexto del cáncer de vejiga, se podría usar una investigación adicional por medio de cistoscopia con biopsia o imágenes del tracto superior para obtener un diagnóstico definitivo del estado del cáncer. También se prevé que los procedimientos de la presente descripción pueden ser útiles para seleccionar pacientes para una evaluación clínica usando pruebas de diagnóstico previamente validadas, en particular, la evaluación mediante cistoscopia.

EJEMPLOS

45 **Ejemplo 1: Muestras clínicas**

Se realizó un estudio de prueba de concepto controlado y aprobado por la ética sobre material clínico de pacientes urológicos sospechosos de tener o con antecedentes de cáncer de vejiga (carcinoma de células uroteliales) para demostrar el potencial de diagnóstico clínico de la inmunotinción de la proteína hTERT de la telomerasa. Además, el estudio tuvo como objetivo demostrar que la inmunotinción de hTERT puede diferenciar las muestras obtenidas de pacientes de bajo grado contra los pacientes de alto grado.

En este estudio, los pacientes clínicamente positivos tuvieron cáncer de vejiga comprobado con biopsia (incluyendo tanto los cánceres no invasivos como los invasivos musculares). Todas las determinaciones de etapa y grado se hicieron mediante histología. En el caso donde un paciente tenía múltiples focos de cáncer de vejiga en diferentes etapas/grados, se registró la etapa/grado superior.

Los pacientes clínicamente negativos fueron todos los individuos asintomáticos con buena salud sin antecedentes de enfermedad genitourinaria o todos los pacientes libres de enfermedad que se presentaron, por primera vez o bajo

monitoreo de cáncer de vejiga previo, para la inspección visual de la pared de la vejiga (mediante cistoscopia flexible/rígida).

Se excluyó del estudio a los pacientes que cumplían con cualquiera de los siguientes criterios de exclusión:

- 5 a) el paciente tenía un diagnóstico sospechoso/sin caracterizar de un cáncer que no era de vejiga al momento de la inspección visual (cistoscopia flexible/rígida) sin histología realizada;
- b) pacientes en monitorización que se sometieron a una cistectomía radical;
- 10 c) los pacientes con adenocarcinomas y cánceres de vejiga no uroteliales (incluidos carcinoma de células pequeñas, carcinosarcoma, linfoma primario y sarcoma); y/o
- d) los pacientes con otros tumores genitourinarios (riñón, próstata, uréter superior).

Originalmente, se analizó un total de 253 muestras. De estas, 108 muestras fueron evaluadas usando el protocolo descrito a continuación en el Ejemplo 2, donde se usó una forma de recuperación de epítomos, ya sea por congelación, descongelación o inducida por calor. De las mismas, 90 muestras tenían al menos una célula urotelial (pared de la vejiga) presente. Las 18 muestras restantes se eliminaron de todos los análisis adicionales ya que no se encontraron células relevantes de la pared celular de la vejiga (es decir: células uroteliales). De esas 90 muestras, cinco muestras clínicamente positivas se eliminaron de un análisis posterior debido a la falta de enfermedad comprobada por biopsia. Las 85 muestras restantes están representadas en la Tabla 3 (todas las muestras clínicamente positivas - comprobadas por biopsia) y la Tabla 4 (todas las muestras clínicamente negativas - cistoscópicamente claras), con la evaluación citológica de la morfología celular y los resultados de inmunotinción de telomerasa mostrados para cada uno. Para las ochenta y cinco muestras analizadas, el número de células clínicamente relevantes varió de 5 a 3000 en pacientes clínicamente positivos y negativos.

- 25 • Muestras clínicamente negativas: intervalo de 5 a 900 células uroteliales.
- Muestras clínicamente positivas: intervalo de 10 a 3000 células uroteliales.

Para todos los pacientes, se realizó una inmunotinción de telomerasa y una evaluación citológica paralela de la morfología celular en la misma muestra y se registraron los resultados. La inmunotinción de la proteína hTERT de la telomerasa y la evaluación citológica de la morfología celular se realizaron a ciegas entre sí y a ciegas del estado clínico (obtención por cistoscopia +/- biopsia). La inmunotinción, la evaluación citológica de la morfología celular y la cistoscopia fueron realizadas por médicos y/o patólogos capacitados, registrados para realizar estos ensayos en sus respectivos diagnósticos clínicos y/o campos médicos.

La puntuación de la inmunotinción de telomerasa fue determinada por un citólogo que escaneó un número adecuado de campos de visión para obtener una evaluación confiable del portaobjetos. El número/porcentaje de células uroteliales que mostraban tinción nuclear fue registrado por el citólogo que hizo la lectura. Se estableció un valor de corte para la positividad de la prueba en > 5 % de células uroteliales que muestran tinción nuclear.

Todas las muestras (tanto clínicamente positivas como negativas) que se clasificaron como atípicas después de la evaluación citológica de la morfología celular se proporcionan en la Tabla 5.

Ejemplo 2: Recolección y procesamiento de muestras

La orina evacuada de los pacientes se procesó inmediatamente o se mantuvo a 4°C durante un período no mayor de 4-6 horas antes del procesamiento. Las muestras se transfirieron a tubos de centrifuga estériles de 50 ml y se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminaron los tubos y se desechó el sobrenadante. Las pastillas celulares se resuspendieron en 15 ml de 1x PBS y se transfirieron a tubos de centrifuga estériles de 15 ml. Las muestras se centrifugaron otra vez en 600 x g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se eliminaron nuevamente. Las pastillas celulares se resuspendieron finalmente en 1 ml 1x PBS antes del recuento celular.

