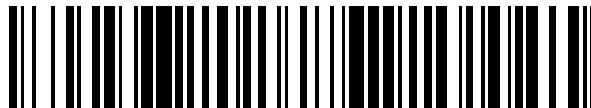


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 108**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 11188995 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2436779**

54 Título: **Marcadores en la orina para la detección del cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

**23.07.2004 NZ 53428904**

**04.04.2005 NZ 53921905**

**20.06.2005 US 692619 P**

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

**08.07.2015**

73 Titular/es:

**PACIFIC EDGE LIMITED (100.0%)  
Level 13, Otago House 481 Moray Place  
Dunedin 9016, NZ**

72 Inventor/es:

**GUILFORD, PARRY JOHN;  
KERR, NATALIE JANE y  
POLLOCK, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 540 108 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

Marcadores en la orina para la detección del cáncer de vejiga

### Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la detección de cáncer. Específicamente, la invención se refiere al uso de marcadores de orina en la detección de cáncer de vejiga. Todavía más específicamente, la invención se refiere al uso de marcadores oligonucleótidos, proteicos y/o anticuerpos en orina para la detección, tipado y escalado de cáncer de vejiga.

### Antecedentes

#### Introducción

10 La supervivencia de los pacientes oncológicos mejora en gran medida cuando el cáncer se trata precozmente. En el caso del cáncer de vejiga, los pacientes diagnosticados en una fase precoz de la enfermedad tienen unas tasas de supervivencia a los 5 años de > 90 %, en comparación con aproximadamente el 15 - 30 % para los pacientes diagnosticados con la enfermedad avanzada. Por lo tanto, los desarrollos que permitan un diagnóstico precoz del cáncer de vejiga pueden dar lugar a un pronóstico mejorado para los pacientes. El método establecido para la  
15 detección del cáncer de vejiga mediante el uso de muestras de orina es una citología. Sin embargo, se sabe que la citología sólo es sensible en aproximadamente un 75 % para la detección del cáncer de vejiga invasivo, y sólo es sensible en aproximadamente un 25 % para la detección del cáncer de vejiga superficial (Lotan y Roehrborn, Urology 61, 109 - 118 (2003)).

20 El cáncer de vejiga se divide ampliamente en dos clases, invasivo y superficial. El tipo invasivo penetra en las capas de tejido subyacente, mientras que el tipo superficial tiende a desarrollarse principalmente en forma de un pólipo que crece en la luz de la vejiga.

25 La identificación de marcadores específicos para el cáncer en la orina puede proporcionar una metodología valiosa para el diagnóstico precoz del cáncer, dando lugar a un tratamiento precoz y a un pronóstico mejorado. Los marcadores específicos del cáncer también proporcionan un medio para monitorizar la progresión de la enfermedad, permitiendo monitorizar la eficacia de los tratamientos quirúrgicos, radioterapéuticos y quimioterapéuticos. Sin embargo, para diversos cánceres importantes, los marcadores disponibles adolecen de una sensibilidad y una especificidad insuficientes.

30 Actualmente el método más fiable para la detección del cáncer de vejiga es la cistoscopia acompañada por una histología de las lesiones biopsiadas. Sin embargo, esta técnica es larga, invasiva y su sensibilidad es sólo de aproximadamente el 90 %, lo que significa que aproximadamente el 10 por ciento de los cánceres no son detectados mediante el uso de estos métodos. De entre las metodologías no invasivas, la citología en orina, que detecta las células malignas exfoliadas microscópicamente, es el método preferido actualmente. Aunque la citología tiene una especificidad de aproximadamente el 95 %, tiene una baja sensibilidad (del 9 - 25 %) para las lesiones de bajo grado, es extremadamente dependiente de la calidad de la muestra y adolece de una elevada variabilidad entre  
35 observadores.

Más recientemente se han realizado intentos para detectar marcadores genéticos en las biopsias de vejiga. El método usado más habitualmente es el análisis con micromatriz, en el que se expone una matriz que contiene oligonucleótidos complementarios a las porciones de un posible marcador genético, a una muestra de ARNm o de ADNc obtenida a partir de la muestra del paciente. Mediante el uso de estos métodos, numerosos informes recientes han identificado diversos posibles marcadores para el cáncer de vejiga. Sin embargo, la tecnología de matriz es relativamente no cuantitativa y es muy variable.

40 La detección de marcadores en sangre o en orina que indiquen la presencia de cáncer de vejiga proporciona un potencial método para la detección mejorada de esta enfermedad. Aunque se han realizado pocos progresos en el desarrollo de marcadores sanguíneos para el cáncer de vejiga, hay disponibles varios marcadores de proteínas en orina. Los ensayos de estos marcadores ofrecen una mejor sensibilidad que la citología pero tienden a adolecer de una especificidad subóptima debido a que los elevados niveles de estos marcadores también se observan habitualmente en los pacientes con enfermedades no malignas, que incluyen inflamación, urolitiasis e hiperplasia prostática benigna. Por ejemplo, NMP22, que detecta una proteína de la matriz nuclear específica, tiene una sensibilidad del 47 - 87 % y una especificidad del 58 - 91 %. La elevada variabilidad del NMP22 significa que no es  
45 ideal para una detección fácil y rápida del cáncer de vejiga.

Otros ensayos en orina incluyen la amplificación mediante una RT-PCR de los transcritos génicos, tales como la enzima telomerasa hTERT a partir de sedimentos celulares de muestras de orina. Los ensayos de RT-PCR ofrecen el potencial de una elevada sensibilidad, aunque la especificidad de los marcadores existentes para la RT-PCR sigue sin estar clara. US2004/0038207 describe genes expresados diferencialmente en células tumorales de vejiga.

55

Existe la necesidad de otras herramientas para la detección y diagnóstico tempranos de cáncer. Esta divulgación proporciona métodos, composiciones, kits y dispositivos adicionales basados en marcadores del cáncer, específicamente en marcadores del cáncer de vejiga, para ayudar tanto en la detección como el diagnóstico precoz del cáncer.

## 5 Resumen de la invención

Mediante el uso de una combinación de un análisis con micromatriz y una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), hemos sido capaces de identificar marcadores genéticos específicos que son selectivos para el cáncer de vejiga. En algunas formas de realización, hemos averiguado los marcadores que pueden usarse para diferenciar la fase de un tumor de vejiga, y en otras formas de realización, hemos identificado los marcadores que pueden distinguir los tipos de tumores. En otras formas de realización, hemos averiguado inesperadamente que las combinaciones de dos o más marcadores pueden proporcionar una detección altamente fiable y sensible del cáncer de vejiga. En otras formas de realización adicionales más, hemos identificado marcadores que son muy expresados por las células del cáncer de vejiga pero no por las células sanguíneas. Por lo tanto, en muchas formas de realización, los ensayos del cáncer de vejiga son inesperadamente mejores que los ensayos de la técnica anterior.

En ciertas formas de realización, se usa un análisis con micromatriz para identificar los genes que son altamente expresados en el tejido tumoral de vejiga en comparación con un tejido de vejiga no maligno. Estos genes, y las proteínas codificadas por esos genes, se denominan en el presente documento marcadores tumorales de vejiga (BTM). Debe apreciarse que el término BTM no requiere que el marcador sea específico únicamente para los tumores de vejiga. Más bien, la expresión de los BTM puede estar aumentada en otros tipos de tumores, incluyendo los tumores malignos. También debe entenderse que los BTM incluyen marcadores que no son altamente expresados en las células sanguíneas. En virtud de la toma de muestras de la orina, la expresión de otros tipos de células habitualmente presentes en las muestras de biopsias de la técnica anterior no están presentes. El término BTM también incluye combinaciones de marcadores individuales que son útiles para la detección del cáncer de vejiga.

En otras formas de realización, se proporcionan métodos para la identificación de la presencia de marcadores en muestras, que incluyen una inmunohistoquímica y una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Los métodos de qPCR tienen una menor tendencia a los artefactos que son habituales en los análisis con micromatriz. Dichos artefactos incluyen diferencias en el número de oligonucleótidos del ligando colocados en los puntos de la matriz, una unión no uniforme e impredecible de los colorantes a los oligonucleótidos hibridados en un punto de la matriz, un lavado no uniforme de los materiales no específicos de los puntos de la matriz, y otros problemas.

Algunos de los genes divulgados en el presente documento codifican proteínas que son secretadas por la célula, escindidas de la célula o liberadas desde una célula tras la muerte celular. Estos transcritos de ARNm y sus proteínas tienen la utilidad añadida como marcadores para el diagnóstico del cáncer de vejiga, o como marcadores para la monitorización de la progresión de una enfermedad establecida. Estos marcadores pueden usarse solos o combinados entre sí. Además, otros genes, transcritos de ARN y las proteínas codificadas permanecen dentro o asociadas a la célula, y pueden usarse solos o junto con los demás como marcadores en la orina.

Las estrategias para el tratamiento del cáncer de vejiga superficial y del invasivo pueden ser diferentes. El cáncer de vejiga invasivo requiere una extirpación quirúrgica más urgente, y permite menos alternativas de tratamiento de lo que lo hace el cáncer de vejiga de tipo superficial. Por el contrario, el cáncer de vejiga superficial puede ser tratado con éxito con una quimioterapia intravesical o con una inmunoterapia intravesical con el BCG.

Sin embargo, actualmente no hay ningún método que pueda distinguir fácilmente y de forma fiable entre las clases de cáncer de vejiga superficial e invasivo sin realizar una cistoscopia. La capacidad para distinguir entre estas clases mediante el uso de un método no invasivo, tal como un ensayo en orina, permitiría a los profesionales clínicos seleccionar las estrategias de tratamiento apropiadas sin basarse en la cistoscopia, que es cara, incómoda y a menudo poco aceptada por los pacientes.

Inesperadamente hemos averiguado que ciertos marcadores en la orina, en particular aquellos no se encuentran en la sangre a elevados niveles, cuando se usan en combinación o solos, pueden proporcionar un diagnóstico muy fiable, sensible y específico del cáncer de vejiga.

### Breve descripción de las figuras

Esta invención se describe con referencia a las formas de realización específicas de la misma y con referencia a las Figuras, en las que:

La Figura 1 representa una tabla que representa el número y el origen de las muestras usadas en el análisis mediante qPCR.

La Figura 2 representa una tabla de marcadores y de sondas oligonucleotídicas de marcadores para el análisis mediante qPCR del cáncer de vejiga de esta invención.

La Figura 3 representa una tabla de los BTM identificados mediante el uso de los métodos con micromatriz con muestras de cáncer de vejiga invasivo.

La Figura 4 representa una tabla de los BTM identificados mediante el uso de los métodos con micromatriz con muestras de cáncer de vejiga superficial.

La Figura 5 representa una tabla de los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo mediante el uso de un análisis mediante una PCR cuantitativa para BTM específicos.

5 Las Figuras 6a - 6af representan histogramas que muestran la frecuencia relativa frente al log<sub>2</sub> de los datos del n° de veces de cambio obtenidos a partir de estudios mediante una PCR cuantitativa de varios marcadores tumorales de tumores de vejiga invasivos y superficiales. La Figura 6a: SPAG5, invasivo; la Figura 6b: SPAG5, superficial; la Figura 6c: TOP2a, invasivo; la Figura 6d: TOP2a, superficial; la Figura 6e: CDC2, invasivo; la Figura 6f: CDC2, superficial; la Figura 6 g: ENG, invasivo; la Figura 6h: ENG, superficial; la Figura 6i: IGFBP5, superficial; la Figura 6j: NOV, superficial; la Figura 6k: NRP1, invasivo; la Figura 6l: NRP1, superficial; la Figura 6m: SEMA3F, superficial; la Figura 6n: EGFL6, invasivo; la Figura 6o: EGFL6, superficial; la Figura 6p: MGP, invasivo; la Figura 6q: SEM2, invasivo; la Figura 6r: SEM2, superficial; la Figura 6s: CHGA, invasivo; y la Figura 6t: CHGA, superficial; la Figura 6u: BIRC5, invasivo; la Figura 6v: BIRC5, superficial; la Figura 6w: UBE2C, invasivo; la Figura 6x: UBE2C, superficial; la Figura 6y: HoxA13, invasivo; la Figura 6z: HoxA13, superficial; la Figura 6aa: MDK, invasivo; la Figura 6ab: MDK, superficial; la Figura 6ac: Thilo, invasivo; la Figura 6ad, Thy1, superficial; la Figura 6ae: SMC4L1, invasivo; 6af: SMC4L1, superficial.

La Figura 7 representa una tabla de los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo mediante el uso de un análisis mediante una PCR cuantitativa para BTM específicos mediante el uso de muestras de orina.

20 La Figura 8 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran la acumulación relativa de los marcadores de cáncer de vejiga en la orina de pacientes y de controles sanos. Los datos se muestran emparejados para cada uno de los doce BTM; la caja superior de cada par representa las muestras de orina de pacientes de control sanos, y la caja inferior representa las muestras de orina de los pacientes con cáncer de vejiga. Las cajas definen los percentiles 25°, 50° y 75°. Todos los datos son el log<sub>2</sub> del n° de veces de cambio con respecto a la mediana del control sano. Los puntos representan los valores atípicos.

25 La Figura 9 representa un gráfico de barras de un análisis mediante una PCR cuantitativa del ARN total extraído a partir de sangre completa en comparación con el ARN de tejido de cáncer de vejiga.

La Figura 10 representa la mediana de la sobreacumulación de los transcritos de los marcadores en la orina de los pacientes con cáncer de vejiga. Los log<sub>2</sub> de la diferencia entre los pacientes y los controles sanos, y los pacientes y los controles no malignos, se muestran por separado.

30 La Figura 11 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran la sobrerepresentación de los transcritos de los marcadores en la orina de pacientes con cáncer en comparación con los controles sanos y no malignos. Las cajas definen los percentiles 25°, 50° y 75°. Todos los datos son relativos a la mediana de los controles sanos. Las cajas con un relleno de puntos se corresponden con las muestras de los sujetos sanos. Las cajas con un relleno sombreado se corresponden con las muestras de los pacientes con una enfermedad urológica no maligna, y las cajas rellenas de trazos discontinuos se corresponden con las muestras de pacientes con cáncer de vejiga. a. HOXA13; b. IGFBP5; c. MDK; d. MGP; e. NRP1; f. SEMA3F; g. SMC4L1; h. TOP2A; i. UBE2C. Los puntos representan los valores atípicos.

35 Las Figuras 12a - 12b representan histogramas que muestran el número de marcadores con una mayor expresión que el percentil 95° de la expresión mediana normal para tumores del tipo invasivo y superficial, respectivamente. Los resultados se basan en los datos de la qPCR para 12 marcadores, y se muestran por separado para cada muestra tumoral.

40 Las Figuras 13a - 13b representan las tablas que muestran el efecto de múltiples marcadores sobre la capacidad para discriminar de forma precisa entre tejido tumoral y tejido no maligno. La tabla se ha construido a partir de las distribuciones normales derivadas de los datos de la qPCR. La Figura 13a representa el efecto de múltiples marcadores sobre la capacidad para discriminar de forma precisa entre tejido de cáncer de vejiga invasivo y tejido no maligno con una especificidad del 95 %. La Figura 13b representa el efecto de múltiples marcadores sobre la capacidad para discriminar de forma precisa entre tejido de cáncer de vejiga superficial y tejido no maligno con una especificidad del 95 %.

45 Las Figuras 14a - 14b representan tablas que muestran la sensibilidad de las combinaciones de marcadores para el carcinoma invasivo de células de transición (TCC) con una especificidad del 95 %, calculada a partir de las distribuciones normales de los datos de la qPCR. La Figura 14a: carcinoma invasivo de células de transición (TCC). La Figura 14b: TCC superficial.

50 Las Figuras 15 representa una tabla que muestra el efecto de múltiples marcadores sobre la capacidad para discriminar de forma precisa entre muestras de orina obtenidas a partir de pacientes con cáncer de vejiga (TCC) y muestras de orina de pacientes con enfermedades urológicas no malignas. La tabla se ha construido a partir de la distribución normal de los datos obtenidos a partir de un análisis de la orina mediante una qPCR.

55 La Figura 16 representa una tabla que muestra la sensibilidad de una combinación de marcadores en orina para la detección del TCC con una especificidad del 95 %, calculada a partir de distribución normal de los datos de la qPCR de la orina.

60 La Figura 17 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran las proporciones de los BTM en el ARN extraído de la orina de pacientes con ambos cánceres de vejiga superficial e invasivo. Las cajas definen los percentiles 25°, 50° y 75°. Las cajas sombreadas en gris representan las muestras de pacientes con un cáncer de vejiga superficial, y las cajas rayadas representan las muestras de pacientes con un cáncer de vejiga invasivo. a. combinación TOP2A / HOXA13; b. combinación TOP2A / IGFBP5; y c. combinación TOP2A / SEMA3F. Los puntos representan los valores atípicos.

65 La Figura 18 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran las proporciones de los BTM en la orina de

pacientes con cáncer de vejiga en diferentes estadios. Las cajas definen los percentiles 25º, 50º y 75º. Las cajas con el relleno de puntos se corresponden con las manchas de los pacientes con tumores superficiales, y las cajas sombreadas en gris se corresponden con las muestras de los pacientes con tumores invasivos en fase 1 y las cajas rayadas se corresponden con las muestras de pacientes con tumores en fase 2 - 3: a. combinación TOP2A / HOXA13; b. combinación TOP2A / IGFBP5; y c. combinación TOP2A / SEMA3F. Los puntos representan los valores atípicos.

La Figura 19 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran las proporciones de los BTM en el ARN extraído de ambos tumores de vejiga superficial e invasivo. Las cajas definen los percentiles 25º, 50º y 75º. Las cajas sombreadas en gris representan las muestras de tumores de vejiga superficiales, y las cajas rayadas representan las muestras de tumores de vejiga invasivos: a. combinación TOP2A / HOXA13, b. combinación TOP2A / IGFBP5, y c. combinación TOP2A / SEMA3F. Los puntos representan los valores atípicos.

La Figura 20 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran una combinación de marcadores para su aplicación en la detección del cáncer de vejiga. Las gráficas muestran la sobrerrepresentación de un grupo de cuatro marcadores en la orina de pacientes con cáncer en comparación con los controles sanos y no malignos. Las cajas definen los percentiles 25º, 50º y 75º. Todos los datos son relativos a la mediana del control sano. Las cajas con el relleno de puntos se corresponden con las muestras de los sujetos sanos. Las cajas con un relleno sombreado en gris se corresponden con las muestras de pacientes con una enfermedad urológica no maligna, y las cajas con un relleno rayado se corresponden con las muestras de pacientes con un cáncer de vejiga: a. HOXA13, b. MGP; c. SEMA3F, y d. TOP2A. Los puntos representan los valores atípicos.

La Figura 21 representa gráficas de cajas y bigotes que muestran una combinación de marcadores para la determinación del tipo histológico del cáncer de vejiga. Las representaciones muestran las proporciones de los BTM en el ARN extraído de de la orina de pacientes con ambos cánceres de vejiga superficial e invasivo. Las cajas definen los percentiles 25º, 50º y 75º. Las cajas sombreadas en gris representan las muestras de pacientes con un cáncer de vejiga superficial, y las cajas rayadas representan las muestras de pacientes con un cáncer de vejiga invasivo: a. combinación TOP2A / SEMA3F, b. combinación TOP2A / HOXA13. Los puntos representan los valores atípicos.

## Descripción detallada

### Definiciones

Antes de describir con detalle las formas de realización de la invención, será útil proporcionar algunas definiciones de los términos según se usan en el presente documento.

El término "marcador" significa una molécula que está asociada cuantitativamente o cualitativamente con la presencia de un fenómeno biológico. Algunos ejemplos de "marcadores" incluyen un gen, un fragmento de gen, un ARN, un fragmento de ARN, una proteína o un fragmento de proteína, los metabolitos relacionados, los subproductos u otras moléculas identificadoras, tanto si están directamente como indirectamente relacionadas con el mecanismo subyacente de un fenómeno.

