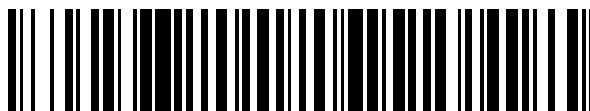


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 180**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2000 E 05024790 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 1650313**

54 Título: **Método y conjunto de sondas para detectar el cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

**05.03.1999 US 264149**

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

**05.02.2015**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (50.0%)  
1300 E. Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US y  
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION  
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HALLING, KEVIN C.;  
JENKINS, ROBERT B.;  
KING, WALTER;  
SOKOLOVA, IRINA A. y  
SEELIG, STEVEN A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 528 180 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método y conjunto de sondas para detectar el cáncer de vejiga

5 La presente invención se refiere a medios y métodos para detectar el cáncer.

10 El cáncer de vejiga representa el quinto neoplasma más común y la duodécima causa de muerte por cáncer en los Estados Unidos, donde más de 53 000 nuevos casos se diagnostican por año. Más del 95% de los casos de cáncer de vejiga en los Estados Unidos son carcinoma de células transicionales (TCC, a veces denominado carcinoma urotelial). El estadio tumoral es el mejor predictor del pronóstico para los pacientes con cáncer de vejiga. El cáncer de vejiga se clasifica en estadios según la profundidad de la invasión del tumor y si se encuentra o no en los ganglios linfáticos o hay metástasis a distancia. Los tumores papilares no invasivos (el tipo menos agresivo y más común de tumor de vejiga) se denominan tumores en estadios pTa. El TCC "plano", más comúnmente conocido como "carcinoma in situ" (CIS) es un tumor más agresivo pero menos común que se asocia a una alta velocidad de avance de la enfermedad invasiva. El CIS se asigna a un estadio de pTIS. Los tumores que han invadido a través de la membrana basal del epitelio en la lámina propia subyacente se asignan a un estadio de pT1. Un tumor que ha invadido el músculo de la vejiga es un tumor en estadio pT2. La invasión a través del músculo en el tejido que rodea la vejiga es un tumor pT3. La invasión en órganos circundantes es un tumor pT4. El término cáncer de vejiga "superficial" hace referencia a los tumores pTa, pTIS y pT1. El cáncer de vejiga que invade el músculo hace referencia a los tumores pT2 pT3 y pT4.

20 Aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de vejiga se presentan como cáncer de vejiga "superficial" y el 20% restante como cáncer de vejiga invasivo del músculo. Los pacientes con cáncer de vejiga "superficial" no requieren cistectomía (es decir, la extirpación de la vejiga) pero tienen un alto riesgo de recidiva tumoral y son supervisados por recidiva tumoral o avance con regularidad (generalmente cada 3 meses durante los primeros 2 años, cada 6 meses durante los dos años siguientes y cada año subsiguiente). El tratamiento para el cáncer de vejiga superficial consiste generalmente en la extirpación quirúrgica de tumores papilares y el tratamiento del CIS con Bacillus-Calmette Guerin (BCG). Los pacientes con enfermedad invasiva del músculo son tratados por cistectomía y tienen un pronóstico relativamente malo en comparación con los pacientes con cáncer de vejiga "superficial". Desafortunadamente, 80-90% de los pacientes con cáncer de vejiga invasivo del músculo se presentan inicialmente con enfermedad invasiva del músculo. Una gran parte de las aproximadamente 10 000 muertes al año por cáncer de vejiga es representada por este grupo de pacientes. El hecho de que muchos pacientes con cáncer de vejiga avanzado presenten esa forma sugiere que los programas de detección sistemática del cáncer de vejiga en etapas más tempranas podrían ayudar a reducir la mortalidad global de la enfermedad. De hecho, al menos dos estudios de detección de gran proyección sugieren que la detección sistemática ayuda a identificar el cáncer de vejiga en etapas más tempranas. Messing et al., Urology, 45:387-396, 1995; y Mayfield y Whelan, Br. J. Urol., 82(6):825-828, 1998.

40 La citoscopia y la citología de la orina han sido los pilares para la detección del cáncer de vejiga en las últimas décadas. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la citología tiene una sensibilidad decepcionantemente baja para la detección del cáncer de vejiga. Mao et al., Science, 271:659-662, 1996; Ellis et al., Urology, 50:882-887, 1997; y Landman et al., Urology, 52:398-402, 1998. Por esta razón, ha habido un gran interés en el desarrollo de nuevos ensayos que tengan una mayor sensibilidad para la detección del cáncer de vejiga. Los ejemplos de nuevos ensayos que se han desarrollado para la detección del cáncer de vejiga incluyen pruebas que detectan antígenos de tumor de vejiga, por ej. la prueba BT (C.R. Bard, Inc., Murrayhill, NJ), NMP-22, FDP, etc., pruebas que detectan una mayor actividad de la telomerasa (generalmente asociada a neoplasia), u otras pruebas que detectan alteraciones genéticas en células urinarias y lavados vesicales (por ej. hibridación in situ fluorescente (FISH) y análisis de microsátélites). Aunque el análisis FISH puede ser más sensible que otros métodos de detección, se deben contar grandes cantidades de células, y en consecuencia, el análisis demanda mucho tiempo y es costoso.

50 La presente invención busca superar o mejorar las deficiencias del estado anterior de la técnica proporcionando medios y métodos para la detección rápida, y no obstante sensible, del cáncer.

55 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un método rápido y sensible para la detección del cáncer se puede basar en la presencia de células aneusómicas en un subconjunto de células seleccionadas de la muestra biológica. La selección de un subconjunto de células a ser evaluadas respecto a anomalías cromosómicas reduce la cantidad de células a analizar, permitiendo que el análisis se lleve a cabo de manera rápida, manteniendo e incluso mejorando simultáneamente la sensibilidad. La invención también proporciona un conjunto de sondas cromosómicas elegidas para proporcionar una sensibilidad óptima en el análisis FISH y kits para detectar el cáncer de vejiga que incluyen conjuntos de sondas cromosómicas.

60 En un aspecto, la invención proporciona un método de detección sistemática del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende:

65 (a) hibridar un conjunto que comprenda sondas cromosómicas centroméricas para cada uno de los cromosomas 3, 7 y 17 a una muestra biológica de dicho sujeto;

- (b) seleccionar las células de dicha muestra biológica sobre la base de una o más anomalías citológicas; y  
 (c) determinar la presencia o ausencia de células aneusómicas en dichas células seleccionadas examinando el patrón de hibridación de dicho conjunto de sondas cromosómicas en cada una de dichas células seleccionadas, donde las células con más de dos copias de cromosomas múltiples se consideran aneusómicas,

donde la presencia de células aneusómicas en las células seleccionadas se considera positiva para el cáncer. La invención es esencialmente un proceso en dos etapas para la detección rápida y no obstante sensible del cáncer.