Aproximadamente 30.000 células por muestra se transfirieron a tubos de centrifuga estériles de 15 ml y el volumen se ajustó a 10 ml con fluido de recolección Cytospin de Shandon (Thermo Scientific, No. de ref: 6768001, Lote No.: 226955). Los tubos se centrifugaron nuevamente a 600 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó antes de la resuspensión en el fluido de recolección de Cytospin de Shandon a una relación de 250 µL por cada 30.000 células. Se usó un Cytospin de Shandon 4 (Thermo Scientific, número de pieza: A778300101, número de serie: CY6695 1055) para fijar las células al portaobjetos de microscopio de vidrio centrifugando las células a 1000 rpm durante 4 minutos con baja aceleración.

Los portaobjetos con células fijadas se almacenaron en una caja de portaobjetos de microscopio a 4°C durante la noche antes de transferir los portaobjetos al congelador a -20°C.

Todos los resultados de tinción informados aquí se realizaron en las plataformas de tinción automatizadas Ventana Benchmark XT o Ventana Benchmark Ultra. Se han obtenido resultados idénticos, después de la optimización, en otras plataformas de tinción automatizadas que incluyen, entre otras, Leica Bond y Biocare IntelliPATH FLX. Además de las plataformas de tinción automatizadas, también se han obtenido resultados idénticos, después de la optimización, usando un procedimiento de inmunotinción manual.

- 10 Para el procedimiento de inmunotinción manual, los portaobjetos se fijaron posteriormente en acetona:metanol frío al 50 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se lavaron en 1x solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH de 7,4, (número de catálogo: 10010-023, 5x 500 ml Gibco® de Life Technologies) para eliminar el fijador residual y, a continuación, se colocaron en un plato de tinción que contenía tampón citrato pH de 6,0. Los portaobjetos se tratan con una forma manual de recuperación de antígeno durante 30 minutos a 95°C en un horno microondas. Los portaobjetos se lavan nuevamente en 1x PBS, pH de 7,4. Después de la recuperación, los portaobjetos se bloquearon con el 5 % de BSA en 1x PBS con el 0,5 % de Tween 20 durante 1 hora, antes de la incubación con el anticuerpo anti-hTERT primario específico para la telomerasa a temperatura ambiente durante 2 horas y el lavado en 1x PBS con el 0,5 % de Tween 20. Los portaobjetos se tratan con un bloque de anticuerpos post-primarios, Novacastra Post Primary (Ref: RE7159, Lote No. 6012593, 125 mL, de Leica Microsystems) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo en 1x PBS con un 0,5 % de Tween 20. Los portaobjetos se incuban con el anticuerpo secundario Novacastra Novolink Polymer (Ref: RE7161, Lote No. 6012594, 125 mL, Leica Microsystems) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron en 1x PBS con el 0,5 % de Tween 20 antes de la incubación con un sustrato líquido mejorado de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Número de producto: D3939, Sigma) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se enjuagaron en 1x PBS, pH de 7,4 para detener la reacción. A continuación, los portaobjetos se incuban en un 0,5 % de solución de verde de metileno a 60°C durante 5 minutos (Código de producto: M8884-25G, No. de lote: MKBD8768V, 25g, Sigma) y se lavaron en agua del grifo. Los portaobjetos se deshidratan al 0,05 % (v/v) de ácido acético glacial en acetona, a continuación, el 95 % de etanol, el 100 % de etanol seguido de una etapa final en xileno. Los portaobjetos se montan con el medio de montaje Ultramount No: 4 (Código de producto: II065C, Lote #1305141450, 100 ml) e inmediatamente se aplica un cubreobjetos antes de secar durante 1 hora. Los portaobjetos se observan bajo un microscopio óptico.

- Para el procedimiento de inmunotinción automatizado, los portaobjetos se fijaron posteriormente en acetona:metanol frío al 50 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se lavaron/sumergieron en el tampón de dilución de anticuerpos de Ventana (Ventana Medical Systems, Inc Cat No: ADB250) para eliminar el fijador residual y, a continuación, se colocan en la plataforma de tinción automatizada y el antígeno se recuperó a bordo a 95°C durante 8 minutos. Después de la recuperación, los portaobjetos se bloquearon con el reactivo Ventana Discovery (Ventana Medical Systems, Inc, Cat. No.: 760-108) durante 4 minutos, antes de incubarlo con el anticuerpo anti-hTERT primario específico de telomerasa a 36°C durante 32 minutos. Las etapas restantes se basaron en la configuración estándar de la plataforma Ventana usando Ventana Discovery y Ventana UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc, Cat. No.: 760-500). La contratinción con hematoxilina se realizó fuera de bordo en un tinte de inmersión estándar. La tinción de contador también se puede realizar a bordo para obtener resultados idénticos.

Los resultados en esta invención se obtuvieron usando el anticuerpo anti-hTERT (Clon 2C4) descrito en (Masutomi y col., 2003).

Tabla 3: Resultados de la evaluación citológica de la morfología celular y la inmunomecánica de la telomerasa en las muestras clínicamente positivas (comprobado por biopsia).