El término "sensibilidad" significa la proporción de individuos con una enfermedad que dan positivo en el ensayo. Por lo tanto, un aumento en la sensibilidad significa menos resultados falsos negativos en el ensayo.

El término "especificidad" significa la proporción de individuos sin la enfermedad que dan negativo en el ensayo. Por lo tanto, un aumento en la especificidad significa menos resultados falsos positivos en el ensayo.

El término "BTM" o "marcador tumoral de vejiga" o "miembro de la familia de BTM" significa un marcador que está asociado con el cáncer de vejiga. El término BTM también incluye combinaciones de marcadores individuales, cuya combinación mejora la sensibilidad y la especificidad en la detección del cáncer de vejiga. En algunas secciones de esta solicitud, el término BTM puede incluir UBTM (definido en el presente documento) por conveniencia. Algunos ejemplos no limitantes de BTM están incluidos en las Figuras 3 y 4 del presente documento.

Un BTM puede ser identificado mediante la extracción del ARN de una muestra de tejido de un paciente sospechoso de padecer cáncer de vejiga, la aplicación del ARN a una micromatriz que tiene varios oligonucleótidos en la misma, permitiendo que el ARN de la muestra hibride con los oligonucleótidos de la matriz, y cuantificando después el nivel del ARN unido en cada punto de la matriz. Se considera que un marcador es un BTM si su presencia está por encima del umbral de al menos aproximadamente 1,2 veces el que se encuentra en el tejido normal no maligno mediante el uso de métodos con micromatrices. Como alternativa, el umbral puede estar por encima de aproximadamente 2 veces lo normal, de aproximadamente 3 veces más de lo normal, de 4 veces o incluso de aproximadamente 5 veces más de lo normal. Por "normal" queremos significar más del percentil 90º de la población normal. En otros casos, normal puede significar un nivel de presencia del percentil 95º (es decir, aproximadamente 2 desviaciones típicas (DT) de la media), y en otros casos, mayor de aproximadamente del percentil 97,5º (es decir, aproximadamente 3 DT) o del percentil 99º.

En otros casos adicionales más, puede elegirse un BTM que esté presente en un tejido tumoral pero que no esté presente en la sangre en un grado sustancial. Por "grado sustancial" queremos significar que la cantidad de tejido tumoral es de al menos aproximadamente 5 ciclos más, medida mediante una qPCR, que la cantidad que se

encuentra en la sangre.

El término "UBTM" o "marcador tumoral de la vejiga urinaria" o "miembro de la familia de UBTM" significa un marcador BTM que se encuentra en la orina que está asociado con el cáncer de vejiga pero que no incluye TOP2A, MDK ni BIRC5. El término UBTM también incluye combinaciones de dos marcadores y combinaciones de tres marcadores, cuya combinación mejora la sensibilidad y la selectividad en la detección del cáncer de vejiga en muestras de orina. Algunos ejemplos no limitantes de UBTM están incluidos en las Figuras 14a y 14b del presente documento.

En otros casos, un UBTM puede ser identificado en la orina mediante el uso de métodos con micromatrices o mediante el uso de métodos de qPCR mediante el uso de un cebador directo, un cebador inverso y una sonda elegidos según el marcador que se va a evaluar. El umbral para la detección del cáncer de vejiga en la orina puede ser mayor que el nivel del marcador en la orina de sujetos normales que tienen cáncer de vejiga en aproximadamente 1 ciclo (2 veces), 2 ciclos (4 veces), 3 ciclos (8 veces), 4 ciclos (16 veces), 5 ciclos (32 veces) o más.

El término "qPCR" significa una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

El término "expresión" incluye la producción del ARNm a partir de un gen o de una porción de un gen, e incluye la producción de una proteína codificada por un ARN o por un gen o una porción de un gen, e incluye la aparición de un material detectable asociado con la expresión. Por ejemplo, la unión de un ligando de unión, tal como un anticuerpo, a un gen u otro oligonucleótido, de una proteína o de un fragmento de proteína, y la visualización del ligando de unión, están incluidas en el ámbito del término "expresión." Por lo tanto, el aumento en la densidad de un punto en la membrana, tal como de una inmunotransferencia Western, está incluido en el término "expresión" de la molécula biológica subyacente.

El término "tasa de expresión" significa un cambio dependiente del tiempo en la cantidad de un transcrito o de una proteína.

El término "sobrexpresión" se usa cuando la tasa de expresión de un marcador en una célula o en un tipo celular es mayor de que el de otra célula o tipo celular para un periodo de tiempo definido.

El término "acumulación" significa un aumento en la cantidad de un marcador en una muestra en comparación con un valor medio normal. Por "aumento en la cantidad" queremos significar que la cantidad de marcador es mayor que el percentil 90°, 95°, 97,5° 99°, o mayor que el percentil del intervalo normal en al menos aproximadamente 1,2 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces cuando se mide mediante el uso de métodos con micromatrices. Cuando se mide mediante el uso de una qPCR, un "aumento en la cantidad" significa la cantidad de marcador que es mayor que el percentil 90°, 95°, 97,5° o 99° del intervalo normal en al menos aproximadamente 1 ciclo (2 veces), 2 ciclos (4 veces), 3 ciclos (8 veces), 4 ciclos (16 veces), 5 ciclos (32 veces) o más.

Una acumulación incluye un aumento en la cantidad de marcador en una célula (en una base por célula) o puede significar un aumento en el número de células de una muestra que tienen el marcador en particular. Por lo tanto, una acumulación puede significar un aumento en la cantidad total de un marcador en la orina (en una base por volumen) en comparación con una afección no caracterizada por el cáncer de vejiga. Una acumulación también puede reflejar un aumento en la tasa de expresión de un BTM en un tipo celular dado, y/o un aumento en el número de células que expresan un BTM a la tasa de expresión normal. Además, una acumulación también puede reflejar el ARNm libre presente debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular o a la muerte y la destrucción de células.

#### Descripción de las formas de realización de la invención

Se proporcionan marcadores para la detección y la evaluación de tumores, incluyendo el de vejiga. Se ha averiguado que numerosos genes y proteínas están asociados con los tumores de vejiga. Los análisis de micromatrices de las muestras tomadas de pacientes con tumores de vejiga y de muestras no malignas de urotelio normal han conducido al sorprendente descubrimiento de que en muchos tumores de vejiga, los patrones específicos de sobreexpresión de ciertos genes, o la acumulación de los productos de los genes en la orina, están asociados con la enfermedad. Lo más sorprendente es que estos marcadores que se han aislado están presentes a unos niveles elevados en las muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga, pero están presentes a unos niveles bajos en los individuos sanos y, en particular, en los individuos con enfermedades urológicas no malignas, incluyendo aquellos que muestran hematuria. La detección de los marcadores, por ejemplo, de los productos génicos (por ejemplo, de oligonucleótidos tales como el ARNm) y de las proteínas y los péptidos traducidos a partir de los oligonucleótidos, son por lo tanto indicativos de la presencia de un tumor, especialmente de un tumor de vejiga.

Puede apreciarse que el nivel de un marcador en particular o de un conjunto de marcadores puede depender de la cantidad de orina producida en comparación con la cantidad del marcador presente. Por lo tanto, en unas condiciones caracterizadas por una producción de orina reducida (por ejemplo, un volumen de orina reducido), la concentración del marcador puede estar aumentada, pero puede no reflejar el cáncer de vejiga. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la cantidad de un marcador puede ser corregida según la producción total de orina

durante un tiempo dado. Como alternativa, la concentración del marcador puede ser corregida según el número total de células en la muestra de orina, y en otras formas de realización puede ser corregida según las proteínas totales presentes en la orina. Por otro lado, un aumento en la producción de la orina puede diluir un marcador tumoral, y por lo tanto tiende a enmascarar la presencia del cáncer de vejiga. Dichas situaciones pueden estar asociadas con un aumento en la ingesta de agua, una disminución en la ingesta de sal, un aumento en el uso de diuréticos o la supresión en la producción o en la actividad de la hormona antidiurética.

En algunas formas de realización se puede medir la función renal mediante el uso de métodos conocidos en la materia. Estos incluyen, a modo de ejemplo, la medición del aclaramiento de creatinina. Sin embargo, puede apreciarse que existen muchos métodos adecuados para la medición de la función renal. En las afecciones en las que se encuentra una función renal anormal, puede ajustarse la acumulación medida de un marcador mediante el uso de las correcciones apropiadas. Por lo tanto, el cáncer de vejiga puede ser diagnosticado de forma más precisa.

Los marcadores del cáncer pueden ser detectados en una muestra mediante el uso de cualquier técnica adecuada, y puede incluir, pero no se limita a, sondas oligonucleotídicas, una qPCR o anticuerpos creados contra los marcadores del cáncer.

Se apreciará que la muestra que va a ser ensayada no está restringida a una muestra del tejido sospechoso de ser un tumor. El marcador puede ser secretado en el suero, descamado de las membranas celulares o estar asociado con células perdidas en la orina. Por lo tanto, una muestra puede incluir cualquier muestra corporal, e incluye sangre, suero, lavados peritoneales, líquido cefalorraquídeo, muestras de orina y de heces. En los métodos de la invención según se definen en las reivindicaciones anexas, la muestra ensayada es una muestra de orina.

La detección de un marcador de cáncer en una muestra será indicativa de la presencia de un tumor en ese sujeto. Sin embargo, se apreciará que mediante el análisis de la presencia y de las cantidades de expresión de una pluralidad de marcadores de cáncer, la sensibilidad del diagnóstico aumentará y disminuirá la frecuencia de resultados falsos positivos y/o falsos negativos. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, para aumentar tanto la detección como el diagnóstico precoz del cáncer pueden usarse múltiples marcadores.

#### **Metodologías generales para la detección del cáncer**

Las siguientes metodologías son métodos no limitantes que pueden usarse para la detección del cáncer, incluyendo el cáncer de vejiga, mediante el uso de miembros de la familia de BTM o de UBTM.

#### **Métodos de hibridación que usan sondas de ácidos nucleicos selectivas para un marcador**

Estos métodos implican la unión de la sonda de ácido nucleico a un soporte y la hibridación, en condiciones apropiadas, con un ARN o con un ADNc derivado de la muestra de prueba (Sambrook, J., E Fritsch, E. y T Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3<sup>a</sup>. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (2001)). Estos métodos pueden ser aplicados a un BTM o a un UBTM según sea apropiado, derivado de un tejido tumoral o de una muestra de fluido. Las preparaciones de ARN o de ADNc normalmente se marcan con una molécula fluorescente o radiactiva para permitir la detección y la cuantificación. En algunas aplicaciones, el ADN hibridante puede ser marcado con una estructura de marcaje ramificada fluorescente para mejorar la intensidad de la señal (Nolte, F. S., Branched DNA signal amplification for direct quantitation of acid nucleic sequences in clinical specimens. Adv. Clin. Chem. 33, 201 - 35 (1998)). El marcaje no hibridado se elimina mediante un lavado intensivo con soluciones bajas en sal tales como 0,1 x SSC, 0,5 % de SDS antes de cuantificar la cantidad de hibridación mediante una detección por fluorescencia o una densitometría de las imágenes del gel. Los soportes pueden ser sólidos, tales como membranas de nailon o de nitrocelulosa, o consistir en microesferas que se hibridan cuando están en una suspensión líquida. Para permitir el lavado y la purificación, las microesferas pueden ser magnéticas (Haukanes, B-I y Kvam, C., Application of magnetic beads in bioassays. Bio/Technology 11, 60 - 63 (1993)) o estar marcadas con fluorescencia para permitir una citometría de flujo (véase, por ejemplo: Spiro, A., Lowe, M. y Brown, D., A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry. Appl. Env. Micro. 66, 4258 - 4265 (2000)).

Una variación de la tecnología de hibridación es el ensayo QuantiGene PI ex® (Genospectra, Fremont) que combina un soporte con microesferas fluorescentes con una amplificación de la señal del ADN ramificado. Otra variación más de la tecnología de hibridación es el ensayo Quantikine® mRNA (R&D Systems, Minneapolis). La metodología es según se describe en las instrucciones del fabricante. En resumen, el ensayo usa sondas de hibridación oligonucleotídicas conjugadas con Digoxigenina. La hibridación se detecta mediante el uso de anticuerpos anti-Digoxigenina acoplados a fosfatasa alcalina en ensayos colorimétricos.

Otros métodos adicionales son bien conocidos en la materia y no necesitan describirse adicionalmente en el presente documento.

#### **PCR cuantitativa (qPCR)**

La PCR cuantitativa (qPCR) puede llevarse a cabo en muestras tumorales, en muestras de suero, de plasma y de orina, mediante el uso de cebadores y de sondas específicos para los BTM. En unas reacciones controladas, la

cantidad de producto formado en una reacción de PCR (Sambrook, J., E Fritsch, E. y T Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3ª. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (2001)) se correlaciona con la cantidad del molde de partida. La cuantificación del producto de la PCR puede realizarse deteniendo la reacción de PCR cuando está en una fase logarítmica, antes de que los reactivos se vuelvan limitantes. Entonces los productos de la PCR se someten a electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida, teñidos con bromuro de etidio o una tinción del ADN comparable, y la intensidad de la tinción se mide mediante una densitometría. Como alternativa,, la progresión de una reacción de PCR puede medirse mediante el uso de máquinas de PCR tales como la Prism 7000 de Applied Biosystems o el Roche LightCycler, que miden la acumulación de producto en tiempo real. La PCR en tiempo real mide la fluorescencia de los colorantes intercalados en el ADN, tales como Sybr Green en el producto sintetizado en la PCR, o la fluorescencia liberada por una molécula indicadora cuando es escindida de una molécula inactivadora; la molécula indicadora y la inactivadora están incorporadas en una sonda oligonucleotídica que hibrida con la molécula de ADN diana después de la extensión de la hebra de ADN a partir de los oligonucleótidos cebadores. La sonda oligonucleotídica es desplazada y degradada por la acción enzimática de la polimerasa Taq en el siguiente ciclo de la PCR, liberando la molécula indicadora de la inactivadora.

En algunas formas de realización, un conjunto de cebador directo, cebador inverso y sonda incluye la ID. SEC. Nº: 1, la ID. SEC. Nº: 14 y la ID. SEC. Nº: 27 respectivamente. Como alternativa, algunos conjuntos incluyen la ID. SEC. Nº: 2, la ID. SEC. Nº: 15 y la ID. SEC. Nº: 28, respectivamente. En otras formas de realización, algunos conjuntos incluyen la ID. SEC. Nº: 3, la ID. SEC. Nº: 16 y la ID. SEC. Nº: 29 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 4, la ID. SEC. Nº: 17 y la ID. SEC. Nº: 30 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 5, la ID. SEC. Nº: 18 y la ID. SEC. Nº: 31 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 6, la ID. SEC. Nº: 19 y la ID. SEC. Nº: 32 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 7, la ID. SEC. Nº: 20 y la ID. SEC. Nº: 33 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 8, la ID. SEC. Nº: 21 y la ID. SEC. Nº: 34 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 9, la ID. SEC. Nº: 22 y la ID. SEC. Nº: 35 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 10, la ID. SEC. Nº: 23 y la ID. SEC. Nº: 36 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 11, la ID. SEC. Nº: 24 y la ID. SEC. Nº: 37 respectivamente, la ID. SEC. Nº: 12, la ID. SEC. Nº: 25 y la ID. SEC. Nº: 38 respectivamente y la ID. SEC. Nº: 13, la ID. SEC. Nº: 26 y la ID. SEC. Nº: 39 respectivamente.

#### Ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA)

De forma resumida, en los ensayos de ELISA en sándwich se une un anticuerpo policlonal o monoclonal contra el BTM / UBTM a un soporte sólido (Crowther, J. R. The ELISA guidebook. Human Press: Nueva Jersey (2000); Harlow, E. y Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999)) o a microesferas en suspensión. Otros métodos son conocidos en la materia y no necesitan ser descritos adicionalmente en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales pueden derivar de un hibridoma o elegirse de entre genotecas de anticuerpos de fagos (Hust M. y Dubel S., Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. Methods Mol Biol. 295: 71 - 96 (2005)). Los sitios de unión no específica se bloquean con preparaciones de proteína no diana y detergentes. El anticuerpo de captura se incuba después con una preparación de la orina o del tejido que contiene el antígeno BTM / UBTM. La mezcla se lava antes de incubar el complejo anticuerpo / antígeno con un segundo anticuerpo que detecta el BTM / UBTM diana. El segundo anticuerpo normalmente está conjugado con una molécula fluorescente u otra molécula indicadora que puede detectarse con una reacción enzimática, o con un tercer anticuerpo conjugado con un indicador (Crowther, Id.). Como alternativa, en los ensayos ELISA directos, la preparación que contiene el BTM / UBTM puede unirse al soporte o a la microesfera, y el antígeno diana puede detectarse directamente con un conjugado de anticuerpo-marcador (Crowther, Id.).

En la materia se conocen bien métodos para la producción de anticuerpos monoclonales y de antiseros policlonales y en el presente documento no es preciso que se describan adicionalmente.

#### Inmunohistoquímica

La identificación y localización de los marcadores tumorales pueden realizarse mediante el uso de anticuerpos anti-marcador en tumores de vejiga, nódulos linfáticos o metástasis distantes. Dichos métodos también pueden usarse para detectar, por ejemplo, cáncer colorrectal, pancreático, ovárico, melanoma, de hígado, de esófago, de estómago, de endometrio y de cerebro.

En general, los BTM pueden detectarse en los tejidos mediante el uso de inmunohistoquímica (Harlow, E. y Lane, D., Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999)). En resumen, las muestras de tejido incluidas en parafina o incluidas en OCT congeladas se cortan en secciones de 4 - 8 µm en portas de vidrio, se fijan y se permeabilizan, después se incuban con un anticuerpo primario monoclonal o policlonal contra el BTM. El anticuerpo primario puede conjugarse con una molécula de detección o indicadora para la detección directa del antígeno, o como alternativa, el propio anticuerpo primario puede ser detectado con un segundo anticuerpo conjugado con una molécula indicadora o de detección. Después del lavado y de la activación de cualquier molécula indicadora, la presencia del BTM puede visualizarse al microscopio.

Los métodos también pueden usarse para la inmunodetección de miembros de la familia del marcador en el suero o en el plasma de pacientes con cáncer de vejiga, tomados antes y después de la cirugía para eliminar el tumor, para la inmunodetección de miembros de la familia del marcador en pacientes con otros cánceres que incluyen, pero no se limitan a, colorrectal, pancreático, ovárico, melanoma, de hígado, de esófago, de estómago, de endometrio y de



cerebro, y para la inmunodetección de miembros de la familia del marcador en la orina y en las heces de pacientes con cáncer de vejiga.

5 Los BTM y los UBTM también pueden ser detectados en los tejidos o en la orina mediante el uso de otras técnicas de inmunodetección habituales tales como la inmunotransferencia o la inmunoprecipitación (Harlow, E. y Lane, D.,  
Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (1999)). En la  
10 inmunotransferencia preparaciones de proteínas procedentes de tejidos o de fluidos que contienen el BTM / UBTM se someten a electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes o no desnaturizantes. Después, las proteínas se transfieren a un soporte de membrana tal como de nailon. Después el BTM / UBTM se hace reaccionar directa o indirectamente con anticuerpos monoclonales o policlonales según se describió para la  
15 inmunohistoquímica. Como alternativa, en algunas preparaciones, las proteínas pueden ser manchadas directamente sobre las membranas sin una separación electroforética previa. La señal puede ser cuantificada mediante una densitometría.