La muestra biológica puede ser orina o lavados vesicales, y se puede concentrar antes de usar. La orina es una muestra biológica particularmente útil. Las células se pueden seleccionar por cualquier medio adecuado, como morfología nuclear que incluye el tamaño y la forma del núcleo. La morfología nuclear puede ser evaluada por tinción con DAPI.

Las sondas cromosómicas se pueden marcar, por ejemplo, fluorescentemente.

La invención también proporciona un conjunto compuesto por sondas cromosómicas centroméricas para cada uno de los cromosomas 3, 7 y 17 destinado al uso en un método de detección del cáncer, así como un kit para detectar el cáncer de vejiga que contiene dicho conjunto. Las sondas cromosómicas se pueden marcar, por ejemplo, fluorescentemente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que le da comúnmente un experto en el área a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento para practicar la invención, los métodos y los materiales adecuados se describen más adelante. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente y de las reivindicaciones.

La invención proporciona ventajosamente un método rápido y sensible para detectar el cáncer de vejiga y se puede utilizar para detectar sujetos que corren riesgo de padecer cáncer de vejiga, o para controlar una recidiva tumoral en pacientes con diagnóstico de cáncer de vejiga. En general, un conjunto de sondas cromosómicas se hibrida a las células (de la orina u otra muestra biológica) en un portaobjetos. Luego, las células del frotis se analizan visualmente con un aumento relativamente bajo (por ejemplo 200-400 X) en busca de características morfológicas fuertemente sugestivas de neoplasia (por ejemplo, aumento del tamaño nuclear o forma nuclear irregular). A continuación, los núcleos de las células citológicamente anormales se examinan para determinar anomalías cromosómicas cambiando el objetivo a un aumento mayor (por ej. 600-1000 X) y "dando la vuelta a" los filtros para determinar si la célula es o no aneusómica. El uso de este proceso reduce notablemente el tiempo empleado en evaluar las células que tienen una baja probabilidad de ser neoplásicas y permite al examinador enfocar sus esfuerzos en las células que tienen mucho mayor probabilidad de ser neoplásicas y muestran aneusomía.

#### *Hibridación in situ*

La presencia o ausencia de células aneusómicas se puede determinar por cualquier medio adecuado, como la hibridación in situ. Las "células aneusómicas" son células que tienen un número anormal de cromosomas o tienen alteraciones cromosómicas estructurales como pérdida hemicigótica u homocigótica de una región cromosómica específica. Normalmente, las células aneusómicas tienen una o más ganancias de cromosomas, es decir, tres o más copias de cualquier cromosoma determinado se consideran una prueba positiva en los métodos descritos en este documento, aunque las células que exhiben monosomía y nulisomía también pueden ser consideradas como una prueba positiva bajo ciertas circunstancias. En general, la hibridación in situ incluye los pasos de fijar una muestra biológica, hidridar una sonda cromosómica al ADN objetivo contenido en la muestra biológica fijada, lavar para eliminar la unión no específica y detectar la sonda hibridada.

Una "muestra biológica" es una muestra que contiene células o material celular. Por lo general, la muestra biológica se concentra antes de la hibridación para aumentar la densidad celular. Los ejemplos no limitantes de muestras biológicas son orina, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido pleural, esputo y líquido peritoneal, lavados vesicales, secreciones (por ej. secreción mamaria), lavados orales, muestras de tejidos, preparados citológicos o aspirados con aguja fina. El tipo de muestra biológica que se emplea en los métodos descritos aquí depende del tipo de cáncer que uno desee detectar. Por ejemplo, la orina y los lavados vesicales proporcionan muestras biológicas útiles para la detección del cáncer de vejiga. Para las muestras tisulares, el tejido se puede fijar y colocar en parafina para preparar cortes, o congelar y preparar cortes finos.

Habitualmente, las células se recogen de la muestra biológica empleando técnicas estándar. Por ejemplo, las células se pueden recoger por centrifugación de una muestra biológica como orina y resuspensión de las células sedimentadas. Normalmente, las células se resuspenden en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de centrifugar la suspensión de células para obtener un sedimento de células, las células se pueden fijar, por ejemplo, en soluciones de ácido-alcohol, soluciones de ácido-acetona o aldehídos como formaldehído,

paraformaldehído y glutaraldehído. Por ejemplo, se puede usar un fijador que contenga metanol y ácido acético glacial en una relación 3:1, respectivamente. También se puede usar una solución de formol tamponado neutro, que incluye aproximadamente 1% a 10% de formaldehído al 37-40% en una solución acuosa de fosfato de sodio. Se pueden preparar frotis que contengan las células eliminando la mayoría de este fijador, dejando las células concentradas suspendidas en sólo una porción de la solución.

La suspensión de células se aplica a portaobjetos de modo que las células no se superpongan en el frotis. La densidad celular se puede medir con un microscopio de luz o de contraste de fases. Por ejemplo, las células recogidas a partir de una muestra de orina de 20 a 100 ml se resuspenden generalmente en un volumen final de aproximadamente 100 a 200 µl de fijador. Se vierten tres volúmenes de esta suspensión (generalmente 3, 10 y 30 µl), en pocillos de 6 mm de un portaobjetos. Luego se evalúa la celularidad (es decir, la densidad celular) en estos pocillos con un microscopio de contraste de fases. Si el pocillo que contiene el mayor volumen de la suspensión de células no tiene suficientes células, la suspensión de células se concentra y se coloca en otro pocillo.

Antes de la hibridación in situ, se desnaturalizan las sondas cromosómicas y el ADN cromosómico contenido en la célula. La desnaturalización se realiza generalmente mediante incubación en presencia de pH alto, calor (por ejemplo, temperaturas desde aproximadamente 70 °C hasta aproximadamente 95 °C), solventes orgánicos como formamida y haluros de tetraalquilamonio o combinaciones de éstos. Por ejemplo, el ADN cromosómico se puede desnaturalizar mediante una combinación de temperaturas superiores a 70 °C (por ejemplo, de aproximadamente 73 °C) y un tampón de desnaturalización que contenga 70% de formamida y 2 X SSC (cloruro de sodio 0.3 M y citrato de sodio 0.03 M). Las condiciones de desnaturalización se establecen habitualmente de modo de preservar la morfología celular. Las sondas cromosómicas se pueden desnaturalizar por calor. Por ejemplo, las sondas se pueden calentar hasta aproximadamente 73 °C durante alrededor de cinco minutos.