#	ID	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción	
			Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas
1	WH12-263^	Benigna	Positiva	80
2	AUA12-055	Positiva	Positiva	45
3	WH12-278	Positiva	Positiva	12,5
4	AUA12-057	Atípica	Positiva	10
5	AUA12-059^	Positiva	Positiva	90

#	ID	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción	
			Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas
6	WH12-287	Positiva	Positiva	75
7	WH12-307^	Benigna	Positiva	50
8	WH12-320	Positiva	Positiva	40
9	AUA12-087	Positiva	Positiva	100
10	WH12-373	Benigna	Negativa	0
11	WH12-390	Benigna	Negativa	0
12	AUA12-088	Positiva	Positiva	80
13	AUA12-090	Benigna	Negativa	1
14	WH12-401	Benigna	Negativa	1
15	WH12-406	Atípica	Positiva	30
16	WH 12-407	Benigna	Negativa	0
17	WH12-411	Benigna	Negativa	0
18	RMH12-001	Benigna	Positiva	10
19	WH12-422	Positiva	Positiva	95
20	RMH12-010	Atípica	Positiva	10
21	WH12-424	Benigna	Positiva	10
22	AUA12-101	Positiva	Positiva	80
*Una evaluación citológica "atípica" de la morfología celular indica que las células en la muestra han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas.				
^Muestra teñida nuevamente				

Tabla 4: Resultados de la evaluación citológica de la morfología celular y la inmunomecánica de la telomerasa en las muestras clínicamente negativas (comprobado por biopsia).

#	Identificación Sienna	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción	
			Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas
1	AUA12-054	Benigna	Negativa	1
2	WH12-268	Benigna	Positiva	10
3	WH12-269	Benigna	Negativa	2
4	WH12-274	Benigna	Negativa	0
5	WH12-276	Benigna	Negativa	2
6	WH12-279	Benigna	Negativa	0
7	WH12-282	Benigna	Negativa	0
8	AUA12-058	Atípica	Positiva	20
9	WH12-283	Benigna	Positiva	20
10	WH12-284	Benigna	Negativa	1
11	WH12-285	Benigna	Positiva	10
12	WH12-286	Benigna	Negativa	0

#	Identificación Sienna	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción	
			Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas
13	AUA12-060	Benigna	Negativa	1
14	WH12-288	Benigna	Positiva	10
15	WH12-290	Benigna	Negativa	0
16	WH12-291	Atípica	Positiva	15
17	WH12-294	Positiva	Positiva	50
18	WH12-295	Benigna	Negativa	0
19	WH12-297	Benigna	Negativa	0
20	WH12-298	Benigna	Negativa	0
21	WH12-299	Benigna	Negativa	5
22	WH12-301	Benigna	Negativa	1,5
23	WH12-302	Benigna	Positiva	10
24	WH12-304	Benigna	Negativa	1
25	WH12-305	Benigna	Negativa	1
26	WH12-309	Benigna	Negativa	2
27	WH12-312	Benigna	Negativa	2
28	WH12-313	Benigna	Positiva	20
29	WH12-318	Atípica	Positiva	10
30	WH12-319	Benigna	Negativa	2
31	WH12-322	Benigna	Negativa	1
32	WH12-324	Benigna	Negativa	5
33	WH12-326	Benigna	Negativa	0
34	WH12-327	Benigna	Negativa	0
35	WH12-329	Benigna	Negativa	1
36	WH12-330	Benigna	Negativa	1
37	WH12-331	Benigna	Negativa	2
38	WH12-332	Benigna	Negativa	1
39	WH12-336	Benigna	Negativa	1
40	WH12-337	Benigna	Negativa	1
41	WH12-339	Benigna	Negativa	2
42	WH12-341	Benigna	Negativa	2
43	WH12-342	Benigna	Negativa	2
44	AUA12-061	Benigna	Negativa	5
45	AUA12-064	Benigna	Negativa	2
46	AUA12-065	Benigna	Negativa	5
47	AUA12-092	Benigna	Negativa	1
48	WH12-368	Benigna	Negativa	2
49	WH12-377	Benigna	Negativa	1
50	WH12-378	Benigna	Positiva	10
51	WH12-387	Benigna	Negativa	0

#	Identificación Sienna	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción	
			Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas
52	WH12-396	Benigna	Negativa	0
53	AUA12-093	Benigna	Negativa	5
54	AUA12-095	Benigna	Negativa	1
55	WH12-400	Benigna	Negativa	0
56	WH12-410	Benigna	Negativa	0
57	WH12-412	Benigna	Positiva	10
58	RMH12-006	Benigna	Negativa	2
59	RMH12-007	Atípica	Negativa	5
60	RMH12-008	Benigna	Positiva	20
61	AUA12-098	Benigna	Positiva	20
62	RMH# 12-009	Benigna	Positiva	10
63	AUA12-099	Benigna	Negativa	0
*Una evaluación citológica "atípica" de la morfología celular indica que las células en la muestra han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas.				

Tabla 5: Resultados del estado clínico, la evaluación citológica de la morfología celular y la inmunomecánica de telomerasa en todas las muestras (tanto clínicas como negativas) que tenían una citología atípica.