En la inmunoprecipitación se incubaba una preparación soluble que contiene el BTM o el UBTM con un anticuerpo monoclonal o policlonal contra el BTM / UBTM. La reacción se incubaba entonces con microesferas inertes hechas de agarosa o de poli(acrilamida) con proteína A o proteína G unida covalentemente. Las microesferas de proteína A o G interactúan específicamente con los anticuerpos que forman un complejo inmovilizado de anticuerpo-BTM / UBTM-antígeno unido a la microesfera. Después de un lavado, el BTM / UBTM unido puede ser detectado y cuantificado mediante una inmunotransferencia o un ELISA.

#### **Análisis de los datos de la matriz o de la qPCR mediante el uso de ordenadores**

20 Se recogen los datos primarios y el análisis del nº de veces de cambio se realiza mediante la comparación de los niveles de expresión génica del tumor de vejiga con la expresión de los mismos genes en tejido no tumoral. Se proporciona un umbral para concluir que la expresión está aumentada (por ejemplo, un aumento de 1,5 x, un aumento de 2 veces, y en formas de realización alternativas, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces o un aumento de 5 veces). Puede apreciarse que pueden elegirse otros umbrales para concluir que se ha producido un  
25 aumento en la expresión sin desviarse del ámbito de esta invención. Un análisis adicional de la expresión génica del tumor incluye el emparejamiento de aquellos genes que muestran un aumento en la expresión con los perfiles de expresión de tumores de vejiga conocidos, para proporcionar un diagnóstico de los tumores.

#### **Uso de BTM y de UBTM para monitorizar la progresión de las terapias del TCC**

30 Además de un diagnóstico rápido y una detección precoz del TCC, los marcadores BTM y UBTM detectados en tejido, suero u orina pueden usarse para monitorizar la respuesta de un paciente a la terapia. En estas aplicaciones pueden tomarse muestras de orina y/o de suero a unos intervalos después del inicio de la quimioterapia, de la radioterapia o de la inmunoterapia sistémica, intravesical o intravascular. Un descenso en la acumulación del marcador puede indicar una reducción en el tamaño del tumor, indicativa de un tratamiento eficaz. La tasa de descenso puede usarse para predecir las dosis terapéuticas óptimas para cada paciente o tratamiento.

35 Los marcadores evaluados se eligen de entre genes humanos conocidos. Los genes evaluados están indicados en las Figuras 3 y 4. En las Figuras 3 y 4 están incluidos en nombre del gen, el identificador HUGO, el número del oligo MWG, el número de la secuencia de referencia del ARNm NCBI y el número de referencia de la proteína. Las secuencias completas pueden encontrarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>.

40 Los marcadores identificados como útiles para el diagnóstico y la evaluación del cáncer de vejiga están identificados en la Figura 2 y en la Lista de Secuencias anexa a esta solicitud.

#### **Aspectos de la invención**

Por lo tanto, en ciertos aspectos, esta invención incluye métodos para la detección del cáncer de vejiga, que comprenden la detección de la acumulación de un miembro de la familia de UBTM en la orina según se define en las reivindicaciones anexas.

45 En otros aspectos, el miembro de la familia de UBTM no está asociado a la sangre en un grado sustancial.

En algunos aspectos adicionales, el UBTM se elige de entre el grupo mostrado en las Figuras 3 o 4.

Adicionalmente, en ciertos aspectos, la etapa de detección se realiza mediante la detección de la acumulación del ARNm del BTM o del UBTM.

En algunos aspectos, la etapa de detección se realiza mediante el uso de una micromatriz.

50 En otros aspectos, la etapa de detección se realiza mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o métodos de hibridación.

En algunos aspectos adicionales, la etapa de detección se realiza mediante la detección de la acumulación de una proteína del UBTM.

En algunos aspectos adicionales más, la etapa de detección se realiza mediante la detección de la acumulación de un péptido del UBTM.

En algunos de estos aspectos, la etapa de detección se realiza mediante el uso de un anticuerpo UBTM que puede ser policlonal o monoclonal.

- 5 En algunos aspectos adicionales, un método incluye la detección de la acumulación de dos o más miembros de la familia de UBTM en dicha muestra.

En ciertos de estos aspectos adicionales, un método implica la detección de TOP2A, de MDK o de BIRC5.

Algunos aspectos adicionales más incluyen la detección de uno o más pares de marcadores elegidos de entre el grupo que consiste en TOP2A-HOXA13, TOP2A-IGFBP5 y TOP2A-SEMA3F.

- 10 En otros aspectos de esta invención, un método para la detección del cáncer de vejiga comprende la detección de la acumulación de una combinación de dos o más miembros de la familia de BTM elegidos de entre las Figuras 14a o 14b en una muestra biológica de un paciente sospechoso de padecer cáncer de vejiga.

En algunos de estos aspectos, la muestra biológica se elige de entre el grupo que consiste en sangre, suero, plasma, tejido, orina, heces, líquido cefalorraquídeo y lavado peritoneal.

- 15 Algunos aspectos adicionales más incluyen anticuerpos específicos para un BTM o para un UBTM, y métodos para su producción, bien como anticuerpos policlonales o monoclonales.

En ciertos de estos aspectos puede dirigirse un anticuerpo monoclonal hacia un BTM o un UBTM y se elige del grupo mostrado en las Figuras 3 o 4.

En otro de estos aspectos, un método comprende adicionalmente otro anticuerpo dirigido contra otro BTM o UBTM.

- 20 Algunos aspectos adicionales de esta invención incluyen dispositivos para la detección de un BTM, que comprenden un sustrato que tiene una combinación de reactivos de captura del BTM o del UBTM en el mismo, eligiéndose la combinación de las Figuras 14a o 14b; y un detector asociado a dicho sustrato, siendo el detector capaz de detectar dicha combinación de BTM o UBTM asociada a dichos reactivos de captura.

En ciertos de estos aspectos, un reactivo de captura comprende un oligonucleótido.

- 25 En algunos aspectos adicionales, un reactivo de captura comprende un anticuerpo.

En algunos aspectos, un BTM o un UBTM se elige del grupo especificado en las Figuras 3 o 4.

Esta divulgación también incluye un kit para la detección del cáncer, que comprende un sustrato; una combinación de, al menos, dos reactivos de captura de BTM o de UBTM en el mismo, eligiéndose la combinación de las Figuras 14a o 14b; e instrucciones para su uso.

- 30 Algunos kits incluyen reactivos de captura que son oligonucleótidos específicos para el BTM o para el UBTM, o anticuerpos específicos para el BTM.

En algunos kits, los BTM o los UBTM se eligen de entre el grupo representado en las Figuras 3 o 4.

En ciertos kits, un marcador se elige de entre el grupo que consiste en IGFBP5, MGP, SEMA3F y HOXA13.

- 35 Algunos aspectos adicionales incluyen métodos para la detección de la presencia del cáncer de vejiga, que comprenden la determinación de la presencia en una muestra de orina de uno o más marcadores elegidos de entre el grupo que consiste en BIRC2, CDC2, HOXA13, IGFBP5, MDK, MGP, NOV, NRP1, SEMA3F, SPAG5, TOP2A, y en el que dicho marcador no está sustancialmente presente en la sangre.

- 40 Otros aspectos de esta divulgación incluyen métodos para distinguir una enfermedad de vejiga maligna de una enfermedad de vejiga no maligna, que comprenden la determinación de la acumulación en dicha orina del paciente de uno o más marcadores elegidos de entre el grupo que consiste en HOXA13, IGFBP5, MDK, MGP, NRP1, SEMA3F, SMC4L1, TOP2A y UBE2C; y la determinación de las proporciones de dichos marcadores en dicha muestra, estando la proporción asociada con la presencia del cáncer de vejiga.

En ciertos de estos aspectos, los métodos comprenden la medición de la acumulación de al menos un segundo BTM en la orina.

- 45 En algunas de estas formas de realización, un primer marcador es TOP2A y un segundo marcador se elige de entre el grupo que consiste en HOXA13, IGFBP5 y SEMA3F.

En algunos aspectos adicionales, los métodos incluyen la correlación de una proporción de la acumulación de los marcadores como indicativo del cáncer de vejiga superficial, del cáncer de vejiga invasivo en fase 1 o del cáncer de

vejiga invasivo en fase 2 - 3.

En algunos aspectos adicionales más, esta divulgación incluye métodos para la determinación de la eficacia de la terapia para el cáncer de vejiga, que comprenden la comparación de la presencia de uno o más marcadores elegidos de las Figuras 3 o 4 en una primera muestra de un paciente, con la presencia de uno o más marcadores elegidos de las Figuras 3 o 4 en una segunda muestra de un paciente después de un periodo de tratamiento.

Según se describe en el presente documento, la detección de los tumores puede llevarse a cabo mediante la medición de la expresión de uno o más marcadores tumorales. Inesperadamente se ha averiguado que la asociación entre un aumento en la expresión de cualquiera de una pluralidad de BTM o de UBTM y la presencia de un cáncer de vejiga diagnosticado es extremadamente alta. La mínima asociación significativa detectada tenía un valor de p de aproximadamente 0,018. Muchas de las asociaciones eran significativas a unos valores de p de menos de  $10^{-10}$ . Con dicha elevada significación, puede no ser necesario detectar un aumento en la expresión o en la acumulación en más de un BTM o UBTM. Sin embargo, la redundancia en los BTM de esta invención puede permitir la detección de los cánceres de vejiga con una fiabilidad aumentada.

Los métodos proporcionados en el presente documento también incluyen ensayos de alta sensibilidad. La qPCR es extremadamente sensible y puede usarse para detectar los productos génicos en un número de copias muy bajo (por ejemplo, 1 - 100) en una muestra. Con dicha sensibilidad se posibilita una detección muy precoz de los acontecimientos que están asociados con el cáncer de vejiga.

## Métodos

### Recolección de los tumores

Las muestras de tumores de vejiga y de urotelio no maligno se recogieron a partir de especímenes quirúrgicos extirpados en el Kyoto University Hospital, Japón, y en otros hospitales japoneses colaboradores.

### Recolección de la orina

Las muestras de orina de los controles no malignos y de los pacientes con cáncer de vejiga se obtuvieron en el Kyoto University Hospital, Japón (Fig. 1). Las muestras de los controles sanos se obtuvieron a partir de voluntarios caucásicos y japoneses.

### Extracción del ARN

Los tejidos tumorales se homogenizaron en una mezcla TriReagent:agua (3:1), después se extrajeron con cloroformo. El ARN total se purificó entonces a partir de la fase acuosa mediante el uso del procedimiento RNeasy™ (Qiagen). También se extrajo el ARN de 16 líneas celulares oncológicas y se agrupó para que sirviera como ARN de referencia.

Se extrajo el ARN de la orina mezclando la muestra de orina con un volumen igual de tampón de lisis (guanidina-HCl 5,64 M, sarcosilo al 0,5 %, acetato de sodio 50 mM (pH 6,5) y β-mercaptoetanol 1 mM; el pH se ajustó a 7,0 con Hepes 1,5 M a pH 8). Después se extrajo el ARN total mediante el uso de Trizol y el procedimiento RNeasy™. Las preparaciones de ARN fueron purificadas adicionalmente antes de la síntesis del ADNc mediante el uso del un kit de purificación de PCR Qiagen QIAquick™.

Se extrajo el ARN de la sangre de tres voluntarios sanos mediante la realización de una extracción Trizol/RNeasy™ en células enriquecidas a partir de sangre completa mediante el uso de una sedimentación en dextrano al 3,6 %.

### Preparación de micromatriz en porta

Se imprimieron portas de vidrio recubiertos con epoxi (MWG Biotech) con ~ 30.000 oligonucleótidos 50mer (MWG Biotech) mediante el uso de un robot de micromatrización Gene Machines, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

### Marcaje del ARN e hibridación

El ADNc se transcribió a partir de 5 µg de ARN total mediante el uso de la transcriptasa inversa Superscript II™ (Invitrogen) en reacciones que contienen 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato. La reacción fue a continuación desionizada en una columna Microcon antes de ser incubada con Cy3 o Cy5 en tampón de bicarbonato durante 1 hora a la temperatura ambiente. Los colorantes no incorporados se eliminaron mediante el uso de una columna QIAquick (Qiagen) y la muestra se concentró hasta 15 µl en una SpeedVac. Los ADNcs marcados con Cy3 y Cy5 se mezclaron entonces con tampón Ambion ULTRAhyb™, se desnaturalizaron a 100 °C durante 2 min y se hibridaron en los portas de micromatrices en cámaras de hibridación a 42 °C durante 16 horas. Después los portas se lavaron y se escanearon dos veces en un escáner Axon 4000A™ con dos configuraciones de potencia.

### Análisis con micromatriz de los genes marcadores del cáncer

Se marcó el ARN de 53 tumores de vejiga y 20 muestras de tejido de vejiga no maligno ("normal") con Cy5 y se hibridaron por duplicado o por triplicado con un ARN de referencia marcado con Cy3. Después de la normalización, se estimó entonces el cambio en la expresión de cada uno de los 29.718 genes mediante el nº de veces de cambio y la probabilidad estadística.

## 5 Procedimiento de normalización

Las intensidades de fluorescencia mediana detectadas por el programa informático Genepix™ fueron corregidas mediante la sustracción de las intensidades de fondo locales. Se excluyeron los puntos con una intensidad de fondo corregida menor de cero. Para facilitar la normalización, las proporciones de intensidad y las intensidades de los puntos globales fueron transformadas logarítmicamente. Las proporciones de la intensidad registradas fueron corregidas según el colorante y el sesgo espacial mediante el uso de una regresión local implementada en el paquete LOCFIT™. Las proporciones de la intensidad registradas se regresionaron simultáneamente con respecto a la intensidad global y a la localización del punto. Los residuales de la regresión local proporcionaron el registro corregido del nº de veces de cambios. Para el control de calidad se representaron las proporciones de cada micromatriz normalizada con respecto a la intensidad y a la localización del punto. Las gráficas fueron a continuación inspeccionadas visualmente para comprobar cualquier artefacto remanente. Adicionalmente, se aplicó un modelo de ANOVA para la detección del sesgo de pin-tip. Todos los resultados y los parámetros de la normalización fueron insertados en una base de datos Postgres para su análisis estadístico.

### Análisis estadístico

Para mejorar la comparación del nº de veces de cambio medidos entre las matrices, se escalaron los log2 (proporciones) para que tuvieran la misma desviación típica global por matriz. Esta estandarización redujo la variabilidad promedio dentro de la clase de tejido. Los log2 (proporciones) se modificaron adicionalmente para que tuvieran un valor mediano de cero para cada oligonucleótido, para facilitar la inspección visual de los resultados. Después se usó una prueba de rangos basada en el nº de veces de cambio para mejorar la fortaleza del ruido. Esta prueba consiste en dos etapas: (i) cálculo del rango del nº de veces de cambio (Rfc) en las matrices, y ii) sustracción de la mediana (Rfc) para el tejido normal de la mediana (Rfc) para el tejido tumoral. La diferencia entre ambos rangos medianos define la puntuación del rango del nº de veces de cambio. También se realizaron tres ensayos estadísticos adicionales sobre los datos estandarizados: 1) dos muestras de la prueba de la t de Student, 2) la prueba de Wilcoxon y 3) el análisis estadístico de las micromatrices (SAM). A los 300 genes más significativamente regulados por aumento determinados por cada uno de los métodos estadísticos (rango del nº de veces de cambio, prueba de la t, prueba de Wilcoxon y SAM) se les asignó una puntuación del rango para cada prueba. Si un gen aparecía en una lista, pero no en una o más de las otras, se añadió un factor de ponderación de 500 a su puntuación. Todas las puntuaciones de rango fueron después añadidas a una puntuación de rango sumada.

### Análisis estadístico de las combinaciones de marcadores

Para determinar el valor del uso de combinaciones de dos o tres de los marcadores para discriminar entre muestras tumorales y no malignas, se sometieron los datos de la qPCR de las muestras tumorales y de las no malignas al siguiente análisis. Se generaron las distribuciones normales para las muestras no malignas y para las tumorales mediante el uso de las medias y de las desviaciones típicas de las muestras. Entonces se determinó la probabilidad de que los valores tomados de los datos de expresión tumoral excedan un umbral definido (por ejemplo, mayor del 50 %, del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 99 %) en la distribución no maligna (es decir, la sensibilidad). Para las combinaciones de marcadores, se determinó la probabilidad de que al menos un marcador exceda el umbral.

Para demostrar el valor del análisis de la combinación de marcadores en muestras de orina, así como en muestras tumorales, también se llevó a cabo el análisis de la distribución normal sobre los datos de la qPCR obtenidos mediante el uso de las muestras de orina procedentes de pacientes con TCC y de controles no malignos descritas en la Figura 1, serie 2. Se determinó la probabilidad de que los valores de los datos de la qPCR del paciente con TCC excedan un umbral definido (por ejemplo, mayor del 50 %, del 70 %, del 75 %, del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 99 %) en la distribución de muestras no malignas.

### Métodos para la detección de marcadores del cáncer de vejiga en la orina

En varias formas de realización, pueden llevarse a cabo deseablemente ensayos para los BTM en muestras de orina. En general, los métodos para el ensayo de oligonucleótidos, proteínas y péptidos en estos fluidos son conocidos en la materia. Sin embargo, con fines ilustrativos, los niveles de un BTM en orina pueden cuantificarse mediante el uso de ensayo de tipo sándwich de inmunoadsorción enzimática (ELISA). Para los ensayos con plasma o con suero se añade una alícuota de 5 µl de una muestra diluida apropiadamente o diluida sucesivamente de BTM estándar, y 75 µl de un anticuerpo antiBTM humano conjugado con peroxidasa a los pocillos de una placa de microtitulación. Después de un periodo de incubación de 30 minutos a 30 °C, los pocillos se lavan con un 0,05 % de Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar el anticuerpo no unido. Los complejos unidos de BTM y de anticuerpo anti-BTM se incuban entonces con o-fenilendiamina que contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 minutos a 30 °C. La reacción se detiene mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, y se mide la absorbancia a 492 nm con

un lector de placas de microtitulación. Puede apreciarse que los anticuerpos anti-BTM pueden ser anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales.

Debido a que muchas proteínas (1) son secretadas por células, (2) son escindidas de las membranas celulares, (3) se pierden de las células tras la muerte celular, o (4) están contenidas en células descamadas, se apreciará que los BTM también pueden ser detectados en la orina. Adicionalmente, el diagnóstico del cáncer de vejiga puede ser determinado mediante la medición bien de la expresión de los BTM en una muestra, o bien de la acumulación de los BTM en una muestra. Los métodos de diagnóstico de la técnica anterior incluyen una cistoscopia, una citología y un examen de las células extraídas durante estos procedimientos. Dichos métodos se han basado en la identificación de las células tumorales en la orina o en una muestra de raspado de urotelio, o en otros casos, en especímenes de biopsias de la pared de la vejiga. Estos métodos adolecen de diversos tipos de errores, incluyendo el error en la toma de muestra, errores en la identificación entre observadores, y similares.

### PCR cuantitativa en tiempo real

Una PCR en tiempo real, o cuantitativa (qPCR), se usa para la cuantificación absoluta o relativa del número de copias del molde de la PCR. Se diseñaron conjuntos de sonda y cebador de Taqman™ mediante el uso de Primer Express V 2.0™ (Applied Biosystems). Cuando fue posible se incluyeron todas las potenciales variantes de corte en el amplicón resultante, dándose preferencia en el amplicón a las regiones cubiertas por el oligonucleótido de la micromatriz derivada de MWG-Biotech. Las secuencias de cebador y de la sonda se muestran en la Figura 2. Como alternativa, si el gen diana estaba representado por un ensayo de expresión Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems) que cubría los amplicones deseados, se usaron éstos. En los ensayos diseñados internamente se tituló la concentración del cebador mediante el uso de un protocolo de marcaje SYBR green y un ADNc creado a partir del ARN de referencia. La amplificación se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencias ABI Prism™ 7000 en unas condiciones de ciclación estándar. Cuando se observaron productos de amplificación individuales en las curvas de disociación, se generaron las curvas estándar a lo largo de un intervalo de concentraciones de 625 veces mediante el uso de las concentraciones óptimas de cebador y sondas de fosfato de 5'FAM - 3'TAMRA Taqman™ (Prologo) a una concentración final de 250 nM. Los ensayos que proporcionaban unas curvas estándar con unos coeficientes de regresión superiores a 0,98 se usaron en los ensayos posteriores.