Después de eliminar los productos químicos o las condiciones de desnaturalización, las sondas se aparean al ADN cromosómico en condiciones de hibridación. Las "condiciones de hibridación" son condiciones que facilitan el apareamiento entre una sonda y el ADN cromosómico que es el objetivo. Las condiciones de hibridación varían, dependiendo de las concentraciones, las composiciones de bases, las complejidades y las longitudes de las sondas, así como de las concentraciones de sal, las temperaturas y la duración de la incubación. Cuanto mayor es la concentración de la sonda, mayor es la probabilidad de formar un híbrido. Por ejemplo, las hibridaciones in situ se realizan normalmente en tampón de hibridación que contiene 1-2 X SSC, 50% de formamida y bloqueando el ADN para suprimir la hibridación inespecífica. En general, las condiciones de hibridación, como las descritas antes, incluyen temperaturas de aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 55 °C, y duraciones de incubación de alrededor de 0.5 hora hasta alrededor de 96 horas. Más particularmente, la hibridación se puede realizar a una temperatura entre aproximadamente 32 °C y aproximadamente 40 °C durante alrededor de 2 a alrededor de 16 horas.

La unión no específica de sondas cromosómicas al ADN fuera de la región que es el objetivo puede ser eliminada por una serie de lavados. La temperatura y la concentración de sal en cada lavado depende de la rigurosidad deseada. Por ejemplo, para condiciones de gran rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 80 °C, utilizando desde 0.2X hasta alrededor de 2X SSC, y desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 1% de un detergente no iónico como Nonidet P-40 (NP40). Se puede reducir la rigurosidad disminuyendo la temperatura de los lavados o aumentando la concentración de sal en los lavados.

#### *Sondas cromosómicas*

Las sondas adecuadas para la hibridación in situ de acuerdo con la invención se hibridan (es decir, forman un dúplex) al ADN repetitivo asociado al centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de los cromosomas de primate contienen una familia compleja de largas repeticiones en tándem de ADN, compuestas de una longitud de repetición del monómero de unos 171 pares de bases, que se conoce como ADN alfa-satélite.

Las sondas cromosómicas se eligen para obtener una sensibilidad y una especificidad máximas. Utilizar un conjunto de sondas cromosómicas (es decir, dos o más sondas) proporciona mayor sensibilidad y especificidad que usar cualquier sonda cromosómica. Por lo tanto, basándose en los resultados de este documento, las sondas cromosómicas que detectan con mayor frecuencia los cromosomas aneusómicos, y que se complementan entre sí, se incluyen en un conjunto. Basándose en los valores de discriminación de las sondas determinadas, se usa un conjunto de sondas cromosómicas que comprende las sondas centroméricas para los cromosomas 3, 7 y 17. Adicionalmente, este conjunto puede incluir una sonda centromérica para el cromosoma 8, el cromosoma 9, el cromosoma 11 o el cromosoma 18. Según se describe aquí, una sonda para el cromosoma 7 cuando se utilizó sola demostró una alta sensibilidad y pudo detectar aproximadamente 76% de los cánceres de vejiga. Las sondas para los cromosomas 3 y 17, y para la región 9p21 del cromosoma 9 fueron capaces de detectar casos adicionales de cáncer de vejiga que no mostraron anomalías con la sonda del cromosoma 7 sola. La combinación de sondas para los cromosomas 3, 7, 17 y para 9p21 proporciona una sensibilidad de aproximadamente 95% para detectar el cáncer de vejiga en la cohorte de pacientes descrita en este documento.

Las sondas cromosómicas tienen generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente  $1 \times 10^5$  nucleótidos de longitud. Las sondas más largas comprenden habitualmente fragmentos más pequeños de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud. Las sondas que se hibridan al ADN centromérico y al ADN locus específico se pueden obtener comercialmente, por ejemplo, de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o de Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Alternativamente, las sondas se pueden preparar no comercialmente a partir de ADN cromosómico o genómico empleando técnicas estándar. Por ejemplo, las fuentes de ADN que se pueden utilizar incluyen ADN genómico, secuencias de ADN clonadas, híbridos de células somáticas que contienen un cromosoma, o una parte de un cromosoma humano junto con el complemento normal del cromosoma del huésped y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdissección. La región de interés se puede aislar por clonación, o por amplificación específica del sitio mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Nath y Johnson, *Biotechnic Histochem.*, 1998, 73(1):6-22, Wheelless et al., *Cytometry*, 1994, 17:319-326 y la patente de Estados Unidos N° 5,491,224.

Las sondas cromosómicas se marcan directamente con un fluoróforo, una molécula orgánica que emite fluorescencia después de absorber luz de menor longitud de onda/mayor energía. El fluoróforo permite visualizar la sonda sin una molécula de detección secundaria. Después de unir covalentemente un fluoróforo a un nucleótido, el nucleótido se puede incorporar directamente en la sonda con técnicas estándar como desplazamiento de mella (nick translation), cebado al azar y etiquetado por PCR. Alternativamente, se pueden transaminar nucleótidos de desoxicitidina de la sonda con un conector. Después el fluoróforo se une covalentemente a los nucleótidos de desoxicitidina transaminados. Véase, la patente de Estados Unidos N° 5,491,224.

Se eligen fluoróforos de diferentes colores de modo que cada sonda cromosómica del conjunto pueda ser visualizada distintivamente. Por ejemplo, se puede utilizar una combinación de los fluoróforos siguientes: ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), 5-(y-6)-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-(y-6)-carboxifluoresceína, 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, 5-(y-6)-isotiocianato de tetrametilrodamina, 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina, ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico, ácido 6-[fluorescein 5-(y-6)-carboxamido]hexanoico, ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenopropiónico, 5-isotiocianato de eosina, 5-isotiocianato de eritrosina y acetilazida azul Cascade™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Las sondas se visualizan con un microscopio de fluorescencia y un filtro adecuado para cada fluoróforo, o utilizando conjuntos de filtros de paso de banda doble o triple para observar varios fluoróforos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5,776,688. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas como citometría de flujo para examinar el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas.

Las sondas también se pueden marcar por cualquier otro medio, como los conocidos por los expertos en el área y que incluyen marcar indirectamente con biotina o digoxigenina, o marcar con isótopos radioactivos como  $^{32}\text{P}$  y  $^3\text{H}$ , aunque son necesarias moléculas de detección secundaria o procesamiento adicional para visualizar las sondas. Por ejemplo, una sonda marcada indirectamente con biotina se puede detectar mediante avidina conjugada a un marcador detectable. Por ejemplo, la avidina se puede conjugar a un marcador enzimático como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano. Los marcadores enzimáticos se pueden detectar en reacciones colorimétricas estándar utilizando un sustrato y/o un catalizador para la enzima. Los catalizadores para la fosfatasa alcalina incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio. También se puede usar diaminobenzoato como catalizador para la peroxidasa de rábano.