#	Identificación Sienna	Estado clínico	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la inmunotinción		
				Resultados de las pruebas	% de células uroteliales teñidas	Diagnóstico clínico de seguimiento
1	WH12-174^	Positiva	Atípica	Positiva	80	
2	WH12-178	Negativa	Atípica	Negativa	0	
3	WH12-197	Negativa	Atípica	Negativa	0	
4	WH12-233	Negativa	Atípica	Negativa	0	
5	WH12-234	Negativa	Atípica	Negativa	0	
6	AUA12-057	Positiva	Atípica	Positiva	10	
7	AUA12-058	Negativa	Atípica	Positiva	20	Positiva
8	WH12-289	Positiva	Atípica	Positiva	75	
9	WH12-291	Negativa	Atípica	Positiva	15	Positiva
10	WH12-318	Negativa	Atípica	Positiva	10	Cistectomía
11	WH12-353	Negativa	Atípica	Negativa	0	
12	WH12-361	Negativa	Atípica	Negativa	0	
13	WH12-374	Negativa	Atípica	Negativa	1	
14	WH12-406	Positiva	Atípica	Positiva	30	
15	RMH12-007	Negativa	Atípica	Negativa	5	
16	RMH12-010	Positiva	Atípica	Positiva	10	
*Una evaluación citológica "atípica" de la morfología celular indica que las células en la muestra han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anormalidad de las células malignas.						
^Muestra teñida nuevamente						

Ejemplo 3: La inmunotinción de la telomerasa en muestras de cáncer de vejiga se correlaciona con la enfermedad

5 Se procesaron 85 muestras clínicas en portaobjetos de microscopio y se tiñeron usando el protocolo descrito anteriormente. Los ajustes menores a las condiciones de los anticuerpos o la preparación de la muestra celular se determinaron empíricamente de una muestra a otra. Cada muestra que recibió inmunotinción de telomerasa también se sometió a una evaluación citológica estándar de la morfología celular en la misma muestra. La evaluación citológica de la morfología celular se calificó como positiva, negativa o atípica.

10

La evaluación citológica de la morfología celular y los resultados de inmunotinción de telomerasa se compararon en muestras clínicamente positivas (Tabla 3) y clínicamente negativas (Tabla 4). Se evaluaron 22 resultados clínicamente positivos, de los cuales, 16 tenían una tinción de telomerasa positiva. De las 6 muestras clínicamente positivas restantes, 6 fueron identificadas como benignas después de la evaluación citológica de la morfología celular. En consecuencia, la telomerasa fue indicativa de 16 de 22 (72 %) cánceres malignos de vejiga.

15

63 muestras clínicamente negativas fueron evaluadas, de las cuales, 48 (76 %) tenían una tinción negativa de telomerasa. De las 15 muestras clínicamente positivas restantes, 11 (73 %) fueron identificadas como benignas después de la evaluación citológica de la morfología celular. Las 4 restantes (27 %) fueron identificadas como indeterminadas (n = 3) o positivas (n = 1) después de la evaluación citológica de la morfología celular.

20

La tinción de telomerasa que se correlaciona con la enfermedad se muestra en la Figura 1. No se observó tinción celular en la muestra WH11-107 (clínicamente negativa; Figura 1A). Por el contrario, se observó una tinción celular significativa en la muestra clínicamente positiva WH11-122 (Figura 1B). En esta muestra, se observó tinción positiva, en forma de fuerte tinción nuclear en el 40-75 % de las células uroteliales presentes, en concentraciones óptimas de anticuerpos. Fue interesante observar que, no todas las células uroteliales presentes en esta muestra clínica se tiñeron para la presencia de la proteína hTERT de la telomerasa, lo que sugiere que no todas las células dentro de la muestra eran cancerosas.

25

Ejemplo 4: Resolución de la evaluación citológica negativa falsa e indeterminada de la morfología celular

Cada muestra (n = 85) que recibió inmunotinción de telomerasa también se sometió a una evaluación citológica estándar de la morfología celular en la misma muestra. La evaluación citológica de la morfología celular se calificó como positiva, negativa o atípica. Todas las muestras (clínicamente positivas y negativas) que se clasificaron como atípicas después de la evaluación citológica de la morfología celular (n = 16) se muestran en la Tabla 5 junto con la puntuación asociada de la inmunotinción de telomerasa.

35

Las dieciséis muestras que tenían citología atípica se evaluaron usando uno de dos protocolos de inmunotinción diferentes, con y sin una forma de recuperación de epítomos. Hubo ocho muestras en cada grupo de protocolo, cada una con resultados similares. De las 16 muestras, 5 muestras fueron clínicamente positivas y 11 fueron clínicamente negativas. El procedimiento de inmunotinción de telomerasa evaluó 5 de estas 5 muestras como positivas (con > 5 % de tinción nuclear de células uroteliales positiva).

40

De las 11 muestras clínicamente negativas, 8 mostraron ser negativas mediante la prueba de inmunotinción y tres mostraron ser positivas. De estas tres, dos pacientes en seguimiento longitudinal fueron evaluados posteriormente como clínicamente positivos (biopsia comprobada; muestras clínicas AUA12-058; WH12-291). La otra muestra está actualmente pendiente de seguimiento clínico confirmatorio (WH12-318). Sin embargo, este paciente se sometió a una cistectomía. La realización de este procedimiento indica que el paciente fue positivo para el cáncer de vejiga.