Los ensayos pueden llevarse a cabo en dos placas de 96 pocillos con cada muestra de ARN representada por un único ADNc. Cada placa contenía una curva estándar del ADNc de referencia, a lo largo de un intervalo de concentración de 625 veces por duplicado. El análisis consistía en el cálculo de la  $\Delta CT$  (CT del gen diana - CT media del ADNc de referencia). La  $\Delta CT$  es directamente proporcional al  $\log_2$  negativo del nº de veces de cambio. Entonces se calcularon los  $\log_2$  del nº de veces de cambio con respecto a la mediana del  $\log_2$  del nº de veces de cambio no maligno ( $\log_2$  del nº de veces de cambio - mediana del  $\log_2$  del nº de veces de cambio normal). Entonces pueden agruparse los nº de veces de cambio en clases de frecuencia y representarse gráficamente o en gráficas de caja y bigote.

### Selección de los marcadores en suero y en orina para el cáncer de vejiga

Los supuestos marcadores séricos pueden seleccionarse a partir de los datos de la matriz basándose en (i) la probabilidad de que la proteína codificada sea secretada desde la célula o escindida desde la membrana; la probabilidad de secreción se basaba en el análisis con TargetP™ (Emanuelsson et al; J. Mol. Biol. 300, 1005 - 1006 (2000)) y (ii) su puntuación de la suma de rangos emparejados. Sin embargo, una variación en el grado de sobreexpresión en las muestras tumorales no sólo refleja la heterogeneidad del tumor, sino también variaciones en el grado de contaminación de las muestras tumorales con tejido "normal", incluyendo células de músculo liso, de tejido conectivo y de submucosa (véase la Patente de EE.UU. 6.335.170), células estromales y epitelio no maligno. En muchas situaciones, la contaminación "normal" variaba desde el 5 hasta el 70 %, con una mediana de aproximadamente el 25 %.

Por lo tanto, hemos sido capaces de disminuir estos resultados "falsos positivos" mediante el análisis de los BTM en las muestras de orina, que están muy contaminadas por células normales de la vejiga. Además, mediante el uso de métodos de qPCR, hemos sido capaces de determinar de forma más precisa los niveles de ARNm en una muestra de orina en comparación con el uso de métodos con micromatrices, como en la técnica anterior. Por lo tanto, hemos sido capaces de evitar una contaminación importante con otros tipos celulares de la vejiga, y por lo tanto hemos evitado uno de los problemas más intratables en la materia del análisis con micromatrices de muestras clínicas.

Mediante la medición de la acumulación de marcadores en la orina, y no basándonos en la tasa de expresión en tumores, hemos encontrado inesperadamente varios BTM que son útiles en la detección del cáncer de vejiga y en la determinación de su fase y/o de su tipo. Además, debido a que uno de los principales signos que puede hacer que un paciente visite a su médico sobre un posible cáncer de vejiga es la presencia de sangre en la orina, hemos determinado que los BTM que no son muy expresados en la sangre pueden ser de gran valor en el diagnóstico. Estos marcadores incluyen IGFBP5, MGP, SEMA3F y HOXA13 (véase la Figura 9).

La medición de la acumulación proporciona ventajas sobre la definición de "sobreexpresión." Como se ha mencionado anteriormente, un aumento en la acumulación puede reflejar una verdadera sobreexpresión o un

aumento en la tasa de expresión en un sentido de biología molecular (es decir, un aumento en las cifras de las moléculas de ARN heteronuclear (hnARN), en las moléculas de ARNm o en las proteínas por célula por unidad de tiempo. Sin embargo, la acumulación también puede significar un aumento en la cantidad de marcador en un volumen dado, tal como en orina, incluso si la tasa de expresión no está aumentada. Por ejemplo, incluso si una célula tumoral produce una cantidad normal de un marcador, la observación de un aumento en el número de dichas células en la muestra puede indicar la presencia de cáncer. Además, la acumulación puede reflejar ARN libre o soluble en una muestra. En algunos casos, las células tumorales que produjeron un marcador pueden haber muerto y el contenido celular haber sido liberado en el tejido circundante. Si el contenido celular puede alcanzar la orina, entonces podrá detectarse en ella el marcador de ARN libre. Estos fenómenos pueden ser particularmente útiles en el diagnóstico del cáncer de vejiga superficial, lo que normalmente ha sido difícil de conseguir con selectividad y especificidad. La medición de una acumulación del marcador en la orina puede ser uno de los primeros signos del cáncer de vejiga superficial. Por lo tanto, mediante el uso de los métodos y los dispositivos de esta invención, puede ser posible detectar el cáncer de vejiga en una fase precoz.

También hemos apreciado que al medir la acumulación debe tenerse cuidado en la corrección de los cambios en el volumen de la muestra. Por ejemplo, en orina, la cantidad de un marcador por unidad de volumen puede depender de la función renal del sujeto. Por lo tanto, en unas condiciones de disminución en la producción de orina, las células de la orina (incluyendo las células tumorales) pueden estar concentradas, dando así una medición artificialmente elevada de acumulación (por unidad de volumen). Dichos artefactos pueden disminuirse mediante la realización de mediciones independientes de la producción de orina (por ejemplo, la producción de orina por unidad de tiempo), el aclaramiento urinario (por ejemplo, la medición de la creatinina o del BUN). Por el contrario, en las situaciones en las que está aumentada la producción de orina, tal como en la diuresis, las células que contienen los marcadores pueden estar diluidas y producir una medición artificialmente baja de la acumulación. Sin embargo, se puede controlar el uso de diuréticos, la ingesta de agua y otros factores que pueden producir variaciones en la acumulación del marcador que no están relacionadas con la verdadera acumulación o masa del marcador en una muestra. En estas situaciones se puede corregir la cantidad de un marcador según la tasa de producción de orina.

Por lo tanto, mediante la medición de los BTM en la orina, hemos sido capaces de reducir la incidencia de resultados falsos positivos en comparación con los métodos de la técnica anterior, lo que indica que estos métodos son superiores a los métodos de la técnica anterior.

Se seleccionaron marcadores en la orina a partir de los datos de la matriz, como se ha descrito anteriormente, excepto porque no se aplicaron los criterios de secreción o de escisión desde la membrana. Por lo tanto, como marcadores en la orina se incluyen los marcadores intracelulares y unidos a la membrana que no se predecía que fueran marcadores séricos útiles.

### Ejemplos

Los ejemplos descritos en el presente documento tienen el fin de ilustrar las formas de realización de la invención y no pretenden limitar el ámbito de la invención. Otras formas de realización, métodos y tipos de análisis están en el ámbito de las personas expertas habituales en las técnicas diagnósticas moleculares, y no necesitan ser descritas con detalle en el presente documento.

#### **Ejemplo 1: identificación de marcadores del cáncer de vejiga superficial e invasivo**

La agrupación jerárquica de los datos de la micromatriz procedentes de los patrones de expresión génica del cáncer de vejiga invasivo y superficial mostró un gran número de diferencias significativas. Como resultado, estos tipos de cáncer se trataron por separado en los siguientes análisis. No obstante, una elevada proporción de genes están sobreexpresados en ambos tipos de cáncer. La Figura 3 representa una tabla que muestra los resultados de los estudios con micromatrices para marcadores de un cáncer de vejiga invasivo. Treinta y uno de los 199 marcadores invasivos cumplían los criterios establecidos anteriormente para marcadores séricos (indicados como "S" en la figura). La Figura 4 representa una tabla que muestra los resultados de los estudios con micromatrices para marcadores de un cáncer de vejiga superficial. Treinta y cuatro de los 170 marcadores superficiales cumplían los criterios anteriores para marcadores séricos. Las Figuras 3 y 4 incluyen el símbolo HUGO para el gen ("símbolo"), el número del oligonucleótido MWG Biotech, el número de la secuencia de referencia del ARNm NCBI, el número de la secuencia de referencia de la proteína, la media del nº de veces de cambio entre la expresión génica tumoral y no maligna, el máximo del nº de veces de cambio entre la expresión en muestras tumorales individuales y la mediana de la expresión en muestras no malignas, los resultados de una prueba original no ajustada de la t de Student, los resultados de la prueba de Wilcoxon de 2 muestras y la puntuación de los rangos sumados.

La media del nº de veces de cambio (tumor:tejido no maligno) para los 199 genes en el análisis del marcador del cáncer de vejiga invasivo variaban desde 1,3 hasta 5,3, y el análisis del máximo del nº de veces de cambio variaba desde 2,1 hasta 60,9. Para los análisis del cáncer de vejiga superficial, los 170 marcadores variaban desde una sobreexpresión media de desde 1,1,3 hasta 3,0, y la sobreexpresión máxima variaba desde 1,9 hasta 144. Para cada uno de los marcadores mostrados, se encontró que la significación estadística de su especificidad como marcadores del cáncer era extremadamente alta. Los valores de la prueba de la t de Student estaban todos, con pocas excepciones, por debajo de  $10^{-3}$ , lo que indica que el diagnóstico mediante el uso de estos marcadores está

muy asociado con el cáncer de vejiga. Debería apreciarse que los nos de veces de cambio generados por los estudios con micromatrices tienden a subestimar los cambios en la expresión real observados mediante el uso de técnicas más precisas tales como una qPCR. Sin embargo, por las razones descritas en otro sitio, los análisis con micromatrices pueden adolecer de uno o más artefactos graves. Por lo tanto, hemos desarrollado un método basado en una qPCR para detectar de forma más precisa la presencia y la fase del cáncer de vejiga.

### Ejemplo 2: análisis mediante qPCR

Se obtuvo una cuantificación más sensible y precisa de la expresión génica para un subconjunto de los genes mostrados en las Figuras 3 y 4 mediante el uso de una qPCR. Se analizó el ARN mensajero de hasta 30 tumores de vejiga invasivos, de 25 tumores de vejiga superficiales y de 18 muestras de urotelio normal para 18 genes identificados mediante el análisis con micromatriz (Figuras 3 y 4), estando los resultados mostrados en la Figura 5. Se muestran los datos de ambos tipos de cánceres de vejiga invasivo y superficial para los marcadores SPAG5, TOP2a, CDC2, ENG, NRP1, EGFL6, SEM2, CHGA, UBE2C, HOXA13, MDK, THY1, BIRC5 y SMC4L1. Los marcadores SEMA3F, IGFBP5, y NOV sólo estaban sobreexpresados en comparación con el urotelio normal en el tipo superficial solo, y MGP sólo estaba sobreexpresado en el tipo invasivo solo; estos marcadores mantenían una expresión similar a la del urotelio normal en las muestras tumorales que no estaban sobreexpresadas. La Figura 5 incluye el nombre del gen, los alias de gen, el símbolo del gen, la mediana del nº de veces de cambio entre tejido tumoral (T) y no maligno (N), el máximo del nº de veces de cambio entre las muestras tumorales individuales y la expresión mediana de tejido no maligno y el % de muestras tumorales con unos niveles de expresión mayores del percentil 95º de los niveles de expresión de las muestras no malignas.

La mediana del nº de veces de cambio (tejidos tumorales comparados con la mediana de la expresión en tejido no maligno) para los marcadores de la Figura 5, excepto para CHGA, variaba entre 2 y 128 veces para los tumores de vejiga invasivos, y entre 2 y 39 veces para los tumores de vejiga superficiales. El máximo del nº de veces de cambio para los tumores invasivos variaba entre 24 y 2526 veces, y para los tumores superficiales desde 6 veces hasta 619 veces. El patrón de expresión de CHGA era notable debido a que tenía una expresión muy alta en una proporción de los tumores (Fig. 6s - 6t), pero una expresión indetectable en el resto. La expresión era indetectable en 15 / 25 tumores superficiales, en 15 / 29 tumores invasivos y en 9 / 10 muestras normales. La baja expresión en muestras normales descarta una cuantificación precisa del nivel de sobreexpresión en tumores como una proporción en comparación con la normal, pero cuando la acumulación del ARNm del BTM puede ser medida y cuantificada, y usada como una base para el diagnóstico del cáncer de vejiga. Para los tumores invasivos, el nivel de expresión de los genes SPAG5, TOP2A y CDC2 era mayor en los tumores que en el percentil 95º del intervalo 'normal' para el > 90 % de los casos. Con la excepción de BIRC5, el resto de los genes de la Figura 5 que fueron examinados en tumores invasivos tenían una expresión mayor del percentil 95º de lo normal en > 45 % de las muestras. En los tumores superficiales, el nivel de expresión de los genes SPAG5, TOP2A, CDC2, ENG y NRP1 era mayor en los tumores que en el percentil 95º del intervalo no maligno para el > 80 % de los casos. Con la excepción de CHGA, UBE2C y BIRC5, el resto de los genes de la Figura 5 que fueron examinados en tumores superficiales tenían una expresión mayor del percentil 95º de lo normal en > 40 % de las muestras.

Las Figuras 6a - 6af representan los histogramas que comparan la frecuencia de observación de la expresión de cada uno de una serie de 18 genes (eje vertical) y el log2 del nº de veces de cambio en la expresión para ese gen (eje horizontal), tanto para el tejido normal (barras claras) como para los tejidos tumorales superficiales o invasivos (barras oscuras). Sorprendentemente averiguamos que para cada uno de estos 18 genes, había una separación sustancial en las distribuciones de frecuencia entre el tejido normal y el tumoral. Por ejemplo, la Figura 6c representa los resultados para la expresión de TOP2a en tumores invasivos. Sólo se observaron dos muestras tumorales con un nivel de expresión en el intervalo normal.

La acumulación de 18 BTM, SPAG5, TOP2A, CDC2, ENG, IGFBP5, NOV, NRP1, SEMA3F, EGFL6, MGP, SEM2, CHGA, UBE2C, HOXA13, MDK, THY1, BIRC5 y SMC4L1, en la orina de los pacientes y de los controles (Figura 1: serie de muestras 1) se determinó mediante el uso de una qPCR sobre el ARN total extraído a partir de volúmenes iguales de orina. 17 de los BTM mostraron una mayor acumulación en la orina de los pacientes en comparación con las muestras de orina de control, siendo EGFL6 la excepción (Figura 7). La mediana del número de veces de diferencia para los 17 BTM variaba entre 2 veces y 265 veces. La diferencia máxima entre la muestra de un único paciente y el nivel mediano en los controles variaba entre 26 veces y > 10.000 veces.

La Figura 8 muestra las diferencias en la acumulación del BTM transcrito para 13 BTM representadas como gráficas de caja y bigote, y estandarizada a la expresión mediana en las muestras de control. La Figura 8 muestra que MDK, SEMA3F y TOP2A no se solapan en la orina de los pacientes con cáncer y de los controles. Adicionalmente, los altos niveles de acumulación de los transcritos para IGFBP5, HOXA13, MGP, NRP1, SMC4L1, SPAG4 y UBE2C están casi siempre asociados con el cáncer de vejiga. Para el resto de los BTM representados en la Figura 8, BIRC5, NOV y CDC2, su expresión en la orina de los pacientes con cáncer de vejiga está aumentada en al menos aproximadamente 3 veces en comparación con las muestras de control normales.

El principal síntoma clínico que provoca la realización del ensayo para comprobar la presencia de cáncer de vejiga es la hematuria (es decir, la presencia de niveles macroscópicos o microscópicos de sangre en la orina). La sangre se detecta normalmente visualmente o mediante la detección química de la hemoglobina mediante el uso de tiras

reactivas de orina. Sólo aproximadamente el 15 % y el 4 % de los casos de hematuria macroscópica y microscópica, respectivamente, están asociados con el cáncer de vejiga. Consecuentemente, para que un ensayo de cáncer de vejiga tenga una elevada especificidad, es importante que los niveles de expresión del marcador en la sangre completa sean bajos, o en algunos casos, indetectables. Por lo tanto, para mejorar la identificación de los marcadores que tienen una alta especificidad, se determinó la expresión de entre doce y trece marcadores de la Figura 8 en ARN sanguíneo mediante el uso de una qPCR. La qPCR se realizó sobre 5 µg de ARN total extraído de sangre y de tejido tumoral de vejiga mediante el uso de los cebadores y las sondas descritos en la Figura 2. La Figura 9 muestra el número de ciclos por encima del fondo para cada uno de los marcadores. Para los marcadores MGP, IGFBP5, SEMA3F y HoxA13, no pudieron detectarse los transcritos en sangre, pero los marcadores SMC4L1 y UBE2c, en particular, se expresaban en la sangre. Apreciamos que los datos, que mostraban el número de ciclos de la PCR, son inherentemente una gráfica en log<sub>2</sub>, por lo que un aumento de 1 en el número de ciclos indica una duplicación de la señal. Por lo tanto, en la evaluación de las diferencias entre la presencia del marcador en tejido tumoral y en sangre, una diferencia de dos (2) ciclos indica una diferencia en la expresión de 4 veces. De forma análoga, una diferencia de 5 ciclos (por ejemplo, para TOP2A) indica una diferencia de 2<sup>5</sup>, o de 32 veces. Otros marcadores tales como TOP2A y MDK tienen una expresión en sangre detectable, pero siguen siendo unos marcadores razonables debido a la gran diferencia entre la expresión en sangre y la expresión en los tumores de vejiga.

Para examinar adicionalmente la expresión diferencial de un marcador entre la sangre y los tumores de vejiga, y para refinar la selección de los marcadores en orina del cáncer de vejiga, se seleccionaron nueve marcadores para un análisis adicional mediante el uso del ARN de la orina de 20 pacientes adicionales, 13 controles normales y 26 controles no malignos (Figura 1: serie de muestras 2). Los controles no malignos incluían 20 muestras bien con sangre oculta o bien con glóbulos blancos detectados en la orina mediante una citología. Los nueve marcadores mostraron una diferenciación entre las muestras de los controles y las de los pacientes con cáncer, con una sobrerrepresentación de la mediana del log<sub>2</sub> en las muestras de los pacientes con cáncer que variaba entre 5,4 y 10,4, y entre 4,0 y 10,1 en comparación con las muestras sanas y las muestras no malignas, respectivamente (Figura 10). Las gráficas de cajas y bigotes que ilustran estos datos se muestran en la Figura 11.

Como se predijo por los datos de la qPCR sanguínea, los marcadores UBE2C y SMC4L1 mostraron unos notables aumentos en la acumulación en la orina de los controles no malignos en comparación con los controles sanos. El NRP1 también estaba significativamente elevado en las muestras de orina de las muestras no malignas en comparación con las muestras de orina de los controles sanos, y mostró un solapamiento considerable entre las muestras de los pacientes con cáncer y las muestras de los pacientes no malignos, TOP2A y MDK también mostraron aumentos, pero debido a su expresión muy alta en las células de TCC, mantuvieron una fuerte diferencia entre la acumulación del ARN en las muestras de orina de los pacientes no malignos y la de los pacientes con cáncer. Por el contrario, HOXA13, IGFBP5, SEMA3F y MGP sólo mostraron unos pequeños aumentos en las muestras de orina no maligna en comparación con las muestras de los controles sanos.