#### 45 *Selección de las células*

De acuerdo con la invención, las células se seleccionan de una muestra basándose en una o más anomalías citológicas. Cuando se usa morfología nuclear, las células se pueden seleccionar microscópicamente entre las células de una muestra biológica (por ejemplo, orina, etc.) en un portaobjetos antes de evaluar si hay células aneusómicas presentes o ausentes. "Seleccionar" se refiere a la identificación de células que es más probable que sean neoplásicas debido a una o más anomalías citológicas (principalmente nucleares) como agrandamiento del núcleo, irregularidad nuclear o tinción anormal del núcleo (generalmente un patrón de tinción moteado). Estas características nucleares, se pueden evaluar con tinturas o colorantes de ácidos nucleicos como yoduro de propidio o diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El yoduro de propidio es un colorante que emite fluorescencia roja, específico del ADN, que se puede observar a una longitud de onda de emisión máxima de 614 nm. Normalmente, el yoduro de propidio se utiliza a una concentración de aproximadamente 0.4 ig/ml a aproximadamente 5 ig/ml. DAPI, un colorante específico del ADN que emite fluorescencia azul que se puede observar a una longitud de onda de emisión máxima de 452 nm, generalmente se emplea a una concentración que varía desde aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. La tinción de células con DAPI o yoduro de propidio se realiza generalmente después de llevar a cabo la hibridación in situ.

#### *Determinación de la presencia de células aneusómicas*

Después de que una célula es seleccionada basándose en uno o más de los criterios establecidos, la presencia o ausencia de aneusomía se evalúa generalmente examinando el patrón de hibridación de las sondas cromosómicas (es decir, el número de señales para cada sonda) en cada célula seleccionada y registrando el número de señales

del cromosoma. Este paso se repite hasta que el patrón de hibridación ha sido evaluado en al menos 4 células, si las 4 células son aneusómicas. En un análisis típico, el patrón de hibridación se evalúa en aproximadamente 20 a aproximadamente 25 células seleccionadas.

- 5 Las células con más de dos copias de cromosomas múltiples (es decir, ganancias de cromosomas múltiples) son consideradas positivas para cáncer. Generalmente las muestras que contienen alrededor de 20 células seleccionadas y al menos aproximadamente 4 células positivas en la prueba, se consideran positivas para cáncer. Si se encuentran menos de 4 células positivas, se determina el nivel de ploidía cromosómica. También se indica un resultado positivo para cáncer si más del 30% de las células muestran pérdida hemicigótica u homocigótica (es decir, nulisomía) de una región específica del cromosoma, como pérdida de 9p21 en el cáncer de vejiga. La nulisomía se puede confirmar como no artefactual mediante la observación de las células circundantes que parecen normales para ver si tienen dos señales para la región cromosómica específica.

#### 15 *Detección sistemática del cáncer y control de los pacientes con cáncer*

- Los métodos descritos en este documento se pueden utilizar para detectar pacientes con cáncer, o se pueden utilizar para controlar a los pacientes con diagnóstico de cáncer. Por ejemplo, en el modo de detección, se evalúan pacientes con riesgo de cáncer de vejiga, como pacientes mayores de 50 años que fuman, o pacientes expuestos crónicamente a aminas aromáticas, con el objetivo de detectar más precozmente el cáncer de vejiga. Los métodos descritos en este documento se pueden utilizar solos o en combinación con otras pruebas, como la prueba de la tira reactiva para hemoglobina. Por ejemplo, se puede analizar un paciente que tenga un mayor riesgo de cáncer de vejiga para determinar si tiene cáncer de vejiga mediante la detección de hemoglobina en la orina, es decir, hematuria. Durante dicho proceso de detección, los pacientes sin hematuria no necesitan análisis adicionales y en cambio, se vuelven a examinar por presencia de hematuria en un lapso de tiempo adecuado, por ejemplo, en su chequeo anual. Las muestras de los pacientes con hematuria se analizan posteriormente con los métodos descritos en este documento. En general, se hibrida un conjunto de sondas cromosómicas a la muestra biológica, se selecciona un subconjunto de células y se determina la presencia de células aneusómicas en las células seleccionadas. Los pacientes que tienen células aneusómicas son examinados posteriormente, por ejemplo, por cistoscopia y pueden recibir un tratamiento adecuado, si fuera necesario. Después del tratamiento, los pacientes son controlados por recidiva del cáncer usando los métodos descritos en este documento.

- La mayor sensibilidad de los métodos descritos aquí indican que esta técnica podría reemplazar a la citología para la detección y el seguimiento del cáncer de vejiga. La mayoría de los pacientes con cáncer de vejiga tendrá células aneusómicas detectables y puede ser controlado para determinar la eficacia del tratamiento y la recidiva/el avance del tumor con los métodos descritos en este documento. Una pequeña proporción de pacientes con evidencia citoscópica o biopsia de cáncer de vejiga (principalmente aquellos con tumores no invasivos de grado bajo) puede no tener células aneusómicas detectables en la orina. Estos pacientes (es decir, aquellos con tumores papilares de grado bajo) tienen una velocidad muy baja de avance del tumor y pueden ser controlados convenientemente por una combinación de los métodos descritos y cistoscopia. El aspecto de las células aneusómicas en la orina de estos pacientes puede predecir el desarrollo de un tumor más agresivo en este subconjunto de pacientes. La alta sensibilidad y especificidad de la prueba FISH descrita en este documento para cánceres de vejiga agresivos puede ayudar a disminuir la frecuencia de la citoscopia.

#### 45 *Kits*

- La presente invención también ofrece kits para la detección de cáncer. Dichos kits contienen un conjunto de sondas cromosómicas que comprende las sondas centroméricas para los cromosomas 3, 7 y 17. Los kits de la invención pueden contener además medios para la selección de las células de una muestra, como se describió antes, por ejemplo, tinturas o colorantes de ácidos nucleicos; y/o un cuadro que indique la correlación de las células aneusómicas con el cáncer.

La invención se describirá aún más en los ejemplos siguientes, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

#### 55 **Ejemplos**

- Ejemplo 1 - Muestras y preparación de muestras: las muestras incluyeron orina vaciada de 21 casos de cáncer de vejiga probado por biopsia, en las que se hizo un diagnóstico por citología positiva, o por histología en el caso de las muestras de citología negativa. Las muestras de orina control incluyeron nueve muestras de donantes sanos normales (edad 25-80) y tres muestras de pacientes con enfermedades genitourinarias diferentes del cáncer de vejiga.