45

Sobre la base del estado clínico actual, el rendimiento de la prueba de inmunotinción de telomerasa es del 80 % en especificidad y del 83 % en sensibilidad, frente a la cistoscopia. Además, el resultado de inmunotinción proporcionó un indicador de diagnóstico correcto (en relación con la cistoscopia) en al menos el 94 % de los casos (15 de 16), (probablemente el 100 % de los casos; 16 de 16, como WH12-318 se sometió a una cistectomía) donde la evaluación citológica de la morfología celular proporcionó una lectura no concluyente.

50

Ejemplo 5: Mejora de la lectura de diagnóstico

El procedimiento único de preparación e inmunotinción de la muestra clínica para la presencia de telomerasa, y al mismo tiempo la evaluación citológica de la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a células clínicamente relevantes y la evaluación citológica de la morfología celular por célula, permitieron mejoras diagnósticas significativas sobre la

60

evaluación citológica de la morfología celular sola.

En la Figura 3, se muestra el poder de resolver una evaluación citológica indeterminada del resultado de la morfología celular, o salvar una evaluación citológica falsamente negativa del resultado de la morfología celular, a través de
5 inmunotinción de telomerasa por célula. En esta figura, las células que se muestran en todos los paneles son de una muestra clínica de cáncer de vejiga de bajo grado inmunotinción óptima para la telomerasa.

En el Panel A, se muestra una célula escamosa no vesical. Esta célula no proviene de la vejiga y está excluida visualmente por citólogos capacitados de todas las determinaciones de diagnóstico. Sirve como control negativo de
10 inmunotinción en esta muestra clínica. Como se muestra en el panel A, la célula escamosa está completamente desprovista de tinción nuclear, como se esperaba.

En el Panel B, se muestran las células uroteliales normales. Ambas células mostradas tienen formas bien definidas y relaciones nucleares: citoplasmáticas. Para un citólogo capacitado, estas células se ven completamente normales y
15 se definirían adecuadamente como citología negativa después de la evaluación citológica de la morfología celular. La ausencia de inmunotinción nuclear para la proteína hTERT de la telomerasa sugiere que estas células uroteliales, aunque se encontraron en la orina anulada de un paciente que se sabe que tiene cáncer de vejiga de bajo grado, muy probablemente sean células uroteliales normales de un área normal de la pared de la vejiga.

El panel C muestra una célula urotelial morfológicamente normal de forma definida y relación nuclear:citoplasmática, aunque, en este caso, se muestra una fuerte inmunotinción nuclear para la proteína hTERT de la telomerasa. Esta
20 célula urotelial citológicamente negativa, por el contrario, expresa niveles anormales de telomerasa nuclear y, por consiguiente, es extremadamente probable que sea una célula maligna en etapa temprana que aún no ha mostrado ninguna anomalía morfológica. Esta conclusión está respaldada por la fuerte correlación clínica entre la inmunotinción
25 de hTERT de la telomerasa y el resultado clínico que se muestra en la Figura 2.

En ausencia de inmunotinción de telomerasa en la misma muestra y la misma célula en la que se realizó una determinación basada en una evaluación citológica de la morfología celular, esta célula habría sido definida como normal o no cancerosa por un citólogo y/o patólogo capacitado. Esto sería incorrecto y daría lugar a lo que se llama
30 falso negativo en esa célula específica. En consecuencia, la inmunotinción por célula de la telomerasa determinó correctamente esta denominación.

En el Panel D, una célula urotelial que muestra rasgos atípicos menores, no lo suficientemente fuerte como para ser denominada citológicamente como positiva después de la evaluación citológica de la morfología celular por un citólogo
35 capacitado, muestra una fuerte inmunotinción de telomerasa nuclear. Este es un ejemplo en el que las células individuales clasificadas como indeterminadas después de la evaluación citológica de la morfología celular aún pueden resolverse con éxito mediante la inmunotinción de hTERT de la telomerasa en condiciones óptimas.

Ejemplo 6: Predecir el desarrollo posterior del cáncer de vejiga

40 Tres muestras clínicamente negativas, clasificadas como no concluyentes después de la evaluación citológica de la morfología celular, mostraron ser positivas por la prueba de inmunotinción. De estas tres muestras, dos pacientes en seguimiento longitudinal fueron evaluados posteriormente como clínicamente positivos (biopsia comprobada; muestras clínicas AUA12-058; WH12-291). La otra muestra está actualmente pendiente de seguimiento clínico
45 confirmatorio (WH12-318), sin embargo, este paciente se sometió a una cistectomía. La realización de este procedimiento indica que el paciente fue positivo para el cáncer de vejiga.

Estos datos sugieren que la telomerasa puede ser indicativa de pacientes con mayor riesgo de desarrollar cáncer de vejiga. En consecuencia, los pacientes clínicamente negativos para el cáncer, que han proporcionado muestras que
50 tienen tinción de telomerasa positiva, pueden someterse a una mayor vigilancia clínica.

Ejemplo 7: Tinción de telomerasa en un entorno clínico para diagnosticar cáncer de vejiga

Un paciente se presenta en una clínica con síntomas indicativos de enfermedad de la vejiga como hematuria (sangre
55 en la orina), urgencia de frecuencia urinaria o sensación de ardor al orinar. Si bien estos síntomas pueden ser causados por otras afecciones mucho menos graves que el cáncer, como una infección de orina, son característicos del cáncer de vejiga.