Globalmente, seis marcadores (SEMA3F, HOXA13, MDK, IGFBP5, MGP y TOP2A) mostraron un solapamiento mínimo entre las muestras de los pacientes con cáncer y los controles no malignos. El resto de los tres marcadores (NRP1, UBE2C, SMC4L1) mostró un aumento significativo en un subconjunto de los controles no malignos y un solapamiento con las muestras de los pacientes con cáncer. El aumento en la acumulación de los marcadores de ARN en la orina de los controles no malignos en comparación con los controles sanos es coherente con la expresión de estos marcadores en las células de origen hematopoyético o endotelial que están presentes en la orina de los pacientes con una enfermedad no maligna. Por lo tanto, el uso de marcadores individuales para el diagnóstico del cáncer de vejiga mediante el uso de muestras de orina muestra un aumento en la sensibilidad y en la especificidad en comparación con los métodos de la técnica anterior, que no tienen en cuenta la expresión del marcador en sangre. Este resultado era completamente inesperado basándose en la técnica anterior.

Los datos ilustran el sorprendente hallazgo de que la utilidad del uso de los marcadores en orina para el cáncer de vejiga que muestra una elevada sensibilidad y especificidad no puede ser predicha de forma precisa mediante el uso de un análisis con micromatriz de los datos de la expresión génica tumoral solos. Es necesario tener en cuenta la expresión de posibles marcadores en células de origen hematopoyético y/o endotelial. Esto puede conseguirse mediante: (i) un análisis mediante una qPCR del ARN sanguíneo, (ii) un análisis de las bases de datos de la expresión (por ejemplo, genotecas EST de ARN sanguíneo de células vasculares / endoteliales) y/o (iii) un análisis mediante una qPCR del ARN extraído a partir de orina no fraccionada.

### Sensibilidad y especificidad

Tomando como base las dos series de muestras analizadas y divulgadas en el presente documento, la sensibilidad para la detección del cáncer de vejiga excede el 95 %. La especificidad en la serie 2, que incluía las muestras de pacientes con una enfermedad no maligna, también excede el 95 %.

### Ejemplo 3: uso de múltiples marcadores en la detección del cáncer de vejiga

Las Figuras 12a - 12b representan histogramas del número de genes que muestran una expresión significativamente aumentada ("sobrexpresión") en muestras tumorales individuales en comparación con las muestras normales. Los



5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

histogramas se basaban en los datos de la qPCR obtenidos de los doce primeros marcadores mostrados en la Figura 5. De los 30 tumores invasivos en el análisis de la PCR, 27 (el 90 %) sobreexpresaban al menos cuatro genes por encima del percentil 95° (Figura 12a). De los 25 tumores superficiales del análisis, 23 (92 %) sobreexpresaban al menos cuatro genes por encima del percentil 95° (Figura 12b). Estos hallazgos indican que, en las situaciones en las que hay múltiples genes sobreexpresados con respecto al tejido normal, la fiabilidad de la detección del cáncer puede ser muy alta, haciendo que el diagnóstico del cáncer sea más inequívoco. Sin embargo, en algunos casos, la elevación de la expresión de un único gen marcador es suficiente para dar lugar a un diagnóstico de cáncer.

La fiabilidad de la discriminación con éxito entre muestras tumorales y no tumorales mediante el uso de combinaciones de marcadores se ilustra adicionalmente mediante el análisis estadístico representado en la Figura 13. Este análisis comparaba las distribuciones normales de los datos de la expresión génica de la qPCR de muestras tumorales y no malignas. Los datos de la qPCR se han resumido en la Figura 5. El análisis muestra el efecto del aumento del número de marcadores usados para discriminar entre muestras tumorales y no malignas sobre la sensibilidad del ensayo (con una especificidad fija del 95 %). Aunque pocos de los 18 marcadores tienen una sensibilidad de más del 90, del 95 o del 99 % cuando se usan solos en este análisis, la combinación de dos o tres marcadores permitió alcanzar una elevada sensibilidad con grandes cifras, de combinaciones de dos o tres marcadores (Figuras 14a y 14b).

Las Figuras 14a y 14b muestran la sensibilidad de los marcadores y las combinaciones de marcadores específicas para la detección del carcinoma de células de transición invasivo y superficial (TCC), cuando la especificidad se ha fijado en el 95 %. Únicamente se han mostrado las combinaciones con una sensibilidad de > 90 %. De los 15 marcadores mostrados en la Figura 14a, el cáncer de vejiga invasivo puede ser detectado con una sensibilidad de aproximadamente el 95 % para TOP2A, SPAG5 y CDC2 de forma individual. Otros marcadores mostrados tienen una sensibilidad menor cuando se usan de forma individual.

Sin embargo, las combinaciones de dos de los anteriores marcadores mejoraron drásticamente la sensibilidad de la detección del cáncer de vejiga invasivo (Figura 13a y Figura 14a). Una sensibilidad mayor del 95 % puede conseguirse mediante el uso de 13 de las 105 combinaciones de dos marcadores. De hecho, mediante el uso de dos marcadores se obtiene una sensibilidad mínima del 90 % en 42 de las 105 combinaciones de marcadores.

Para el cáncer de vejiga superficial (Figura 13b y Figura 14b), no puede conseguirse una sensibilidad mayor del 90 % con ninguno de los marcadores de forma individual, sin embargo, este umbral se alcanzó con 11 de las 136 combinaciones de dos marcadores. Una sensibilidad del > 95 % se alcanzó con 22 combinaciones de tres marcadores.

El uso de combinaciones de marcadores también puede mejorar drásticamente la sensibilidad de la detección del cáncer de vejiga mediante el uso de muestras de orina. Las Figuras 15 y 16 muestran la sensibilidad de la detección de los marcadores individuales y de las combinaciones de marcadores mediante el uso de los datos de la qPCR de la orina.

Como se observa en la Figura 16, aunque únicamente el IGFBP5 solo tenía una sensibilidad del > 95 %, ocho combinaciones de dos marcadores y 37 combinaciones de tres marcadores alcanzaron este umbral.

**Ejemplo 4: acumulación diferencial de transcritos en pacientes con cáncer de vejiga superficial e invasivo**

A partir de la Figura 5 puede observarse que varios BTM, incluyendo SEMA3F, HOXA13, TOP2A y SPAG5, muestran una expresión diferencial entre los cánceres de vejiga invasivos y los cánceres de vejiga superficiales. Para ampliar esta observación se comparó la acumulación de estos transcritos en la orina de pacientes con cáncer de vejiga invasivo y superficial.

Se extrajo ARN a partir de volúmenes iguales de orina procedentes de los pacientes descritos en la Figura 1 y se determinó la acumulación de los BTM mediante una qPCR. La acumulación de las combinaciones específicas de BTM se expresó entonces en forma de proporciones. Las combinaciones de BTM consistían en un BTM con una mayor sobreexpresión en los tumores de vejiga invasivos en comparación con los tumores de vejiga superficiales, y un BTM con una mayor sobreexpresión en los tumores superficiales en comparación con los tumores invasivos.

La Figura 17 muestra una combinación de tres marcadores analizados en muestras de orina de 20 pacientes con TCC superficial y 14 con invasivo. Las tres combinaciones mostradas son: (i) TOP2A y HOXA13, (ii) TOP2A e IGFBP5, y (iii) TOP2A y SEMA3F. Puede observarse que estas combinaciones de marcadores son capaces de diferenciar entre las muestras de orina de los pacientes con un TCC superficial y con uno invasivo. Otros marcadores de la Figura 5 que muestran una diferencia en la expresión entre los tipos superficial e invasivo de TCC también son capaces de determinar el tipo de TCC, basándose en el análisis de una muestra de orina.

Además, la Figura 18 muestra que el uso de la combinación de dos marcadores que incluyen TOP2A puede usarse para distinguir entre el cáncer de vejiga invasivo en fase 1 - 2 y los tumores en fase 3.

Estas observaciones muestran que la determinación de la acumulación de varios transcritos de BTM en la orina

permite la distinción entre las formas invasiva y superficial del cáncer de vejiga. Lo que es más, las proporciones de los BTM determinadas mediante una qPCR de las muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga permite una diferenciación más potente entre los tipos invasivo y superficial que los mismos análisis realizados sobre el ARN tumoral. Esto está ilustrado en la Figura 19, que muestra una representación de cajas y bigotes para: (i) TOP2A y HOXA13, (ii) TOP2A y IGFBP5, y (iii) TOP2A y SEMA3F, mediante el uso de los datos de la qPCR de aproximadamente 23 preparaciones de ARN tumoral de vejiga superficial y 28 de invasivo; aunque las proporciones de estos BTM todavía permiten una distinción entre los tipos superficial e invasivo del cáncer de vejiga, existe un mayor solapamiento entre las proporciones del superficial y del invasivo. Este hallazgo puede reflejar la contaminación de las preparaciones de ARN tumoral con tipos celulares tales como muscular y fibroblastos, que no tienen la misma proporción de BTM que las células malignas. Como alternativa, puede reflejar una expresión diferencial más potente de los BTM en las células malignas, que están descamadas en la orina, que aquellas células que permanecen en el cuerpo del tumor. Independientemente de la razón de esta observación, hemos concluido que la detección de la acumulación de los BTM en la orina presenta unas ventajas sustanciales sobre los análisis convencionales con micromatriz de muestras de tejido.

### 15 **Ejemplo 5: anticuerpos contra los marcadores tumorales de vejiga**

En algunos aspectos adicionales, esta invención incluye la elaboración de anticuerpos contra los BTM. Mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento, pueden identificarse nuevos BTM mediante el uso de un análisis con micromatriz y/o de una qPCR. Una vez identificado un supuesto marcador, puede ser producido en una cantidad suficiente para que sea adecuado para desencadenar una respuesta inmunitaria. En algunos casos puede usarse un BTM completo, y en otros puede ser suficiente un fragmento peptídico de un BTM como inmunógeno. El inmunógeno puede ser inyectado en un hospedador adecuado (por ejemplo, un ratón, un conejo, etc.) y si se desea, puede inyectarse un coadyuvante, tal como el coadyuvante completo de Freund, el coadyuvante incompleto de Freund, para aumentar la respuesta inmunitaria. Puede apreciarse que la elaboración de anticuerpos es rutinaria en las técnicas inmunológicas y no necesita ser descrita adicionalmente en el presente documento. Como resultado pueden producirse anticuerpos contra los BTM o los UBTM identificados mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento.

En algunas formas de realización adicionales más, pueden elaborarse anticuerpos contra la proteína o el núcleo de la proteína de los marcadores tumorales identificados en el presente documento, o contra una secuencia oligonucleotídica única de un BTM. Aunque algunas proteínas pueden estar glucosiladas, las variaciones en el patrón de glucosilación pueden dar lugar, en ciertas circunstancias, a una incorrecta detección de las formas de los BTM que carezcan de los patrones de glucosilación habituales. Por lo tanto, en algunos aspectos de esta invención, los inmunógenos de BTM pueden incluir BTM desglucosilados o fragmentos de BTM desglucosilados. La desglucosilación puede llevarse a cabo mediante el uso de una o más glucosidasas conocidas en la materia. Como alternativa, puede expresarse el ADNc del BTM en líneas celulares deficientes en glucosilación, tales como líneas celulares procariotas, incluyendo *E. coli* y similares.

Pueden elaborarse vectores con oligonucleótidos que codifican el BTM en los mismos. Muchos de dichos vectores pueden basarse en los vectores habituales conocidos en la materia. Los vectores pueden usarse para transfectar diversas líneas celulares para producir líneas celulares productoras de BTM, que pueden usarse para producir las cantidades deseadas de BTM para el desarrollo de anticuerpos específicos o de otros reactivos para la detección de los BTM o para el desarrollo de ensayos estandarizados para los BTM o los UBTM.

### 40 **Ejemplo 6: kits**

Tomando como base los descubrimientos de esta invención pueden contemplarse y producirse varios tipos de kits de ensayo. En primer lugar pueden elaborarse kits que tienen un dispositivo de detección precargado con una molécula de detección (o "reactivo de captura"). En las formas de realización para la detección del ARNm de los BTM, dichos dispositivos pueden comprender un sustrato (por ejemplo, vidrio, sílice, cuarzo, metal, etc.) sobre el que se unen los oligonucleótidos como reactivos de captura que hibridan con el ARNm que se va a detectar. En algunas formas de realización, puede realizarse la detección directa del ARNm mediante la hibridación del ARNm (marcado con cy3, cy5, radiomarcado o con otro marcaje) con los oligonucleótidos del sustrato. En otras formas de realización, la detección del ARNm puede realizarse creando en primer lugar un ADN complementario (ADNc) del ARNm deseado. Después puede hibridarse el ADNc marcado con los oligonucleótidos del sustrato, y ser detectado.

Independientemente del método de detección empleado, es deseable la comparación de la expresión del BTM del ensayo con una medición estándar. Por ejemplo, puede estandarizarse la expresión del ARN al ADN celular total, a la expresión de los ARN expresados constitutivamente (por ejemplo, ARN ribosómico) o a otros marcadores relativamente constantes. En las formas de realización que miden los BTM en los fluidos corporales, tales como la orina, el estándar puede ser un volumen igual de orina obtenido a partir de sujetos sin enfermedad maligna, según se muestra en el presente documento.

También pueden usarse anticuerpos en los kits como reactivos de captura. En algunas formas de realización, un sustrato (por ejemplo, una placa multipocillo) puede tener unido al mismo un reactivo de captura específico para un BTM o un UBTM. En algunas formas de realización, un kit puede tener incluido un reactivo de bloqueo. Los reactivos

de bloqueo pueden usarse para reducir la unión no específica. Por ejemplo, la unión de oligonucleótidos no específicos puede reducirse mediante el uso de un exceso de ADN de cualquier fuente conveniente que no contenga oligonucleótidos del BTM, tal como ADN de esperma de salmón. La unión no específica del anticuerpo puede reducirse mediante el uso de un exceso de una proteína de bloqueo tal como la albúmina sérica. Puede apreciarse que en la materia se conocen numerosos métodos para la detección de oligonucleótidos y de proteínas, y cualquier estrategia que pueda detectar específicamente las moléculas asociadas a los BTM puede ser usada y considerada en el ámbito de esta invención.

En las formas de realización que se basan en la detección con anticuerpos, las proteínas o los péptidos del BTM pueden ser expresados en una base por célula, o en una base de células totales, de tejido o de proteínas en el fluido, de volumen de fluido, de masa de tejido (peso). Adicionalmente, el BTM del suero puede ser expresado sobre la base de una proteína sérica con una abundancia relativamente alta, tal como la albúmina.

Además de un sustrato, un kit de ensayo puede comprender reactivos de captura (tales como sondas), soluciones de lavado (por ejemplo, SSC, otras sales, tampones, detergentes y similares), así como fracciones de detección (por ejemplo, cy3, cy5, radio marcajes, y similares). Los kits pueden incluir también instrucciones para su uso y un envase.

#### **Ejemplo 7: combinaciones de BTM usadas para la detección del cáncer de vejiga I**

En una serie de formas de realización, los reactivos para el ensayo de los BTM HOXA13, MGP, SEMA3F y TOP2A, solos o en combinación, pueden ser incorporados en un kit para el ensayo de orina no fraccionada o de sedimentos celulares de la orina para la detección del cáncer de vejiga. El intervalo de acumulación de estos BTM en los pacientes con cáncer y en los controles se muestra en la Figura 20. Las muestras de orina se recogieron de pacientes con un cáncer de vejiga diagnosticado que requerían monitorización para comprobar la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento, de individuos con síntomas urológicos que incluyen hematuria macroscópica y microscópica, o de individuos asintomáticos. Para los pacientes o los individuos que se van a ensayar con un kit que mide los BTM en orina no fraccionada, pueden tomarse aproximadamente 2 ml de la orina para el ensayo. Para los ensayos con el sedimento de la orina pueden recogerse > 20 ml de orina.

Un kit adecuado incluye: (i) instrucciones para su uso y la interpretación de los resultados, (ii) reactivos para la estabilización y la purificación del ARN a partir de orina no fraccionada o de sedimentos de orina, (iii) reactivos para la síntesis de ADNc que incluyen los dNTP y la transcriptasa inversa, y (iv) reactivos para la cuantificación del ADNc del BTM. En una forma, estos reactivos se usarían para una PCR cuantitativa e incluirían cebadores oligonucleotídicos específicos que abarcan el exón, un tercer oligonucleótido marcado con una sonda para su detección, polimerasa Taq y los demás tampones, sales y dNTP necesarios para la PCR. El kit también puede usar otros métodos para la detección de los transcritos, tales como la hibridación directa del ARN del BTM con sondas marcadas, o una tecnología de ADN ramificado; (v) oligonucleótidos y una sonda para la detección de los transcritos a partir de un gen altamente transcrito, tal como  $\beta$ -actin, para que sirva como una medida de control de calidad; y (vi) muestras cuantificadas de la secuencia del BTM diana para que actúen como un patrón de calibración interno y como referencia del límite superior de acumulación del transcrito de BTM en los controles sanos y no malignos. El límite superior puede definirse como el percentil 95° o 99° del intervalo de control, aunque podrían aplicarse otros límites. En particular, para el diagnóstico del cáncer de vejiga superficial, un umbral conveniente es por encima de aproximadamente el 50 %, en otros casos por encima de aproximadamente el 60 %, el 70 % o el 80 %.

Por lo tanto, mediante el uso de los métodos de esta invención, se puede detectar el cáncer de vejiga, así como la fase y el tipo, con un aumento en la sensibilidad y en la especificidad en comparación con los métodos de la técnica anterior.

En algunas formas de realización, la función renal puede determinarse mediante el uso de métodos convencionales (por ejemplo, mediciones de la creatinina). En algunas de estas formas de realización, la acumulación del marcador puede ser corregida según una medición de la función renal (por ejemplo, volumen de orina, volumen de células, número de células o proteínas celulares totales en la muestra de orina).

Para los ensayos que implican una qPCR, las muestras de ensayo que exceden el límite superior predeterminado se puntuarían como positivas si la acumulación del BTM en la muestra de ensayo fuera mayor de un ciclo de PCR mayor que el límite superior. Para otros métodos de detección, unos resultados mayores de 2 veces por encima del límite superior (por ejemplo, del percentil 90°, 95° o 97,5°) de lo normal se puntuarían como positivos.

#### **Ejemplo 8: combinaciones de BTM usadas para la detección del cáncer de vejiga II**

En otra serie de formas de realización, puede usarse la acumulación en la orina de cualquiera o ambas de las combinaciones de marcadores TOP2A / SEMA3F y TOP2A / HOXA13 para proporcionar una potente predicción del tipo histológico del cáncer de vejiga que está presente en un paciente con un diagnóstico de cáncer de vejiga realizado mediante el uso de un ensayo en orina o en sangre de cualquier tipo. Por lo tanto, puede no ser necesaria una cistoscopia ni un examen histológico para el diagnóstico del tipo de cáncer de vejiga.

Los kits usados para el ensayo de estas proporciones contienen desde (i) hasta (iv) de los componentes descritos en

el Ejemplo 7. Después de la cuantificación de la acumulación de los BTM de acuerdo con la práctica estándar de la qPCR, se calcularon las proporciones de TOP2A / SEMA3F y de TOP2A / HOXA13. Los intervalos de estas proporciones en la orina de los pacientes con cáncer de vejiga superficial e invasivo se muestran en la Figura 21. Mediante el uso de un ensayo de qPCR, una diferencia menor de cinco ciclos entre TOP2A y SEMA3F, siendo SEMA3F el transcrito más abundante, puede predecir un cáncer de vejiga invasivo, y si es mayor de cinco ciclos, puede predecir un cáncer de vejiga superficial. Para TOP2A y HOXA13, una diferencia menor de ocho ciclos, siendo HOXA13 el transcrito más abundante, puede predecir un cáncer de vejiga invasivo, y si es mayor de ocho ciclos puede predecir un cáncer de vejiga superficial.