- Se recogieron aproximadamente 50 a 200 ml de orina por paciente. Las muestras de orina se almacenaron a 4 °C por menos de 48 horas y se procesaron por centrifugación a 1200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 10 ml de KCl 0.075 M y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las muestras se hicieron girar durante 5 minutos a 1200 g, y se eliminó la solución de KCl. Los sedimentos se

resuspendieron en 10 ml de un fijador de metanol:ácido acético glacial 3:1 y se centrifugaron durante 8 minutos a 1200 g. El fijador se eliminó cuidadosamente dejando el sedimento de células, y este paso se repitió dos veces más.

5 La densidad de los frotis se controló revisándolos con frecuencia bajo un microscopio de contraste de fases, utilizando un objetivo de 20 X, entre vertidos. Por lo general, se intentó obtener tantas células como fuera posible en el frotis sin tener ninguna superposición de células. Si una muestra contenía pocas células, se colocaba tanta muestra como fuera posible en el frotis. En las muestras con muy pocas células, se utilizó toda la muestra. Los frotis se secaron durante la noche a temperatura ambiente.

10 Los frotis que contenían las muestras se incubaron en 2 X SSC a 37 °C durante 10-30 minutos, después se incubaron en 0.2 mg/ml de pepsina durante 20 minutos a 37 °C. Luego los frotis se lavaron en PBS dos veces, durante 2 minutos por lavado, a temperatura ambiente. Las células se fijaron en formol tamponado neutro al 2.5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la deshidratación durante 1 minuto cada vez en etanol 70%, 85% y 100%, los frotis se usaron inmediatamente, o se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

15 Se usaron tres conjuntos de sondas multicolores: A, B y C en las hibridaciones iniciales. Los conjuntos de sondas A-C contenían las sondas centroméricas/locus específicas que se muestran en la tabla 1. El color del fluoróforo utilizado para marcar cada sonda también se muestra en la tabla 1. Se obtuvieron las sondas cromosómicas (CEP®, sonda de enumeración cromosómica) de Vysis, Inc. (Downers Grove, IL). Se utilizó un filtro de agua para visualizar los cromosomas 17 y 18. Se utilizó un filtro amarillo para visualizar la sonda específica del locus 9p21 y un filtro doble rojo/verde o filtros individuales rojo o verde para visualizar los cromosomas 3, 7, 8, 9, 11 e Y.

Tabla 1

Conjunto de sondas FISH				
Conjunto de sondas	Espectro agua	Espectro verde	Espectro rojo	Espectro dorado
a	17	7	9	9p21
b	18	8	11	
C		3	y	

25 La hibridación se realizó mediante un método HYBrite o un método convencional. En el método HYBrite, se utilizó un sistema HYBrite™ de Vysis, Downers Grove, IL. Los frotis se colocaron en el HYBrite y se agregaron aproximadamente 10 µl del conjunto de sondas, se cubrieron y se sellaron. El HYBrite se programó de la manera siguiente: 73 °C durante 5 min, después 37 °C durante 16 horas. A continuación los frotis se lavaron en 0.4 X SSC (de cloruro de sodio 0.06 M/citrato de sodio 0.006 M)/0.3% de NP-40 durante 2 minutos a 73 °C, se enjuagaron en 2 X SSC/0.1% de NP40 a temperatura ambiente y se secaron al aire. Los frotis se contracolorearon con aproximadamente 10 µl de DAPI II (125 ng/ml de diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol).

35 En el método convencional (es decir, método del frasco Coplin), se preparó una mezcla maestra que contenía sondas cromosómicas en tampón de hibridación que contenía formamida al 50%, 2 x SSC, 0.5 µg/ml de ADN Cot1 y 2 µg/ml de ADN HP. La mezcla de sondas se desnaturalizó a 73 °C durante 5 minutos, y los frotis se desnaturalizaron en tampón de desnaturalización (formamida al 70%, 2 X SSC) en un frasco Coplin a 73 °C durante 5 minutos (6-8 frotis/frasco). Los frotis se enjuagaron en etanol 70%, 85% y 100% durante 1 minuto cada vez. Se aplicaron aproximadamente 10 µl de mezcla de hibridación a cada frotis, se cubrieron con un cubreobjetos y se sellaron con cemento de goma. La hibridación se realizó en una cámara humidificada durante toda la noche a 37 °C. Los frotis se lavaron en 0.4 X SSC/0.3% de NP-40 a 73 °C durante 2 minutos, y después se enjuagaron brevemente en 2 X SSC/0.1% de NP-40 a temperatura ambiente. Después de secarlos al aire, los frotis se contracolorearon con DAPI II. Las muestras se enumeraron registrando el número de señales FISH en 100 células consecutivas.

45 En resumen, este ejemplo proporciona métodos para aislar células de una muestra biológica e hibridar un conjunto de sondas cromosómicas a las células.

50 Ejemplo 2 - Detección del cáncer de vejiga: la tabla 2 ofrece un resumen de las muestras analizadas por citología. En conjunto, la citología de la orina fue positiva en 13 de 21 casos de cáncer, que equivale a una sensibilidad del 62%. Este valor es compatible con la bibliografía publicada. La citología detectó células tumorales en 10 de 11 pacientes con cáncer de vejiga en estadios avanzados de la enfermedad (primeras 11 entradas de la tabla 2). Entre los 10 pacientes con cáncer de vejiga superficial (últimas 10 entradas en la tabla 2), la citología fue positiva para 3 pacientes, equívoca para 3 pacientes y negativa para 4 pacientes. ND significa no se determinó. Equívoca (E) se refiere las muestras que fueron sospechosas, pero sin diagnóstico de carcinoma de células transicionales (TCC). pT1 se refiere a la invasión del tejido conectivo subepitelial por el tumor; pT2 se refiere a la invasión del músculo por el tumor; pT3 se refiere a la invasión del tejido perivesical por el tumor; y pT4 se refiere a la invasión de la próstata, el útero, la vagina, la pared pélvica o la pared abdominal.

5 El porcentaje de células aneusómicas con cuatro o más señales cromosómicas permitió la mayor discriminación entre el grupo del cáncer y los casos normales. Las ganancias o las pérdidas de una única copia entre el grupo de control mostró mucho mayor frecuencia y no resultó en sensibilidades y especificidades semejantes. Se determinó el porcentaje de células aneusómicas, usando esta definición, para cada grupo de muestras (cáncer y normal) e individualmente en cada grupo. Empleando esta definición, las muestras se analizaron de la manera siguiente.