En consecuencia, se obtiene una muestra de orina del paciente y se envía para la evaluación citológica de la
60 morfología celular y la inmunotinción de telomerasa. Si los resultados de la evaluación citológica de la morfología

celular no son concluyentes para el cáncer de vejiga, el médico puede usar los resultados de inmunotinción de telomerasa para determinar si el paciente tiene cáncer de vejiga.

Si la muestra es telomerasa positiva, la sensibilidad mejorada del ensayo de telomerasa sobre la citología al menos
5 garantiza la investigación cistoscópica para el cáncer de vejiga.

A continuación, se puede realizar una cistoscopia en el paciente y, si posteriormente se identifica el cáncer de vejiga, se puede establecer el régimen de tratamiento adecuado.

10 **Ejemplo 8: Tinción de telomerasa en un entorno clínico para identificar el riesgo de desarrollar cáncer de vejiga**

Se obtiene una muestra de orina de un paciente que presenta síntomas similares a los discutidos anteriormente. La muestra se envía para evaluación citológica de la morfología celular y la inmunotinción de telomerasa. Si los resultados
15 de la evaluación citológica de la morfología celular no son concluyentes y la muestra es telomerasa positiva, el médico puede solicitar una investigación cistoscópica para el cáncer de vejiga.

Si el cáncer de vejiga no se identifica posteriormente en el paciente después de la cistoscopia, la evidencia de la asociación entre la unión de un anticuerpo anti-telomerasa a las células clínicamente relevantes y el desarrollo de
20 cáncer indica que el paciente probablemente tiene un mayor riesgo de cáncer. En consecuencia, se puede establecer el régimen de vigilancia adecuado.

Ejemplo 9: Inmunotinción comparativa de telomerasa en muestras de cáncer de vejiga

25 La tinción de telomerasa se comparó en muestras clínicas usando los procedimientos descritos anteriormente en el Ejemplo 2. La inmunotinción comparativa se realizó usando anticuerpos SCD-A7, Novus 2C4, Novus NB 100-297, Santa Cruz 377511, Santa Cruz 7212, Rockland 600 -401-252 y MBL M216-3. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

30 En consecuencia, se pueden usar varios anticuerpos anti-telomerasa para resolver evaluaciones citológicas no concluyentes.

Tabla 6: Evaluación citológica de la morfología celular y resultados de la inmunotinción de telomerasa en muestras clínicamente validadas (probados por biopsia)

Identificación Sienna	Estado clínico	Evaluación citológica de la morfología celular*	Resultado de la prueba de anticuerpos anti-telomerasa							
			Sienna SCD-A7	Novus 2C4	Novus 100-297	NB 377511	Santa Cruz SC- 7212	Cruz 401-252	Rockland 600- MBL	M216-3 de
AUA14-151	Negativa	Atípica	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
AUA14-160	Positiva	Atípica	Positiva	#	#	#	#	#	#	Positiva
AUA14-168	Positiva	Atípica	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
AUA14-173	Positiva	Atípica	Positiva	#	#	Positiva	Positiva	Positiva	#	#
AUA14-187	Positiva	Atípica	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Negativa
RMH13-058	Positiva	Atípica	Positiva	#	Positiva	#	#	#	#	#
RMH13-069	Positiva	Atípica	Positiva	Positiva	#	#	#	Positiva	Positiva	#
% de evaluación citológica no concluyente correctamente resuelta			7/7	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4
% - 2 muestras excluidas del análisis ya que no se pudo determinar el estado clínico; AUA14-158; AUA14-172.										
# - Insuficiente material disponible para la tinción.										
*Una evaluación citológica "atípica" de la morfología celular indica que las células en la muestra han perdido su apariencia normal pero no han alcanzado el nivel de anomalía de las células malignas.										

Ejemplo 10 - Algoritmo de lectura de portaobjetos

Se han evaluado dos algoritmos de lectura de portaobjetos usando las muestras clínicas descritas en el Ejemplo 1. El primer algoritmo implica contar células uroteliales y escamosas con tinción nuclear positiva para la telomerasa. El resultado positivo de la prueba se determina en función del porcentaje de células teñidas. El segundo algoritmo implica evaluar los cambios morfológicos en las células uroteliales en combinación con la tinción nuclear positiva para la telomerasa a fin de obtener un resultado positivo.

Algoritmo de lectura - 5 % de corte

Los portaobjetos se evaluaron con un aumento de x200-400 y se escanearon visualmente a través de un número adecuado de campos de visión para identificar más de 20 células uroteliales. Se registraron los siguientes números celulares:

1. El número de células uroteliales que muestran tinción nuclear.
2. El número de células uroteliales identificadas/evaluadas en el procedimiento de registro del punto (1) anterior.

También se observaron los siguientes detalles:

1. Características de tinción urotelial (nuclear/citoplasmática).
 2. Porcentaje de células escamosas que muestran tinción nuclear (incluidas ambas células con o sin tinción citoplasmática).
 3. Número total de células epiteliales escamosas evaluadas.
- Para este algoritmo, un resultado positivo de la prueba se definió como un portaobjetos en el que más del 5 % de las células uroteliales demostraron tinción nuclear positiva (es decir, más de aproximadamente 2 a 3 células con tinción nuclear positiva por 20 células uroteliales).