**Ejemplo 9: evaluación de la progresión del cáncer de vejiga mediante el uso de los BTM**

10 Para evaluar la progresión de los tumores de vejiga, se obtienen muestras de tejido mediante una biopsia de la pared de la vejiga o se recogen muestras de orina con el tiempo a partir de un paciente que padece cáncer de vejiga. Se realiza una evaluación de la acumulación de los BTM, de los UBTM o de combinaciones de los mismos para las muestras tomadas en diferentes momentos. Un aumento en la acumulación de los BTM o de los UBTM individuales, o de las combinaciones, es indicativa de la progresión del cáncer de vejiga.

**15 Ejemplo 10: evaluación de la terapia del cáncer de vejiga mediante el uso de los BTM**

Para evaluar la eficacia de la terapia de los tumores de vejiga, se obtienen muestras de tejido y/o de orina antes de iniciar el tratamiento. Se determinan los niveles en el momento inicial de uno o más de los BTM o de los UBTM, al igual que las proporciones de los diversos BTM y UBTM entre sí. Se inicia el tratamiento, y puede incluir cualquier terapia conocida en la materia, incluyendo cirugía, radioterapia o quimioterapia, según sea apropiado para el tipo y la fase de la enfermedad. Durante el transcurso de la terapia se recogen muestras de tejido y/o de orina y se analizan para evaluar la presencia y la cantidad de los BTM y/o UBTM. Se determinan las proporciones de los diversos BTM y UBTM y los resultados se comparan con: (1) los niveles en el momento inicial del paciente antes del tratamiento, o (2) los valores normales obtenidos a partir de una población de individuos que no padecen cáncer de vejiga.

25 Algunos métodos para la detección de los miembros de la familia de BTM y de UBTM incluyen la detección de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos mediante el uso de métodos con micromatrices y/o una PCR en tiempo real. Las composiciones y los métodos de esta divulgación son útiles en el diagnóstico de la enfermedad, en la evaluación de la eficacia de la terapia y en la producción de reactivos y de kits de ensayo adecuados para la medición de la expresión de los miembros de la familia de BTM o de los miembros de la familia de UBTM.

**Lista de secuencias**

- 30 <110> Pacific Edge Biotechnology Ltd.
- <120> Marcadores en la orina para la detección del cáncer de vejiga
- <130> GL226181EP
- 35 <150> NZ534289
- <151> 23-07-2004
- <150> NZ539219
- <151> 04-04-2005
- 40 <150> US 60/692619
- <151> 20-06-2005
- <160> 39
- 45 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 22
- 50 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- aattcagagg ccttctgaag ga 22
- 55 <210> 2
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 60

ES 2 540 108 T3

<400> 2  
ccgcccagac acctacattg 20

5 <210> 3  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 3  
gccgccgagg aataat 16

10 <210> 4  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

15 <400> 4  
gcaggtgtca gcaagtatga tca 23

20 <210> 5  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

25 <400> 5  
aattgtgacc gcaaaggatt ct 22

30 <210> 6  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
cggaccccag caacca 16

35 <210> 7  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

40 <400> 7  
ggagtggtgt gaccagcaag ac 22

45 <210> 8  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

50 <400> 8  
cctgtcattt acgctgtctt tacct 25

55 <210> 9  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 9  
tgctctcctg ggtggcag 18

60 <210> 10  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

65 <400> 10  
ttcatatccc ctcagcagag atg 23  
<210> 11

ES 2 540 108 T3

<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 11  
5 ctcgagggtgt acgcgctgt 19

<210> 12  
<211> 21  
<212> ADN  
10 <213> Homo sapiens

<400> 12  
tacaaggaga tccggaagg c 21

15 <210> 13  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20 <400> 13  
tgaacctggc catcagcat 19

<210> 14  
<211> 22  
25 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
30 tctgctgaac cagctcttct tg 22

<210> 15  
<211> 26  
<212> ADN  
35 <213> Homo sapiens

<400> 15  
ccctatagtt aatgccaaca tcttca 26

40 <210> 16  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
45 accttctcca attttctcta ttttgg 26  
<210> 17  
<211> 21  
<212> ADN  
50 <213> Homo sapiens

<400> 17  
atggtgaggc agtgcacctt t 21

<210> 18  
<211> 18  
<212> ADN  
55 <213> Homo sapiens

<400> 18  
60 cagcagatgc cagccttg 18

<210> 19  
<211> 23  
<212> ADN  
65 <213> Homo sapiens

ES 2 540 108 T3

<400> 19  
 ccccatcgaa cacacagtta tct 23

5 <210> 20  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 20  
 cgtcagcttg ggaatagatg aag 23

15 <210> 21  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 21  
 gcgaatatca gccatggagt aga 23

25 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 22  
 tagtgacaga cccaggctg a 21

35 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 23  
 ttgagctcgt ggacaggctt a 21

45 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 24  
 gcccggtgaa aacctccc 18

55 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

60 <400> 25  
 caggctccc agctccatc 19

65 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

70 <400> 26  
 cgtaggctg gtcaccttct g 21

75 <210> 27  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

80 <400> 27  
 acccaactgg tagggcttca tgcca 25

ES 2 540 108 T3

<210> 28  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 28  
 ttctgtggaa ttagtgaccc agcaaattgtg 30  
  
 10 <210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 15 <400> 29  
 agccgggatc taccataccc atgactaac t 31  
  
 <210> 30  
 <211> 27  
 20 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 30  
 aatgaggcgg tggtaatat cctgtcg 27  
  
 25 <210> 31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <400>31  
 aagagaaagc agtgcaaacc ttcccg 27  
 <210> 32  
 <211> 22  
 35 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 32  
 tggcatctgc acggcggtag ag 22  
  
 40 <210> 33  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 45 <400> 33  
 cccattcagg atcacacagg agatggc 27  
  
 <210> 34  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 50 <400> 34  
 ctctggctcc gtgtccgag gc 22  
  
 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 60 <400> 35  
 acgcgccag tgcaaggcat 20  
  
 65 <210> 36  
 <211> 32



# ES 2 540 108 T3

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
5 agagctaaag tccaagagag gatccgagaa cg 32

<210> 37  
<211> 23  
<212> ADN  
10 <213> Homo sapiens

<400> 37  
caccgtcagt gccgtgtcc agg 23

15 <210> 38  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20 <400> 38  
agagtcggtc ggaggctctg gctg 24

<210> 39  
<211> 27  
25 <212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<400> 39  
tgctaacagt cttgcaggtc tcccgag 27

30

## REIVINDICACIONES

1. Método para detectar cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende:

5 detectar la acumulación de un péptido o proteína marcadora de tumor de vejiga urinario o un ácido nucleico que codifica dicha proteína o péptido ("UBTM") en orina, dicha acumulación en dicho sujeto siendo superior a aproximadamente 1.2 veces la acumulación de dicho UBTM en la orina de un grupo de sujetos normales que no tienen cáncer de vejiga maligno, caracterizado porque el UBTM es la proteína 5 de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP5).

10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho UBTM no está presente en la sangre en un grado sustancial.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende la detección de la acumulación de al menos un UBTM adicional, en el que el UBTM se elige de entre el grupo que consiste en GGH, SPP1, NRN1, SPARC, ADAMTS10, CNTN1, TLL2, PDIR, FBN1, el producto del gen KIAA0100, CALR, ITGBL1, ELA3B, SMO2, HEXA, IGFBP7, MFAP2, CILP, OLFM1, LUM, SEM2, PRSS11, SULF1, SERPINH1, MGP, TIMP1, EGFL6, SPAG11, SEMA3F, CDC2, MDK, TOP2A, UBE2C, STMN1, TU B A4, HIST1H1B, HMGB2, CCNA2, CDCA1, la proteína hipotética MGC5576, DEK, MLF1IP, CDCA8, la proteína hipotética FU20647, TYMS, SMC4L1, LYN, HMGB3, PTGIR, DONSON, HMMR, CLDN6, HIST1H1D, C10orf3, KNTC1, CKS1B, RRM2, HIST1H2BH, STK6, MPHOSPH1, CCNB2, GPR32, ENG, MFHAS1, HIST1H1C, AVPR2, CENPF, , el miembro g de la familia de histonas h4, el gen MGC27121, NP, ASPM, la proteína hipotética FU11871, LBH, NUDT1, HELLS, ASB9, MCM5, IMP-2, DKFZP566M1046, TUBA2, GAS2L3, la proteína hipotética FU12442, MCM6, DOK3, WDR18, CKAP2, KIF20A, la posible proteína fap, C6orf32, NEK2, CRY1, TGM2, DLG7, EIF2C2, DEPDC1, HIST2H4, MCM7, MTAP, KNTC2, HSPC150, SMC6L1, HIST1H2BC, ASF1B, ARH, LMNB1, la proteína hipotética FLJ10719, la proteína hipotética FU10706, MAD2L1, SLC22A2, la proteína hipotética MGC34923, SPAG5, ACVRL1, DSCR1, PRSS15, S100A9, MCM4, ST7L, PLEKHA4, EPHB1, CALD1, SMC1L1, el co-transcrito Thy-1, RAMP, FKBP11, C20orf129, HIST1H4H, CDKN3, MCAM, SNCAIP, NIPSNAP1, AP1M1, ANLN, C6orf69, TORC3, MAZ, TXNRD1, la proteína hipotética xp 096695, C22orf4, VSNL1, similar a la cadena N de 83 kDa de la carboxipeptidasa, KIAA1598, la proteína hipotética FLJ13501, DKFZP4340047, la proteína hipotética FLJ38716, similar a la proteína hipotética (región L1H3), la proteína hipotética KIAA1875, PRIM1, la proteína hipotética BC001096, MCM2, GJA3, C11orf30, similar a la proteína hipotética FU30672, THY1, LRP3, LASS2, C18orf8, ZNF81, NARF, MTHFD2, D6T, SIAT7D, MMPL1, KLK11, KPNA2, FGFR1OP2, VIM, la proteína FLJ44108, PAPOLG, FHOD1, RASL12, HMG2, PITPNM2, DER1, EPHA4, VSIG1, RGS5, la proteína KIAA1639, SH2B, PGLYRP4, CDC45L, MLSTD1, la proteína hipotética MGC11266, TNFRSF13B, NET1, LHFPL5, MX2, SPHK1, ABCG4, SERPINB2, GALNT10, LEPR, MXD4, FAPP2, NUP210, CSK, NRP1, MGAT1, el producto del gen KIAA0100, LCN7, BMP7, ADAMTS10, PM5, NOMO3, CPA6, NPPC, la proteína hipotética FU23221, ERP70, GALNT14, ITIH3, PAPP2, LOXL1, TNFRSF6B, SPARC, MSMB, CLDN6, PTMA, AVPR2, similar al transportador de creatina dependiente de sodio y de cloruro, TMEM19, la proteína hipotética xp 047287, la proteína hipotética FLJ11871, PROSC, el gen MGC27121, NQO1, CKAP4, la proteína hipotética BC001096, PDPK1, el regulador del ensamblaje del huso mitótico 1, MIRAB13, PORCN, SIX6, GJB2, la proteína FLJ35784, SLC37A3, SPRY4, LHX3, C7orf27, SLC39A1, ZNF307, MIF, BST2, PSTPIP1, SOX4, NCOA5, la proteína hipotética FU31438, ODD, SLC23A2, SHFM1, SRPK2, RAMP2, BPGM, RGS5, CXADR, MEIS2, TENS1, SNAI2, CHST2, HCA127, el co-transcrito Thy-1 (LOC94105), LRFN3, la proteína hipotética FU22390, TRIB2, KRTHA3B, KIF21A, ANKRD17, RAG1, NUBP2, la proteína hipotética FLJ20489, CASK, HIP1, PRKCD, TIE, C5orf15, CGI-72, ENTPD8, SH3BGRL3, el homólogo de la subunidad MLRQ de la óxidorreductasa de NADH:ubiquinona, VG5Q, BG1, BCL2L11, ARK5, TLE3, ITIH5, RGS11, TM7SF3, SCR3, PLXNA1, GJA4, la proteína hipotética DKFZp434G1415, WSB2. CDA, GART, ZMPSTE24, TMEM33, GPI, la proteína hipotética FLJ11000, CAMK1D, PTPN21 y TNS.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha etapa de detección se lleva a cabo mediante la detección de la acumulación de ARNm de UBTM o de un marcador de tumor de vejiga urinaria ("UBTM").

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha detección se lleva a cabo mediante el uso de una micromatriz.

50 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha detección se lleva a cabo mediante el uso de una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o de métodos de hibridación.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha etapa de detección se lleva a cabo detectando la acumulación de una proteína UBTM.

55 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha etapa de detección se lleva a cabo detectando la acumulación de un péptido UBTM.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que dicha etapa de detección se lleva a cabo usando un anticuerpo para UBTM.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el método incluye la detección de la acumulación

de dos o más UBTM en dicha muestra.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además la detección de uno o más pares de marcadores seleccionados del grupo que consiste en TOP2A-HOXA13, TOP2A-IGFBP5, TOP2A-SEMA3F y CDC2-HOXA13.

5 12. Un método para la detección de cáncer de vejiga, que comprende:

detectar la acumulación de una combinación de marcadores tumorales de vejiga urinaria (UBTMs) seleccionados del grupo que consiste en CDC2-TOP2a-IGFP5, TOP2a-IGFBP5-CHGA, CDC2-IGFP5-CHGA, CDC2-IGFP5-CHGA, TOP2a-NRP1-IGFBP5, CDC2-NRP1-IGFBP5, TOP2a-SPAG5-IGFBP5, TOP2a-ENG-IGFBP5, CDC2-SPAG5-IGFBP5, CDC2-ENG-IGFBP5, TOP2a-SEM2-IGFBP5, CDC2-SEM2, IGFBP5, HOXA13-TOP2a-IGFBP5, HOXA13-CDC2-IGFBP5, TOP2a-MDK-IGFBP5, y CDC2-MDK-IGFBP5, en una muestra de orina de un paciente sospechoso de tener cáncer de vejiga, dicha acumulación de cada uno de dichos marcadores siendo mayor a 1.2 veces la acumulación de cada uno de dichos marcadores en un grupo de sujetos normales que no tienen cáncer de vejiga maligno.

13. Un método para la detección de la presencia de cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende:

15 determinar, en una muestra de orina, la cantidad de IGFBP5 en combinación con uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en BIRC2, HOXA13, MGP, NOV, NRP1, SEMA3F, SPAG5, TOP2A, y en el que dicho marcador no está sustancialmente presente en la sangre de dicho sujeto.

14. Un método para distinguir una enfermedad de vejiga maligna de una enfermedad de vejiga no maligna, que comprende:

20 determinar en la orina de dicho paciente la acumulación de IGFBP5 en combinación de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en HOXA13, MDK, MGP, NRP1, SEMA3F, SMC4L1, TOP2A y UBE2C; y determinar la relación de expresión de IGFBP5 con respecto dicho uno o más marcadores en dicha muestra, la relación estando asociada a la presencia de cáncer.

25 15. Un método para determinar la eficacia de una terapia para el cáncer de vejiga que comprende detectar la acumulación de la proteína 5 de unión a factor de crecimiento similar a insulina (IGFBP5) en una primera muestra de orina de un paciente, y compararla con la cantidad de dicho IGFBP5 en una segunda muestra de orina de un paciente después de un periodo de tratamiento, siendo la cantidad de dicho marcador después de dicho periodo de tratamiento menor que la cantidad de dicho marcador antes del tratamiento.

30 16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende detectar la cantidad de al menos un marcador adicional elegido de entre el grupo que consiste en GGH, SPP1, NRN1, SPARC, ADAMTS10, CNTN1, TLL2, PDIR, FBN1, el producto del gen KIAA0100, CALR, ITGBL1, ELA3B, SMOG2, HEXA, IGFBP7, MFAP2, CILP, OLFM1, LUM, SEM2, PRSS11, SULF1, SERPINH1, MGP, TIMP1, EGFL6, SPAG11, IGFBP5, SEMA3F, CDC2, TOP2A, UBE2C, STMN1, TUBA4, HIST1H1B, HMGB2, CCNA2, CDCA1, la proteína hipotética MGC5576, DEK, MLF1IP, CDCA8, la proteína hipotética FU20647, TYMS, SMC4L1, LYN, HMGB3, PTGIR, DONSON, HMMR, CLDN6, HIST1H1D, C10orf3, KNTC1, CKS1B, RRM2, HIST1H2BH, STK6, MPHOSPH1, CCNB2, GPR32, ENG, MFHAS1, HIST1H1C, AVPR2, CENPF, HOXA13, el miembro g de la familia de histonas h4, MGC27121 el gen, NP, ASPM, la proteína hipotética FLJ11871, LBH, NUDT1, HELLS, ASB9, MCM5, IMP-2, DKFZP566M1046, TUBA2, GAS2L3, la proteína hipotética FU12442, MCM6, DOK3, WDR18, CKAP2, KIF20A, la posible proteína fap, C6orf32, NEK2, CRY1, TGM2, DLG7, EIF2C2, DEPDC1, HIST2H4, MCM7, MTAP, KNTC2, HSPC150, SMC6L1, HIST1H2BC, ASF1B, ARH, LMNB1, la proteína hipotética FU10719, la proteína hipotética FU10706, MAD2L1, SLC22A2, la proteína hipotética MGC34923, SPAG5, ACVRL1, DSCR1, PRSS15, S100A9, MCM4, ST7L, PLEKHA4, EPHB1, CALD1, SMC1L1, el co-transcrito Thy-1, RAMP, FKBP11, C20orf129, HIST1H4H, CDKN3, MCAM, SNCAIP, NIPSNAP1, AP1M1, ANLN, C6orf69, TORC3, MAZ, TXNRD1, la proteína hipotética xp 096695, C22orf4, VSNL1, similar a la cadena N de 83 kDa de la carboxipeptidasa, KIAA1598, la proteína hipotética FLJ13501, DKFZP4340047, la proteína hipotética FU38716, similar a la proteína hipotética (región L1H3), la proteína hipotética KIAA1875, PRIM1, la proteína hipotética BC001096, MCM2, GJA3, C11orf30, similar a la proteína hipotética FLJ30672, THY1, LRP3, LASS2, C18orf8, ZNF81, NARF, MTHFD2, D6T, SIAT7D, MMPL1, KLK11, KPNA2, FGFR10P2, VIM, la proteína FU44108, PAPOLG, FHOD1, RASL12, HMGN2, PITPNM2, DER1, EPHA4, VSIG1, RGS5, la proteína KIAA1639, SH2B, PGLYRP4, CDC45L, MLSTD1, la proteína hipotética MGC11266, TNFRSF13B, NET1, LHFPL5, MX2, SPHK1, ABCG4, SERPINB2, GALNT10, LEPR, MXD4, FAPP2, NUP210, CSK, NRP1, MGAT1, el producto del gen KIAA0100, LCN7, BMP7, ADAMTS10, PM5, NOMO3, CPA6, NPPC, la proteína hipotética FU23221, ERP70, GALNT14, ITIH3, PAPPA2, LOXL1, TNFRSF6B, SPARC, MSMB, CLDN6, PT- MA, AVPR2, similar al transportador de creatina dependiente de sodio y de cloruro, TMEM19, la proteína hipotética xp 047287, la proteína hipotética FU11871, PROSC, MGC27121 el gen, NQO1, CKAP4, la proteína hipotética BC001096, PDPK1, el regulador del ensamblaje del huso mitótico 1, MIRAB13, PORCN, SIX6, GJB2, la proteína FLJ35784, SLC37A3, SPRY4, LHX3, C7orf27, SLC39A1, ZNF307, MIF, BST2, PSTPIP1, SOX4, NCOA5, la proteína hipotética FLJ31438, ODD, SLC23A2, SHFM1, SRPK2, RAMP2, BPGM, RGS5, CXADR, MEIS2, TENS1, SNAI2, CHST2, HCA127, el co-transcrito Thy-1 (LOC94105), LRFN3, la proteína hipotética FU22390, TRIB2, KRTHA3B,

- 5 KIF21A, ANKRD17, RAG1, NUBP2, la proteína hipotética FU20489, CASK, HIP1, PRKCD- BP, TIE, C5orf15, CGI-72, ENTPD8, SH3BGRL3, el homólogo de la subunidad MLRQ de la óxidorreductasa de NADH:ubiquinona, VG5Q, BG1, BCL2L11, ARK5, TLE3, ITIH5, RGS11, TM7SF3, SCR3, PLXNA1, GJA4, la proteína hipotética DKFZp434G1415, WSB2, CDA, GART, ZMPSTE24, TMEM33, GPI, la proteína hipotética FLJ11000, CAMK1D, PTPN21 y TNS, en una primera muestra de un paciente, y compararla con la cantidad de dicho uno o más marcadores en una segunda muestra de un paciente después de un periodo de tratamiento, siendo la cantidad de dicho marcador después de dicho periodo de tratamiento menor que la cantidad de dicho marcador antes del tratamiento.