10 Se realizó un análisis discriminativo para determinar cuán bien diferenciaba cada sonda los casos de cáncer de los controles normales, empleando la fórmula

$$\text{Valor de discriminación} = \frac{(M1-M2)^2}{SD1^2+SD2^2}$$

15 En esta fórmula, M1 y M2 son el porcentaje medio de células aneusómicas con cuatro o más señales para los grupos de cáncer (n = 21) y normal (n = 9), respectivamente, y SD1 y SD2 son las desviaciones estándar para cada grupo de muestras. La tabla 3 proporciona un resumen de los resultados para las sondas de enumeración cromosómica (CEP) usando este análisis.

Tabla 2

Detección del cáncer de vejiga por citología				
Paciente	Estado	Estadio	Grado	Citología
215	Cáncer	ND	ND	positiva
219	Cáncer	pT3	3	positiva
224	Cáncer	pTis	3	positiva
228	Cáncer	ND	ND	ND
236	Cáncer	pTis	3	positiva
66	Cáncer	pT3	3	positiva
D	Cáncer	ND	ND	positiva
229	Cáncer	pT3	3	positiva
171	Cáncer	pT4	3	positiva
227	Cáncer	pT4	3	positiva
240	Cáncer	pT3	3	negativa
191	Cáncer	pTa	2	positiva
225	Cáncer	pTa	2	positiva
230	Cáncer	pTa	3	positiva
223	Cáncer	pTa	2	E
234	Cáncer	pTa	2	E
235	Cáncer	pTa	2	E
239	Cáncer	pTa	3	negativa
69	Cáncer	pTa	2	negativa
110	Cáncer	pT1	3	negativa
95	Cáncer	pT1	3	negativa



Tabla 3

Valores de discriminación de la sonda		
	Cáncer	Normal
Media de CEP 17	24.77	0.89
DE (CEP 17)	25.44	1.76
Discriminación	0.88	
Media de CEP 9	15.55	1.07
DE (CEP 9)	19.33	2.01
Discriminación	0.55	
Media de CEP 7	26.58	1.07
DE (CEP 7)	24.12	1.82
Discriminación	1.11	
Media de CEP 18	13.09	1.63
DE (CEP 18)	14.35	1.80
Discriminación	0.63	
Media de CEP 11	16.32	1.52
DE (CEP 11)	19.44	1.87
Discriminación	0.57	
Media de CEP 8	15.58	1.52
DE (CEP 8)	15.47	1.87
Discriminación	0.81	
Media de CEP 3	27.91	0.49
DE (CEP 3)	26.33	0.78
Discriminación	1.08	

- 5 Un valor de discriminación >1.0, el intervalo de confianza del 95% alrededor del cual se separan dos poblaciones, fue considerado bueno (suponiendo distribución normal y valores de desviación estándar más o menos equivalentes). Según este criterio, las mejores sondas fueron 7, 3 y 17. Este análisis proporciona información con respecto a la sensibilidad y especificidad de las sondas individuales pero no revela la sensibilidad/especificidad de combinaciones de sondas diferentes.
- 10 Se usó un corte de dos desviaciones estándar por encima del % medio de células aneusómicas en células normales como criterio de positividad FISH para las ganancias de cromosomas. Por otra parte, los cambios en 9p21 en el cáncer de vejiga se manifiestan como una pérdida y por lo tanto se evaluaron como nulisomía. El valor de corte utilizado para la nulisomía fue 3 desviaciones estándar mayor que la media de las muestras normales. El porcentaje de células aneusómicas para cada caso por sonda se muestra en la tabla 4A para los individuos normales y en tabla 4B para los pacientes con cáncer. En la tabla 4B, las muestras por debajo de la línea doble son casos de citología falsos negativos y el texto sombreado indica resultados de FISH falsos negativos utilizando los valores de corte de la
- 15 tabla 3. Como se muestra en la tabla 4A, el porcentaje de células aneusómicas (según lo definido por las ganancias de cromosomas) en muestras normales es bajo, variando entre aproximadamente 0.5% y aproximadamente 4.5%.

20

TABLA 4A

Porcentaje de células aneusómicas: casos normales								
Paciente	CEP 17	CEP 9	CEP 7	CEP 18	CEP 11	CEP 8	CEP 3	9p21
2F	0	0	0	0	0	0	0	0
3M	0	0	0	0	0	0	0	1.00
8M	0	0	0	0	0	0	0	0
9M	0	0	0	5	4	5	1	3.00

Porcentaje de células aneusómicas: casos normales								
Paciente	CEP 17	CEP 9	CEP 7	CEP 18	CEP 11	CEP 8	CEP 3	9p21
F5	4	2	2	2	1	1	0	ND
F6	0	6	0	0	0	0	1.43	0
M12	4	1.67	6	3	5	4	2.00	14.00
M28	0	0	1.67	1.67	1.67	1.67	0	3.33
M23	0	1.07	0	3	2.00	2.00	0	15.00
Media	0.88	1.81	1.07	1.63	1.51	1.51	0.49	4.54
DE	1.76	2.01	1.81	1.79	1.87	1.87	0.77	6.29
Media + 2 D	4.41	5.09	4.7	5.2	5.26	5.26	2.05	17.12

Tabla 4B

Porcentaje de células aneusómicas: casos de cáncer

5

10

15

20

25

30

35

40

Paciente	CEP 17	CEP 9	CEP 7	CEP 18	CEP 11	CEP 8	CEP 3	9p21 nulo
171	21	0	24	2	42	44	1	9
191	34.5	10.34	17.24	44.9	26.53	38.78	50	4.76
215	38	21	24	5.81	4.65	2.93	60.32	13
219	39	44	41	14	11	24	53	10
224	73.68	70.3	81.05	ND	ND	ND	ND	69.47
225	5	4	9	5	12	6	20	16
227	52	33	69	37	14	34	44	1
228	34	13	29	32	2	34	53	3
229	3	20	35	5	47	8	43	4
230	38	39	32	13	8	9	44	8
236	50	17	49	21	34	35	54	62
66	84	5	66	36	70	7	78.89	27
D	41.94	38.71	38.71	ND	ND	ND	ND	12.9
239	0	0	0	3	4	4	0	20
240	5	0	13	18	23	32	0	1
69	2	1	2	0	0	0	5	2
95	0	0	0	2	2	2	0	2
110	10.1	1	18.18	3	2	6	11	20.2
223	0	0	0	3	5	7	0	43
234	11	9	9	3	2	2	3	3
235	9	0	1	1	1	1	10	1

Tabla 5

Resultados de FISH y citología para pacientes normales y con cáncer de vejiga			
	Cáncer de vejiga (n = 21)		Sin cáncer (n = 3)
	Citología +	Citología -	Citología -
FISH +	13	7	0
FISH -	0	1	3

En general, como se muestra en la tabla 4B, el cromosoma 7 mostró la mayor sensibilidad de cualquier sonda individual (76%, 16/21). Las sondas para el cromosoma 3 y 9p21 complementaron al cromosoma 7 en lo referente a que fueron positivas para algunos de los casos con resultados del cromosoma 7 normales. En combinación, las tres sondas para los cromosomas 3, 7 y 9p21 detectaron 20/21 casos de cáncer de vejiga y aún más importante 7/8 casos de citología falsos negativos (tabla 4B). En este conjunto de datos, esto equivale a una sensibilidad general del 95%.