Algoritmo de lectura - basado en la morfología

Los portaobjetos se evaluaron para identificar las células uroteliales que demuestran atipia morfológica (por ejemplo, alta relación nuclear/citoplasmática, variación de cromatina nuclear, contornos nucleares irregulares). Las células que demuestran atipia morfológica se evaluaron para detectar la presencia o ausencia de una señal inmunocitoquímica positiva.

Las preparaciones de orina teñidas con Papanicolau correspondientes se examinaron junto con el portaobjetos de inmunocitoquímica de telomerasa durante la evaluación de muestras clínicas.

Para este algoritmo, un resultado positivo de la prueba se definió como un portaobjetos en el que las células uroteliales demostraron atipia morfológica en presencia de una tinción nuclear positiva.

Comparación de algoritmos de lectura

La comparación de los algoritmos de lectura anteriores se resume en la Tabla 7. Las revisiones de los portaobjetos usando la morfología en combinación con la tinción positiva de telomerasa de células resultó en una sensibilidad general del 83,3 %, mientras que el 5 % del algoritmo de corte resultó en una sensibilidad general del 57,1 %. La sensibilidad de la detección de carcinoma urotelial de grado bajo aumentó al 75,0 % usando el algoritmo basado en la morfología en comparación con el 50,0 % alcanzado con el 5 % de algoritmo de corte.

El algoritmo basado en la morfología demuestra una mayor sensibilidad y especificidad para la detección general del carcinoma urotelial, así como una mayor sensibilidad y especificidad para las clasificaciones de enfermedades de alto y bajo grado en comparación con el 5 % de algoritmo de corte.

Sin embargo, el 5 % de algoritmo de corte también proporcionó una estrategia efectiva para resolver una evaluación citológica no concluyente en las muestras analizadas de cáncer de vejiga. Por ejemplo, se anticipa que 1 célula con tinción nuclear positiva por cada 20 células uroteliales indica un resultado positivo de la prueba.

Tabla 7. Comparación de los resultados del 5 % de algoritmo de corte y el algoritmo basado en la morfología.

Estadísticas de la prueba:	5 % de algoritmo de corte			Algoritmo basado en la morfología		
	General	Enfermedad de alto grado	Enfermedad de bajo grado	General	Enfermedad de alto grado	Enfermedad de bajo grado
Número	31	20	27	27	18	23
Sensibilidad	57,1 %	100,0 %	50,0 %	83,3 %	100,0 %	75,0 %
Especificidad	58,8 %	58,8 %	58,8 %	86,7 %	86,7 %	86,7 %
Índice de probabilidad para la prueba positiva (LR+)	1,39	2,43	1,21	6,25	7,50	5,63
Índice de probabilidad para la prueba negativa (LR-)	0,73	0,00	0,85	0,19	0,00	0,29
VPP = valor predictivo positivo	53,3 %	30,0 %	41,7 %	83,3 %	60,0 %	75,0 %
Valor predictivo negativo (VPN)	62,5 %	100,0 %	66,7 %	86,7 %	100,0 %	86,7 %
Exactitud del diagnóstico	58,1 %	65,0 %	55,6 %	85,2 %	88,9 %	82,6 %

BIBLIOGRAFÍA

- 5 Ausubel y col. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (incluidas todas las actualizaciones hasta ahora).
Blackburn y col. (2005) Molecular Cancer Research 3, 477-482.
Bodnar y col. (1998) Science 279, 349-52.
Brown (1991) Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press.
- 10 Cibas y col. (2009) The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology, Am J Clin Pathol., 132, 658-665.
Coligan y col. (1994) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluidas todas las actualizaciones hasta ahora).
Glover y col. (1991) DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes 1 a 4, IRL Press.
Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory.
- 15 Khalbuss y Goodison (2006) CytoJournal 3, 18.
Parkin y col. (1999) CA Cancer J Clin 49, 33-64.
Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons.
Masutomi y col., (2003) Cell, 114 (2), 241-253.
National Cancer Institute Fine-Needle Aspiration of Breast Workshop Subcommittees (1997) Diagn Cytopathol 16 (4), 295-311.
- 20 Raab y col. (2007) Am J Clin Pathol 127, 946-953.
Rosenthal y col. (2013) Cancer Cytopathol 121, 15-20.
Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
Schneeweiss y col. (1999) J Urol 161, 1116-1119.
- 25 Suen y col. (1997) Diagn Cytopathol 17(4), 239 - 247.
Zaak y col. (2001) Urology 57, 690-694.