<b>Muestra</b>	<b>Serie 1</b>	<b>Serie 2</b>
<b>Pacientes con TCC</b>		
Superficial	7	13
Invasivo	10	4
Carcinoma <i>in situ</i>	2	1
Estadio desconocido	2	2
<b>Controles no malignos</b>		
Vejiga neurógena		6
Hiperplasia prostática		9
Urolitiasis		9
Infección		2
Controles sanos	10	13

Figura 1

Nombre	Alias	Simbolo	Cebador directo	ID SEC #	Cebador inverso	ID SEC #	Sonda	ID SEC #
antígeno asociado al espermia 5	MAP126; DEEPEST1; hMAP126	SPAG5	AATTCAGAGCCCTTCAGGA	1	TCTGCTGAACCAAGCTCTTCTTTG	14	ACCCAAGCTGGTAGGGCTTCATGCCA	27
topoisomerasa (ADN) II alfa de 170 kDa	TOP2; TP2A	TOP2A	CCGCCAGACACTACATTG	2	CCCTATAGTAAATGCCAACATCTTC	15	TTCGTGTGAAATAGGTGACCCAGCAATGTG	28
ciclo de division celular 2, desde G1 hasta S y desde G2 hasta M	CDK1	CDC2	GCCGCCGCGGAATAAT	3	ACCTTCTCCAAATTTTCTCTATTTTG	16	AGCCGGGATCTACCATACCCATTGACTAATCT	29
endodolina (síndrome de Osler-Rendu-Weber 1)	END; ORW; HHT1; ORW1; CD105	ENG	GCAGGTGTCAGCAAGTATGATCA	4	ATGTTGAGGCGAGTGCACCTTT	17	AATGAGGCGGTGGTCAATATCCTGTCTGG	30
proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 5	IBP5	IGFBP5	AAATTGTGACCGCAAGGATTCT	5	CAGCAGATGCCACGCTTTG	18	AAGAGAAAAGCGAGTGCAAAACCTTCCCGT	31
gen de neuroblastoma sobreexpresado	CCN3; NOVH; IGFBP9; NOV	IGFBP9	CGGACCCCGCAACCA	6	CCCCATCGAAACACACAGTTATCT	19	TGGCATCTGCACGGGGGTAGAG	32
neuropilina 1	NRP; VEGF165R	NRP1	GGAGTGTGTGGTGGACGCAAGAC	7	CGTCAGCTTGGGAATAGATGAAG	20	CCCATTCAGGATCACACAGGAGATGGC	33
dominio de sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforma) 3F	SEMA4; SEMAK; SEMA-IV; sema IV	SEMA3F	CCTGTCAATTTACGCTGTCTTTACC	8	GCGAATATCAGCCATGGAGTAGA	21	CTCTGGCTCCGTGTTCGGAGGC	34
dominio similar a EGF, múltiple 6	WSG; MAEG; DKFZP664P2063;	EGFL6	TGCTCTCCTGGGTGGCAG	9	TAGTGACAGACCCTCCAGGCTGA	22	ACGGGGCCAGTGCAGAGGCAT	35
proteína de la matriz Glia	DKFZP664P2063; NTF; MGLAP	MGP	TTCAATCCCTCAGCAGAGATG	10	TTGAGCTCTGGAGACGGCTTA	23	AGAGCTAAAAGTCCAAAGAGAGGATCCGAGAAC	36
semaforina sem2	LOC56920; F000014	SEM2	CTCGAGGTGACG CGCTGT	11	GCCCTTGAACCTCC	24	CACCGTCAAGTCCGTGTTCCAG	37
cromogramina A, (proteína secretora paratiroidea 1)	CGA	CHGA	TACAAGGAGATCCGAAAGGC	12	CAGGCTCCCAAGCTCCATC	25	AGAGTCGGTGGAGGCTCTGGCTG	38
antígeno superficial celular Thy-1	GD90	THY1	TGAACCTGGCCATCAGCAT	13	GGTTAGGCTGTCTCACCTTCTG	26	TGCTAACAGTCTTTGACAG GTCTCCGGAG	39
enzima de conjugación con ubiquitina E2C	UBCH10; dJ447F3.2	UBE2C	Ensayo de expresión del gen Taqman (R) Hs00984100.q1					
hormona caja A13	HOX1; HOX1J	HOXA13	Ensayo de expresión del gen Taqman (R) Hs00426284.m1					
midicina (factor promotor del crecimiento de las neuritas 2)	NEGF 2	MDK	Ensayo de expresión del gen Taqman (R) Hs00171064.m1					
IAP de baculovirus que contiene repeticiones 5 (survivina)	API4; EPR-1	BIRC5	Ensayo de expresión del gen Taqman (R) Hs00153353.m1					
SMC4, de tipo 1 de mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (siCAPC; rCAR-C		SMC4L1	Ensayo de expresión del gen Taqman (R) Hs00909709.q1					

Figura 2



Figura 3  
(cont.)

HUGO	Nombre del gen	oligo # MMG	sec. de ref. del ARNm de NCBI	sec. de ref. de cambio medio de cambio max.	n° de veces de cambio medio de cambio max.	n° de veces de cambio medio de cambio max.	Prueba de la T	Rango sumario Suero, Nuevo?
receptor de prostaglandina 12 (prostacina)		rwghuman30kA_002	NP 00951.1	3.2	31.5	3.6 E-07	4.09 E-08 270.5	
PTGR		rwghuman30kA_009	NP 00951.1	1.8	3.3	2.7 E-08	4.09 E-08 279.5	
vecino secuencia abaj de SON (DONSON)		NM 145795.1	NP 02486.1	2.7	6.8	1.8 E-06	0.00000729 291	
DONSON		NM 012486.1	NP 02486.1	3.2	39.1	7.8 E-07	9.07 E-08 296.5	
receptor de movilidad mediada por hialuronano		NM 021155.3	NP 005302.1	2.1	4.8	4.6 E-08	7.37 E-08 306.5	
CLAUDIN 6		rwghuman30kA_016	NP 06860.2	2.1	4.3	9 E-05	6.07 E-08 308.5	
histona 1, H1.3		rwghuman30kA_053	NP 04706.3	2.2	4.2	2.3 E-07	0.00000266 325	
marco abierto de lectura 3 del cromosoma 10		KNTC1	NP 00187.1	2.7	3.4	1.7 E-04	4.99 E-08 332	
cinotocoro asociado 1		KNTC1B	NP 001026.1	2.6	16.6	1.5 E-06	0.00000869 344	
subunidad reguladora 1B de la cinasa de proteínas CDC20		RRM2	NP 003515.1	3.1	15.3	1.1 E-06	0.00000194 349	
polipeptido de la redutasa de nitronucleotido M2		HIST1F2BH	NP 040838.1	2.6	26.9	1.7 E-06	7.37 E-08 349.5	
histona 1, H2bh		rwghuman30kA_046	NP 040838.1	1.9	5.3	4.6 E-07	0.00000243 425	
cinasa de serina /teorina 6		STP6	NP 057279.2	1.9	3.8	3.3 E-07	0.0000137 369.5	
fosfoproteína 1 de fase M		MFHOSPH1	NP 044692.1	2.0	3.4	6.2 E-07	7.37 E-08 373.5	
celulina E2		CCNB2	NP 001497.1	3.4	42.0	1.3 E-06	0.00000666 390	
receptor acoplado a proteínas G 32		GPR32	NP 000109.1	1.9	5.3	4.6 E-07	0.00000243 425	
ENG		rwghuman30kA_056	NP 000109.1	1.9	5.3	4.6 E-07	0.00000243 425	
endoglina		rwghuman30kA_046	NP 044226.1	2.4	11.0	2.2 E-07	0.00000243 425	
secuencia 1 amplificada del histiocitoma fibroso maligno MFHAS1		MFHAS1	NP 005193	2.3	22.3	8.8 E-07	6.07 E-08 427.5	
histona 1, H1c		HIST1H1C	NP 055101.1	2.3	10.0	3.7 E-07	0.00000375 425	
receptor de vasopresina arginina 2		AVPR2	NP 0000542	1.7	2.6	2.6 E-07	1.17564 E-06 435.5	
proteína del centrómero F		CENPF	NP 057427.3	1.7	3.5	2.6 E-07	0.00000619 439.5	
homocéjaja A13		HOXA13	NP 000513.2	3.0	13.2	2.8 E-06	0.0000179 463	
familia de histonas H4, miembro g		rwghuman30kA_013	NM 030144	3.0	46.3	1.9 E-06	5.18452 E-06 481.5	
gen MGC27121		rwghuman30kA_398	NP 001001343.1	3.6	46.3	1.9 E-06	5.18452 E-06 481.5	
fosfolipasa de nucleótidos		NP	NP 000261.1	1.9	4.2	2.7 E-07	0.00000375 497	
de tipo zap (tipo anormal), asociado a microcefalia		ASPM	NP 06866.2	2.4	14.5	7.6 E-07	0.0000187 504.5	
proteína hipodélica fil11971		LBH	NM 025117	1.7	13.2	2 E-06	0.000001 511	
probablemente ortólogo de las yemas de las extremidades y el corazón de ratón		NUDT1	NP 112177.1	2.0	4.7	2.6 E-07	0.00000223 528	
motivo de tipo nucl. (fracción X, unida a difosfato de nucleótido) 1		HELLS	NP 193954.1	1.9	3.7	5.1 E-06	0.00000444 546.5	
helicasa, específica intride		ASB9	NP 060453.2	1.8	4.3	5.9 E-07	3.74676 E-07 550	
caja que contiene repetición de arquino y SOCS 9		MCM5	NP 076902.1	1.7	5.9	1.3 E-06	0.0000016 566	
deficiente en el micromosoma de mantenimiento MCM5		IMP-2	NP 008730.2	1.7	3.3	7.6 E-06	1.55489 E-07 567.5	
proteína hipodélica LUP-25881046		LUBAX	NP 056453.3	2.1	4.9	4 E-06	1.17464 E-05 575	
tubulina alfa 2		GASL3L3	NP 115603.1	1.8	3.9	2.7 E-06	1.37383 E-06 594.5	
especifico para detener el crecimiento 2 de tipo 3		MCM6	NP 524575.1	1.8	5.6	6.7 E-07	0.00000171 602	
deficiente en el micromosoma de mantenimiento MCM6		DOK3	NP 777602.1	2.0	2.9	7.8 E-07	2.91943 E-06 604	
dominio de repetición VID 18		WDR18	NP 075059.1	1.7	2.9	1.5 E-06	3.63 E-08 614	
proteína asociada al citosqueleto 2		CKAP2	NP 009806.2	2.2	5.7	5.4 E-07	0.00000232 653.5	
miembro de la familia de cinasas 20A		KIF20A	NP 079148.1	2.2	12.6	1.8 E-06	4.99 E-08 655	
supuesta proteína fap		32	NP 077005.2	2.0	8.7	9.9 E-07	4.99 E-08 677	
32, maco abierto de lectura 32 del cromosoma 6		32	NP 068674.2	1.8	4.3	3.1 E-06	1.93636 E-05 701.5	
cinasa relacionada con NIMA (gen a nurca en la mitosis) 2		NEH2	NP 005724.1	1.9	2.8	1 E-06	1.07393 E-07 707.5	
cripocromo 1 (de tipo foliosa)		CRY1	NP 056949.2	2.1	18.9	8 E-06	0.0000049 718	
transglutaminasa 2		TGM2	NP 002468.1	1.8	3.5	1.5 E-07	1.29514 E-07 721.5	
discos, homólogo mayor 7		DISC7	NP 004068.1	2.0	3.0	6 E-06	0.000001 744	
factor de iniciación de la transcripción eucariota 2C		EIF2C2	NP 004068.2	2.0	6.3	1.6 E-06	3.37794 E-06 747	
dominio que contiene EEP-1		DEPDC1	NP 005302.2	2.0	3.9	1.7 E-06	1.14403 E-06 748	
			NP 050249.2	2.0	4.6	1.7 E-06	3.15546 E-07 776	





Figura 3  
(cont.)

Nombre del gen	HIGO	sec. de ref. del ARNm de NCBI	nº de veces de cambio más. de la proteína	nº de veces de cambio más. de la proteína	Prueba de la TP	Prueba de Milicoxon	Rango sumario	Suero	n.º Nuevo?
proteína DkFZP434004F	DkFZP434004F	NP_056409.1	1,8	4,5	9,6 E-06	4,13751 E-06	1290,5	nuevo	
proteína hipodérmica FU38716		NM_015594.1	1,9	4,0	9,5 E-06	2,87228 E-06	1291,5	nuevo	
similar a la proteína hipodérmica (región L1H3)		NM_152367.1	1,9	4,0	9,5 E-06	2,87228 E-06	1291,5	nuevo	
proteína hipodérmica KIAA1875		XM_372038.1	3,5	3,5	4 E-06	1,78272 E-06	1296,5	nuevo	
primasa polipéptido 1	PRIMI	XM_291269.3	1,8	2,4	2,7 E-06	1,33978 E-06	1313,5	nuevo	
proteína hipodérmica BCO01096		NM_000846.2	1,6	2,9	3,3 E-06	5,24719 E-06	1315	nuevo	
deficiente en el muticromosoma de mantenimiento 2, MCM2	MCM2	NM_138389.1	1,7	3,3	3,6 E-06	0,0000367	1318,5	nuevo	
proteína de unión comunicante, alfa 3	GUAG	NM_004526.2	1,6	2,7	1,8 E-06	0,0000045	1332	nuevo	
marco abierto de lectura 30 del cromosoma 11	C11orf90	NM_021954.2	1,6	2,7	1 E-06	0,00000252	1332,5	nuevo	
similar a la proteína hipodérmica FU3067.2		NM_020193.2	1,4	3,4	6,6 E-07	1,00418 E-06	1339	nuevo	
co-receptor de Thy-1 (LOC34105)	THY1	XM_376318.1	1,6	2,3	3 E-06	2,53728 E-06	1349	nuevo	
funcionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 3	LRP3	NM_035209.2	1,5	3,4	1,3 E-06	2,53728 E-06	1353	nuevo	
homólogo 2 de garantía de longitud LAG1	LASS2	NM_002333.1	1,5	2,1	1,1 E-06	1,9727 E-06	1358	nuevo	
marco abierto de lectura 8 del cromosoma 18	C18orf6	NM_013384.3	1,7	4,6	1,7 E-06	0,0000224	1365	nuevo	
proteína con dedo de cinc 81	ZNF81	NM_013326.2	1,5	2,1	6,1 E-06	0,00000894	1366,5	nuevo	
factor de reconocimiento de la prelamina A nuclear deshidrogenasa de metilén tetrahidrofolato (dependiente de NADH)	NARF	NM_007137.1	1,5	2,2	2,6 E-06	1,8667 E-06	1367,5	nuevo	
transcritasa de dihidrofolato de cadena ramificada	MTHFD2	NM_031968.1	1,5	2,5	8,8 E-06	1,73627 E-06	1391,5	nuevo	
sialiltransferasa 7D	SIAT7D	NM_006536.2	2,4	8,4	6,6 E-06	0,00013	1392,5	nuevo	
de tipo metaloproteasa de la maliz 1	MMP11	NM_001918.1	1,6	2,3	4 E-06	8,99315 E-06	1396,5	nuevo	
calciceína 11	KLK11	NM_175940.1	1,7	7,9	3,2 E-06	0,00000596	1400	nuevo	
carotenoína alfa 2	KRN2	NM_004142.1	1,5	3,4	1,4 E-06	2,91943 E-06	1403	nuevo	
oncogen compatible 2 de FGFR1	FGFR1P2	NM_148497.1	1,5	2,3	1,6 E-06	0,0000153	1415,5	nuevo	
vimentina	VIM	NM_002566.1	1,6	3,3	9,8 E-06	5,89923 E-06	1426,5	nuevo	
proteína FU41108		NM_015633.1	1,5	5,0	1,3 E-06	1,33978 E-06	1427,5	nuevo	
polimerasa gamma de pol(A)	PAPOLG	NM_003980.1	3,3	19,1	0,00012	0,00022	1451	nuevo	
que contiene un dominio de homología 2 con la formamina 1	FH001	XM_379627.1	1,7	2,9	3,7 E-06	2,53728 E-06	1474	nuevo	
familia 12 de tipo RAS, RASL12	RASL12	NM_02894.2	2,7	36,2	7,6 E-06	0,0000932	1474,5	nuevo	
proteína de transferencia de fosfatidilmetil, asociada a la membrana 2	PITPNM2	NM_013241.1	1,6	4,0	9,5 E-06	0,00000187	1483,5	nuevo	
derlina-1	DER1	NM_016663.2	1,4	2,1	1,2 E-06	2,23862 E-06	1490,5	nuevo	
ErbA4	ERBA4	NM_005617.2	1,6	2,7	8,3 E-06	0,0000367	1495,5	nuevo	
que contiene el dominio del conjunto en Y de inmunoglobulina 1	YSG1	NM_020846	2,3	26,2	7,1 E-06	0,0000224	1497	nuevo	
que contiene el dominio de la señalización por proteínas G 5	PGS5	NM_024965.3	1,5	3,3	4,9 E-06	5,24719 E-06	1527	nuevo	
carotenoína (OAA1639)	KRN2	NM_004498.3	1,5	3,1	1,1 E-06	0,0000743	1527,5	nuevo	
homólogo de SH2-B	SH2B	NM_192607.3	2,0	6,8	7,8 E-06	3,20768 E-06	1532,5	nuevo	
proteína de reconocimiento de peptidogucanos 4	FGU/RPA	NM_003617.2	1,9	6,9	4 E-06	0,0000174	1534,5	nuevo	
CDC45 de tipo ciclo de división celular 45	CDC45L	XM_290923.2	1,8	11,5	2,7 E-06	1,9727 E-06	1540,5	nuevo	
dominio que contiene la esterilidad masculina 1	MLSTDI	NM_015503.1	2,2	13,2	2,5 E-06	0,0000187	1566,5	nuevo	
proteína hipodérmica MSC11266		NM_020393.1	1,5	3,2	3 E-06	4,50136 E-06	1566	nuevo	
superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral 36	TNFRSF13B	NM_003904.3	1,8	2,9	6,3 E-06	0,000129895	1567,5	nuevo	
senescencia celular nuclear (SCN)	NET1	NM_010099.3	1,9	10,0	6,3 E-06	3,66791 E-06	1595,5	nuevo	
compañero de fusión de lipema HMLC1C de tipo 5	LHFP15	NM_024222.1	1,5	3,4	5,2 E-06	6,65002 E-06	1608	nuevo	
cinasa de estrogénos 1	SHK1	NM_014262.2	1,7	3,8	7,8 E-06	6,65002 E-06	1643	nuevo	
caseína de unión al ATP, subfamilia G (WHITE), miembro 4	ABCG4	SS2401.1	1,4	2,1	6,7 E-06	4,50136 E-06	1657	nuevo	
inhibidor de la proteasa de serina (o cisteína), subtipo B (ovalbumina), miembro 2	SERPINB2	NM_182482	1,7	9,5	5,4 E-06	4,66206 E-06	1661	nuevo	
LDP-N-sect1-alfa-D-galactosamina - polipéptido N	GALNT10	NM_002464.1	1,6	9,3	7,4 E-06	0,000001	1680	nuevo	
receptor de leptina	LEPR	NM_182865.1	1,5	2,2	2,3 E-06	5,18452 E-06	1702	nuevo	
		NM_022169.3	1,7	8,3	1,2 E-06	0,0000039	1702	nuevo	
		NM_002575.1	1,8	9,3	3,1 E-06	2,50475 E-06	1705,5	nuevo	
		NM_017540.3	1,6	7,1	6,4 E-06	2,23862 E-06	1711	nuevo	
		NM_001003880.1	1,6	2,8	2,2 E-06	7,87228 E-06	1715,5	nuevo	

Nombre del gen	HUGO	oligo # MWG	sec. de ref. del ARNm de NCBI	sec. de ref. de la proteína de NCBI	n° de veces de cambio medio	n° de veces de cambio máx.	Prueba de la T	Prueba de Wilcoxon	Rango sumado	Suero	Nuevo?
proteína de dimerización de MAX 4	MXD4	invighuman30k#A: 082 96	NM 006454.2	NP 006445.1	1,7	4,1	1,1 E-05	0,000134	1719,5		
proteína-2 adaptadora al 4-fosfato de fosforosilil/FAPP2		invighuman30k#A: 069 04	NM 032639.2	NP 116028.1	1,5	3,3	1,6 E-05	3,66781 E-05	1725,5		nuevo
nucleoporfina 210		NUP210	invighuman30k#B: 741	NP 079199.2	1,6	2,8	6,5 E-05	0,000104262	1725,5		nuevo
cinasa de tirosina c-src	CSK	invighuman30k#A: 016 29	NM 004383.1	NP 004374.1	1,5	5,1	7,3 E-06	8,56146 E-07	3601		
neuroplina 1	NRP1	invighuman30k#A: 030 91	NM 003873.2	NP 003864.2	2,3	17,2	0,00276	0,004726344	6356		

Figura 3 (cont.)