- 5
- 10 La sonda para el cromosoma 17 (junto con la sonda para el cromosoma 3) detectó el mayor número de falsos negativos en las muestras de citología (4/8).

Ejemplo 3 - Análisis comparativo con los métodos de detección sistemática estándar:

- 15 190 pacientes de la clínica Mayo se inscribieron prospectivamente en este estudio. La mayoría de los pacientes tenía un diagnóstico previo de cáncer de vejiga o estaba siendo evaluada por un posible diagnóstico inicial de cáncer de vejiga (por ejemplo por microhematuria). Una pequeña proporción de los pacientes estaba siendo evaluada por trastornos genitourinarios diferentes del cáncer de vejiga. Las metodologías de prueba comparadas incluyeron citología de la orina, cistoscopia, BTA STAT (C.R. Bard, Inc., Murray Hill, NJ), FISH y tira reactiva para hemoglobina (Bayer Corporation, Diagnostic Division, Elkhart, IN.)
- 20

FISH se realizó en general como se describe en el ejemplo 1. Se recogieron aproximadamente 25 a 200 ml de orina por paciente. Las muestras de orina se almacenaron a 4 °C por hasta 48 horas y se procesaron por centrifugación a 600 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 25-50 de 1 X solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la centrifugación durante 5 minutos a 600 g el sobrenadante fue descartado nuevamente. Los sedimentos se resuspendieron lentamente en 1.5-5 ml de fijador (metanol: ácido acético glacial, 3:1) y se centrifugaron durante 5 minutos a 600 g. El fijador se eliminó cuidadosamente, y este paso se repitió dos veces más.

25

- 30 Después de la centrifugación final, se eliminó el fijador, dejando una cantidad apropiada de la solución para colocar sobre los portaobjetos como los portaobjetos de 6 mm de 12 círculos Shandon Lipshaw. Si el sedimento de células era muy pequeño y apenas visible para el ojo, se dejaban aproximadamente 100 µl por encima del sedimento. Si el sedimento de células era fácilmente visible para el ojo, se eliminaba tanto fijador de Camoy como fuera posible, y se agregaba 0.5 ml de fijador de Camoy recién preparado. Si no había sedimento visible, a menudo se vertía toda la muestra sobre el portaobjetos. Aproximadamente 3, 10 y 30 µl de la suspensión de células se vertieron después en tres pocillos diferentes de 0.6 mm de un portaobjetos de 12 pocillos Shandon. La celularidad (es decir, la densidad de células) en estos pocillos se evaluó con un microscopio de contraste de fases. Si el pocillo que contenía el menor volumen de suspensión de células era demasiado denso, la suspensión de células se diluía aún más y una porción de esta dilución se colocaba en un cuarto pocillo. Si el pocillo que contenía el mayor volumen de la suspensión celular no tenía suficientes células, la suspensión de células se concentraba y se colocaba en un cuarto pocillo.
- 35
- 40

Los frotis que contenían las muestras se incubaron en 2 X SSC a 37 °C durante 10-30 minutos, después se incubaron en 0.2 mg/ml de pepsina durante 10 minutos a 37 °C. Luego los frotis se lavaron en PBS dos veces, durante 2 minutos por lavado, a temperatura ambiente. Las células se fijaron en formol tamponado neutro al 2.5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los frotis se volvieron a lavar en PBS durante 5 minutos. Después de la deshidratación durante 1 minuto cada vez en etanol 70%, 85% y 100%, los frotis se secaron sobre un calentador de frotis a 45-50 °C durante 2 minutos. Los frotis se dejaron en etanol al 100% a 4 °C hasta que se usaron, o se utilizaron para FISH.

45

- 50 La hibridación se realizó mediante un método HYBrite o un método convencional. En el método HYBrite, se utilizó un sistema HYBrite™ de Vysis, Downers Grove, IL. Los frotis se colocaron en el HYBrite y se agregaron aproximadamente 3 µl de sonda por objetivo, después los frotis se cubrieron y se sellaron. El HYBrite se programó de la manera siguiente: 73 °C durante 5 min, después 37 °C durante 16 horas. A continuación los frotis se lavaron en 0.4 X SSC (de cloruro de sodio 0.06 M/citrato de sodio 0.006 M)/0.3% de NP-40 durante 2 minutos a 73 °C, se enjuagaron en 2 X SSC/0.1% de NP40 a temperatura ambiente y se secaron al aire. Los frotis se contracoloraron con aproximadamente 3 µl de DAPI II (125 ng/ml de diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol).
- 55

En el método convencional, se preparó una mezcla maestra que contenía sondas cromosómicas en tampón de hibridación que contenía formamida al 50%, 2 x SSC, 0.5 µg/ml de ADN Cot1 y 2 µg/ml de ADN HP. La mezcla de sondas se desnaturalizó a 73 °C durante 5 minutos, y los frotis se desnaturalizaron en tampón de desnaturalización (formamida al 70%, 2 X SSC) en un frasco Coplin a 73 °C durante 5 minutos (6-8 frotis/frasco). Los frotis se enjuagaron en etanol 70%, 85% y 100% durante 1 minuto cada vez. Las muestras se secaron en un calentador de portaobjetos durante 2 minutos o menos. Se aplicaron aproximadamente 3 µl de mezcla de hibridación por objetivo a cada frotis, se cubrieron inmediatamente con un cubreobjetos, que después se selló con cemento de goma. La hibridación se realizó en una cámara humedecida durante toda la noche a 37 °C. Los frotis se lavaron en 0.4 X SSC/0.3% de NP-40 a 73 °C durante 2 minutos, y después se enjuagaron en 2 X SSC/0.1% de NP-40 brevemente a temperatura ambiente. Después de secarlos al aire, los frotis se contracoloraron con DAPI II. Se seleccionaron veinte células citológicamente anormales en cada muestra y se analizaron para determinar su patrón de FISH.