REIVINDICACIONES

1. La presente invención proporciona un procedimiento para resolver una evaluación citológica no concluyente de células epiteliales de vejiga en una muestra obtenida de un paciente, comprendiendo el procedimiento
 - 5 poner en contacto las células de la muestra con un anticuerpo anti-telomerasa, donde la muestra comprende células epiteliales de vejiga que tienen una morfología celular que es indeterminada en cuanto a su malignidad, y detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga, donde la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga indica la presencia de células epiteliales de la vejiga malignas.
- 10 2. Un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer de vejiga cuando una evaluación citológica de la morfología de las células epiteliales de la vejiga no es concluyente para el cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento:
 - 15 i) poner en contacto una muestra de células epiteliales de la vejiga obtenidas del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa;
 - ii) realizar una evaluación citológica de las células epiteliales de la vejiga para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga en la muestra;
 - donde la unión del anticuerpo a una o más células epiteliales de la vejiga en la muestra indica que el sujeto tiene cáncer de vejiga.
- 20 3. Un procedimiento para determinar si un sujeto tiene cáncer de vejiga, comprendiendo el procedimiento:
 - i) realizar una evaluación citológica de la morfología celular en una muestra de células epiteliales de la vejiga obtenidas del sujeto para determinar la morfología de una o más células epiteliales de la vejiga en la muestra;
 - 25 ii) poner en contacto una muestra de células epiteliales de la vejiga obtenidas del sujeto con un anticuerpo anti-telomerasa y realizar una evaluación citológica de la muestra celular para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga en la muestra;
 - donde, cuando la evaluación citológica de la morfología celular es indeterminada del cáncer de vejiga, la unión del anticuerpo a una o más células epiteliales de la vejiga indica que el sujeto tiene cáncer de vejiga.
- 30 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la unión del anticuerpo a al menos aproximadamente el 5 % de las células epiteliales de la vejiga en la muestra indica que el sujeto tiene cáncer de vejiga.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 3, donde la evaluación citológica para determinar la morfología celular y la evaluación citológica para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga se realizan simultáneamente en las mismas células.
- 40 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la muestra es una muestra fluida.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, donde la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en orina, lavados de vejiga y depuraciones de vejiga.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el anticuerpo anti-telomerasa
 - 45 es una molécula de anticuerpo monoclonal, policlonal, biespecífico, quimérico, recombinante, antiidiotípico, humanizado, de cadena única o fragmentos de unión a antígeno del mismo.
9. Un procedimiento para resolver una evaluación citológica no concluyente de las células epiteliales de la vejiga en una muestra de orina obtenida de un paciente, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células
 - 50 epiteliales de citología no concluyente de la muestra con un anticuerpo anti-telomerasa y realizar una evaluación citológica de las células epiteliales de la vejiga para detectar la unión del anticuerpo a las células epiteliales de citología no concluyente, donde la unión del anticuerpo a las células epiteliales de la vejiga de citología no concluyente indica la presencia de células epiteliales de vejiga malignas.
- 55 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la detección de dicha unión de anticuerpos es mediante un inmunoensayo automatizado.
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la dicha detección de unión de anticuerpos es mediante una evaluación citológica.

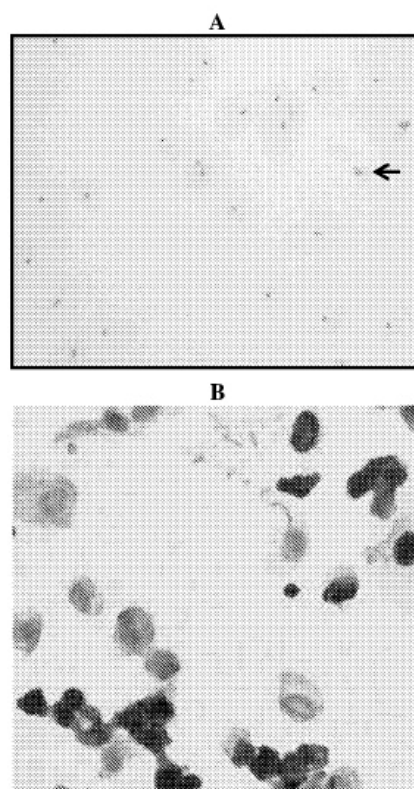


Figura 1

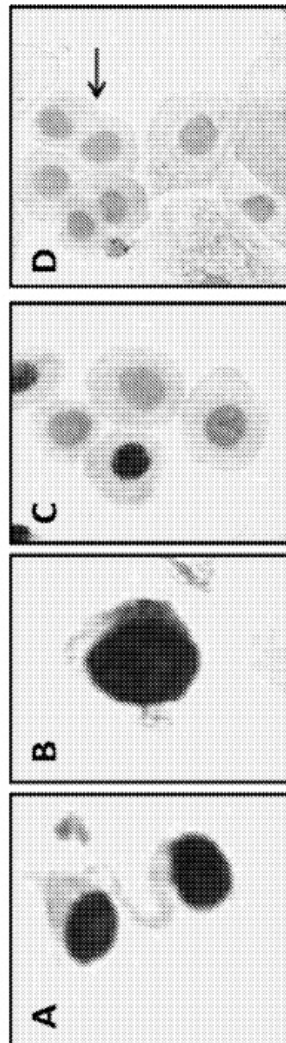


Figura 2

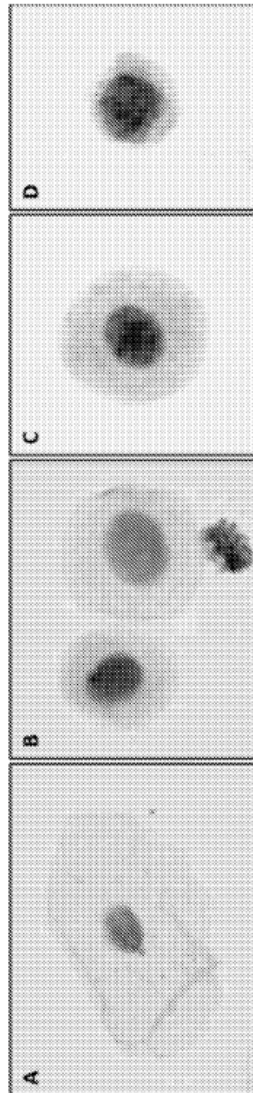


Figure 3