Para 53 casos de cáncer, diagnosticado por biopsia (estadio/grado) (n = 49) y citología positiva TCC (n = 34), la citología tuvo una sensibilidad de 57% (los diagnósticos de citología equívoca se contaron como positivos), la cistoscopia tuvo una sensibilidad de 88% (los resultados equívocos de cistoscopia se contaron como positivos), BTA STAT tuvo una sensibilidad de 71% y FISH tuvo una sensibilidad de 86%. En 63 casos negativos de cáncer, según lo indicado por una cistoscopia negativa con o sin citología negativa y sin antecedentes de cáncer de vejiga, BTA STAT tuvo una especificidad de 73% y FISH una especificidad de 90% (la especificidad de la cistoscopia y la citología no pudo determinarse porque se usaron para definir qué pacientes no tenían cáncer de vejiga).

Dos de los tres pacientes con resultados "falsos positivos" de FISH también tuvieron resultados positivo para telomerasa, la tira reactiva para hemoglobina y BTA-STAT o BTA-TRAK. Si se probara que estos dos pacientes tienen cáncer de vejiga, la especificidad de FISH se aproximaría al 100%. Esto tiene implicaciones para el valor predictivo positivo de la prueba como se explica más adelante. La tabla 6 muestra la sensibilidad de las distintas pruebas por estadio y grado. En la tabla 6, "E" se refiere a equívocos, y "\*" indica que 3 muestras FISH + fueron cáncer solamente por citología y no se incluyeron.

Los valores predictivos positivos y negativos (PV), basados en una prevalencia de la enfermedad del 28% (53/190), especificidad del 93% y sensibilidad del 77%, se indican en la tabla 7.

Tabla 6

Citología	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Global
pTa	1+[1E]/8	5/13	2/2	39% (9/23)
pT1 - pT4			3+[3E]/9	66% (6/9)
pTis			5+[5E]/12	83% (10/12)
Global	25% (2/8)	38% (5/13)	78% (18/23)	57% (25/44)
Cistoscopia	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Global
pTa	5+[1E]/7	13/13	2/2	95% (21/22)
pT1 - pT4			4+(3E)/9	78% (7/9)
pTis			5+[5E]/12	83% (10/12)
Global	86% (6/7)	100% (13/13)	83% (19/23)	88*% (38/43)
FISH	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Global
pTa	4/7	9/12	2/2	71% (15/21)
pT1 - pT4			12/12	100% (12/12)
pTis			10/10	100% (10/10)
Global	57% (4/7)	75% (9/12)	100% (24/24)	86*% (37/43)
BTA STAT	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Global
pTa	4/8	6/14	2/2	50% (12/24)
pT1 - pT4			9/10	90% (9/10)
pTis			12/12	100% (12/12)
Global	50% (4/8)	43% (6/14)	96% (24/25)	71% (33/46)

Tabla 7

Valor predictivo		
Método:	PV+	PV-
FISH	77%	94%
BTA STAT	51%	87%

Cincuenta y uno de los 53 casos de cáncer tuvieron un resultado de tira reactiva. La sensibilidad de la prueba de tira reactiva para hemoglobina fue de 91% para los estadios pT1-pT4 y de 100% para el carcinoma in situ (Tis), por lo que es una prueba de detección ideal (tabla 8). Sin embargo, la especificidad (52%) de la prueba de la tira reactiva para hemoglobina fue mala. Si bien la alta sensibilidad y el bajo costo de la tira reactiva para hemoglobina la hace un examen de detección útil, es evidente que los resultados positivos se deben confirmar por una prueba más específica. La citología no puede ser la prueba de elección porque detecta como positivos sólo el 33% de los casos de pT2-pT4 y falla en 2 de 12 carcinoma in situ (véase tabla 6).

Tabla 8

Tira reactiva para Hb			
	Trazas 3 +	Negativa	Sensibilidad
pTa	13	11	54%
pT1 - pT4	10	1	91%
pTis	12	0	100%

La utilidad clínica de FISH se comparó con el régimen de pruebas citología/cistoscopia estándar. De los 53 casos de cáncer, hubo 22 casos de estadio avanzado de la enfermedad (pT2-pT4 o pTIS). El fracaso en detectar estos casos representa la situación de falso negativo más grave. Si bien la citología/cistoscopia fue positiva en 13/22 casos para una sensibilidad del 59%, FISH tuvo una sensibilidad de 100%, es decir, fue capaz de detectar 22/22 casos (véase la tabla 9 por una representación de 5 de estos casos). Esto indica que FISH es una prueba de citología mejorada que tiene alta sensibilidad para la detección de estadios avanzados de la enfermedad.

Tabla 9

Paciente	Estadio	Grado	Cistoscopia	Citología	FISH
79	pT2	Grado 3	E	E	Pos
132	pT2	Grado 3	Neg	Neg	Pos
1	pT3	Grado 3	Neg	Neg	Pos
115	pT4	Grado 3	E	E	Pos
180	pTIS	Grado 3	E	Neg	Pos

Otras realizaciones

Se entiende que mientras que la invención se ha descrito en conjunción con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que es definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de detección sistemática del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende:
  - 5 (a) hibridar un conjunto que comprenda sondas cromosómicas centroméricas para cada uno de los cromosomas 3, 7 y 17 a una muestra biológica de dicho sujeto;
  - (b) seleccionar las células de dicha muestra biológica sobre la base de una o más anomalías citológicas; y
  - (c) determinar la presencia o ausencia de células aneusómicas en dichas células seleccionadas examinando el patrón de hibridación de dicho conjunto de sondas cromosómicas en cada una de dichas células
- 10 seleccionadas, donde las células con más de dos copias de cromosomas múltiples se consideran aneusómicas,  
donde la presencia de células aneusómicas en las células seleccionadas se considera positiva para el cáncer.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica es orina o lavados vesicales
3. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dicha muestra biológica está concentrada.
4. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que dicha muestra biológica es orina.
- 20 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas sondas cromosómicas están marcadas fluorescentemente.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células se seleccionan por morfología nuclear.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en el que las células se seleccionan por tamaño nuclear.
8. El método de reivindicación 6, en el que las células se seleccionan por forma del núcleo.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la morfología nuclear es evaluada por tinción con DAPI.
10. Un conjunto que comprende sondas cromosómicas centroméricas para cada uno de los cromosomas 3, 7 y 17 para usar en un método de detección del cáncer de vejiga.
- 35 11. Un kit para detectar el cáncer de vejiga que contiene un conjunto de sondas cromosómicas de acuerdo con la reivindicación 10.
- 40 12. El kit de la reivindicación 11, en el que dichas sondas cromosómicas están marcadas fluorescentemente.