Nombre del gen	HUGO	oligo # MWIG	sec. de ref. del ARNm de NCBI	sec. de ref. de la proteína	n° de veces cambio medio	n° de veces cambio máx.	Prueba de la T. de Wicoxon	Rango de valores	Prueba de la T. de Wicoxon	Rango de valores	Prueba de la T. de Wicoxon	Rango de valores
proteína hipotética D1FZ4343G14.15		mwghuman300#C: 3525	NM_031282.2	NP_112382.2	1,4	2,2	6,3 E-05	0,001156	150,1	nuevo		
caja que contiene repetición de WD y SOCS 2A		mwghuman300#B: 1353	NM_016639.3	NP_081109.1	1,4	2,5	6,5 E-05	0,000453	150,2			
pesaminasa de citosina		mwghuman300#A: 01493	NM_001765.1	NP_001776.1	1,9	3,0	4,8 E-05	0,000271	1536,5			
formiltransferasa de fosforibosilglicinamida		GART	mwghuman300#A: 10142	NM_000819.3	1,4	2,2	4,3 E-05	0,000746	156,0			
histona 1, H1b		HIST1H1B	mwghuman300#A: 05718	NM_005313.1	1,5	4,0	9,3 E-05	0,000236	1578,5			
metaloendopeptidasa de citr (homólogo STE24, levadura)		ZMPSTE24	mwghuman300#A: 09569	NM_005845.2	1,5	3,9	0,00017	0,000236	1653,5	nuevo		
proteína transmembranal 33		TMEW33	mwghuman300#A: 01542	NM_018126.1	2,9	31,9	0,00037	0,002513	1689,5	nuevo		
isomerasa de fosfato de glucosa		GPI	mwghuman300#B: 1465	NM_000175.2	1,4	2,6	0,00019	0,000236	1670,5	nuevo		
proteína hipotética FU11000		mwghuman300#B: 4538	NM_018295.1	NP_060765	1,6	5,1	0,0002	0,000448	1687,5	nuevo		
proteína hipotética MG-C5576		mwghuman300#A: 06786	NM_024056.2	NP_076961.1	1,6	11,7	0,00074	0,000312	1710	nuevo		
cinasa de proteínas dependiente de calcio / calmodulina		CAMK1D	mwghuman300#A: 00527	NM_020397.1	1,4	2,6	0,00034	0,000423	1719	nuevo		
fosfatasa de proteína tirosina, no receptor de tipo 21		PTPN21	mwghuman300#A: 09263	NM_007039.2	1,4	2,4	0,000571	0,000258	1733,5	nuevo		
factor de inicio de la traducción eucariota 2C		EIF2C2	mwghuman300#C: 2287	NM_012154.2	1,4	2,5	0,00011	0,000243	1730	nuevo		
dominio de repetición de WD 18		WDR18	mwghuman300#B: 3546	NM_024100.2	1,4	3,2	5,1 E-05	0,000562	1748,5	nuevo		
tensina		TNS	mwghuman300#B: 8493	NM_022648.2	1,3	2,0	3,9 E-05	0,000177	1753,5	nuevo		
cinasa de tirosina c-src		CSK	mwghuman300#A: 01629	NM_004383.1	1,4	1,9	1,1 E-05	0,000107	1935,5			
enzima de conjugación conubiquitina E2C		UBE2C	mwghuman300#A: 01775	NM_181803.1	2,1	8,9	0,00115	0,003908	2155			
neuropilina 1		NRP1	mwghuman300#A: 0309	NM_003873.2	1,9	6,0	0,00328	0,003636	2541			

Figura 4 (cont.)

Nombre	Alias	Símbolo	INVASIVO			SUPERFICIAL		
			Mediana T:N del nº de veces de cambio	Máx T:N del nº de veces de cambio	% de T > 95º percentil del Normal	Mediana T:N del nº de veces de cambio	Máx T:N del nº de veces de cambio	% de T > 95º percentil del Normal
antígeno asociado al esperma 5	MAPI 26; DEEPEST; hMAP 126	SPAG5	40	516	93	8	60	83
topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa	TOP2, TP2A	TOP2A	128	1136	93	39	417	88
ciclo de división celular 2, desde G1 hasta S y desde G2 hasta M	CDK1	CDC2	121	2526	93	27	152	88
endoglina (síndrome de Osler-Rendu-Weber 1)	END, ORW; HHT1; ORW1; CD105	ENG	4	32	57	8	35	84
proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 5	IBP5	IGFBP5				7	164	60
gen del nefroblastoma sobreexpresado	CCN3; NOVH; IGFBP9	NOV				4	16	65
neuropilina 1	NRP, VEGF165R	NRP1	7	195	89	10	37	80
dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3F	SEMA4; SEMAK; SEMA-IV; sema IV	SEMA3F				2	6	68
dominio de tipo EGF, múltiple 6	W80; MAEG; DKFZP564P2063; DKFZb564P2063	EGFL6	4	37	55	4	59	67
proteína de la matriz Gla	NTI; MGLAP	MGP	3	1303	59			
semaforina sem2	LOC58920; FLJ00014	SEM2	6	54	72	9	38	75
chromogranina A (proteína secretora paratiroidea 1)	CGA	CHGA	0	4096	48	5	>10.000	36
enzima de conjugación con ubiquitina E2C	UBCH10; dJ447F3.2	UBE2C	44	219	47	11	619	14
Hemo caja A1 3	HOX1; HOX1J	HOXA13	4	58	46	11	117	67
midicina (factor promotor del crecimiento de las neuritas 2)	NEGF2	MDK	2	56	59	2	8	68
antígeno de la superficie celular Thy-1	CD90	THY1	48	481	89	21	79	86

Figura 5

Nombre	Alias	Símbolo	INVASIVO			SUPERFICIAL		
			Mediana T:N del nº de veces de cambio	Máx T:N del nº de veces de cambio	% de T > 95º percentil del Normal	Mediana T:N del nº de veces de cambio	Máx T:N del nº de veces de cambio	% de T > 95º percentil del Normal
IAP de baculovirus que contiene repeticiones 5 (survivina)	API4; EPR-1	BIRC5	28	140	12	9	293	14
SMC4 de tipo 1 de mantenimiento estructural de los cromosomas 4 (levadura)	CAPC; hCAP-C	SMC4L1	6	24	59	3	16	43

Figura 5 (cont.)



Figura 6a

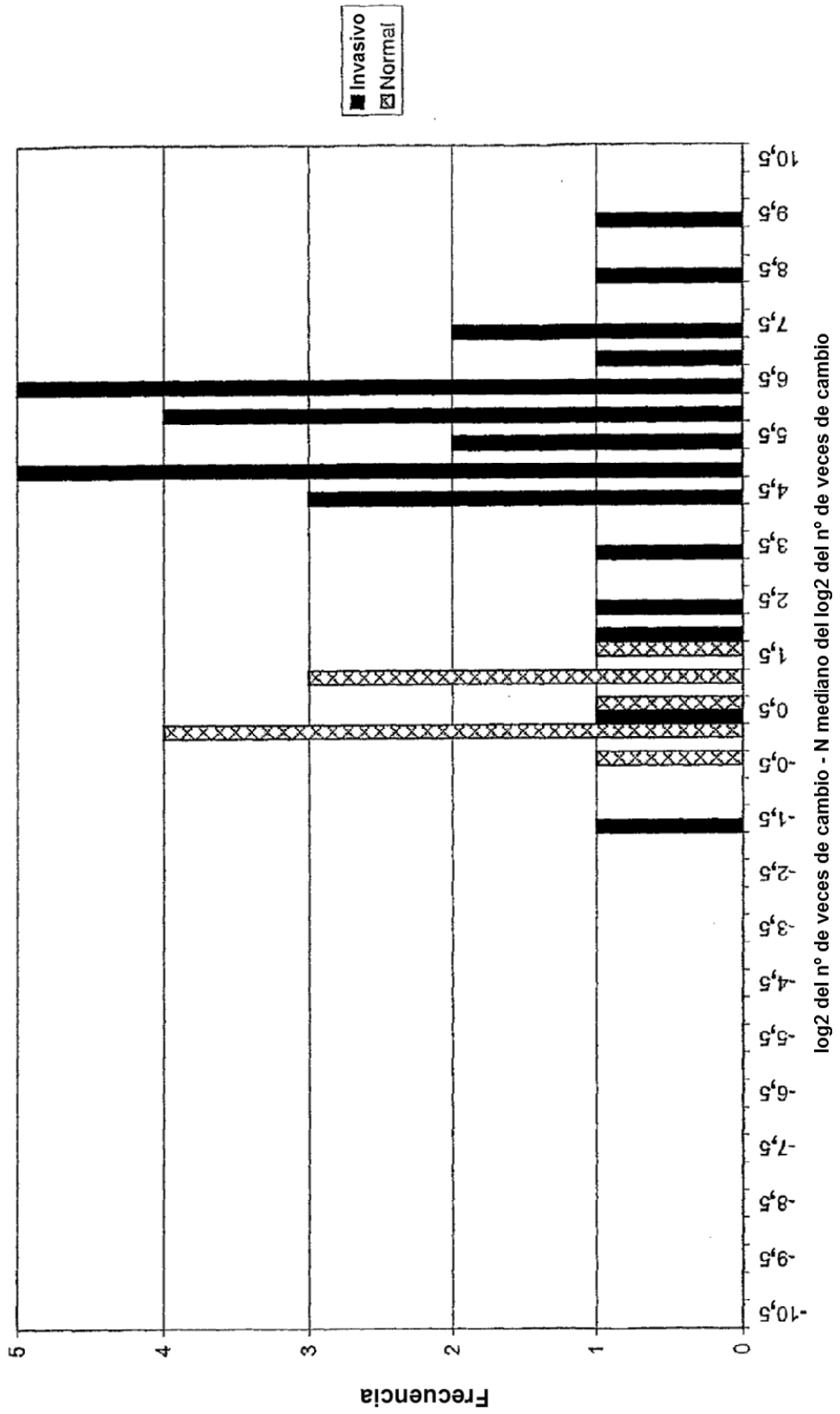


Figura 6b

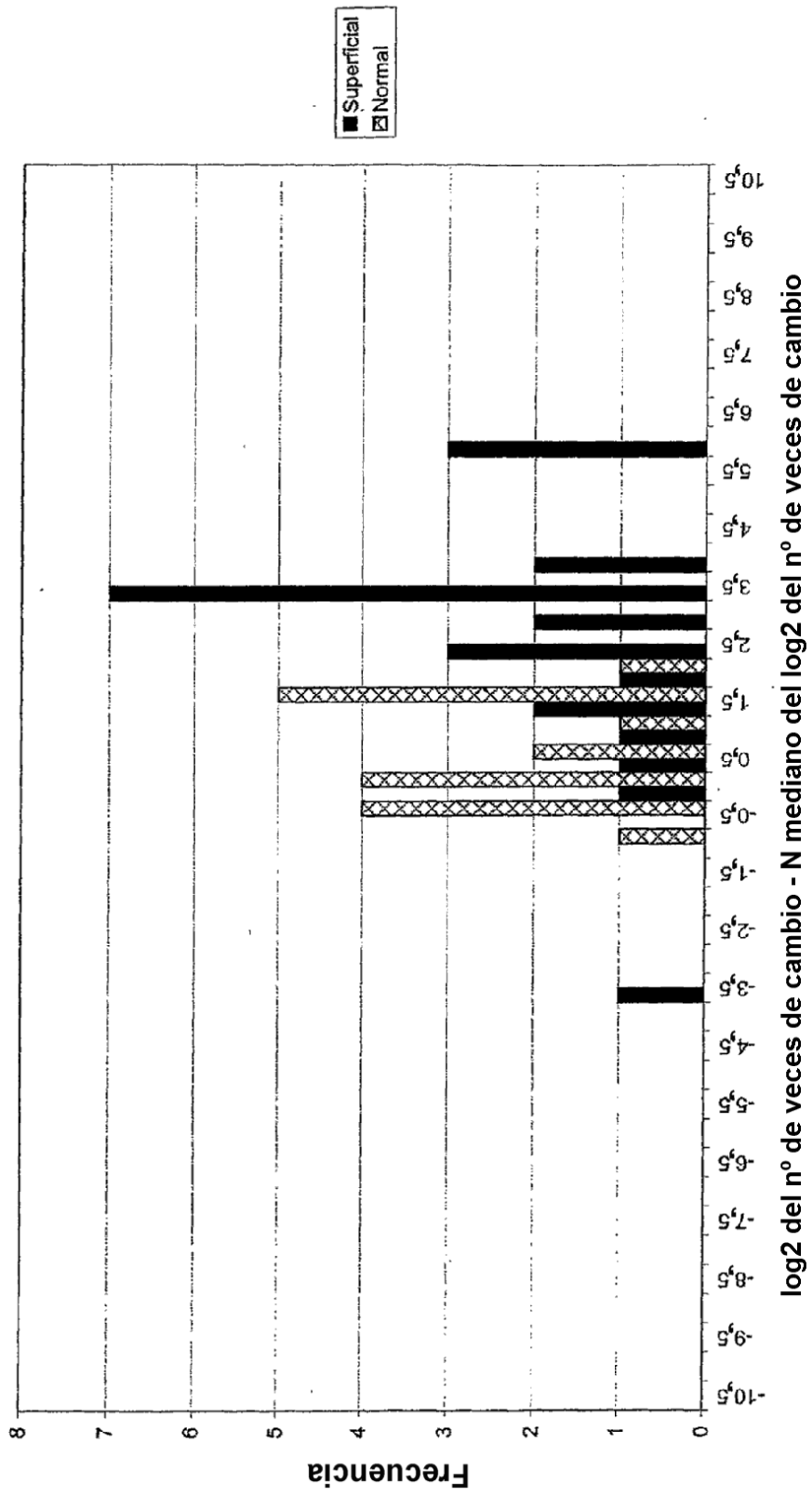


Figura 6c

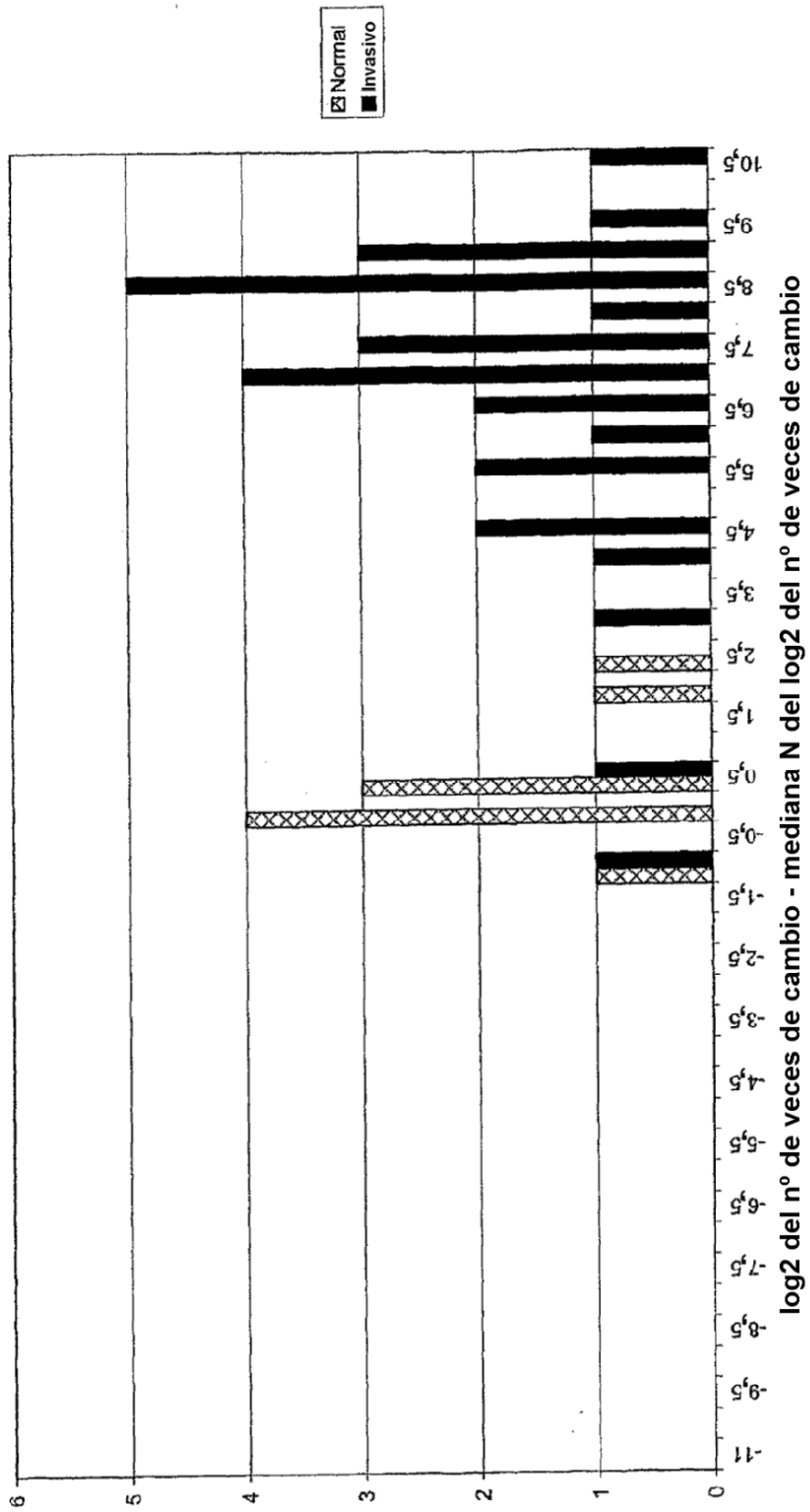


Figura 6d

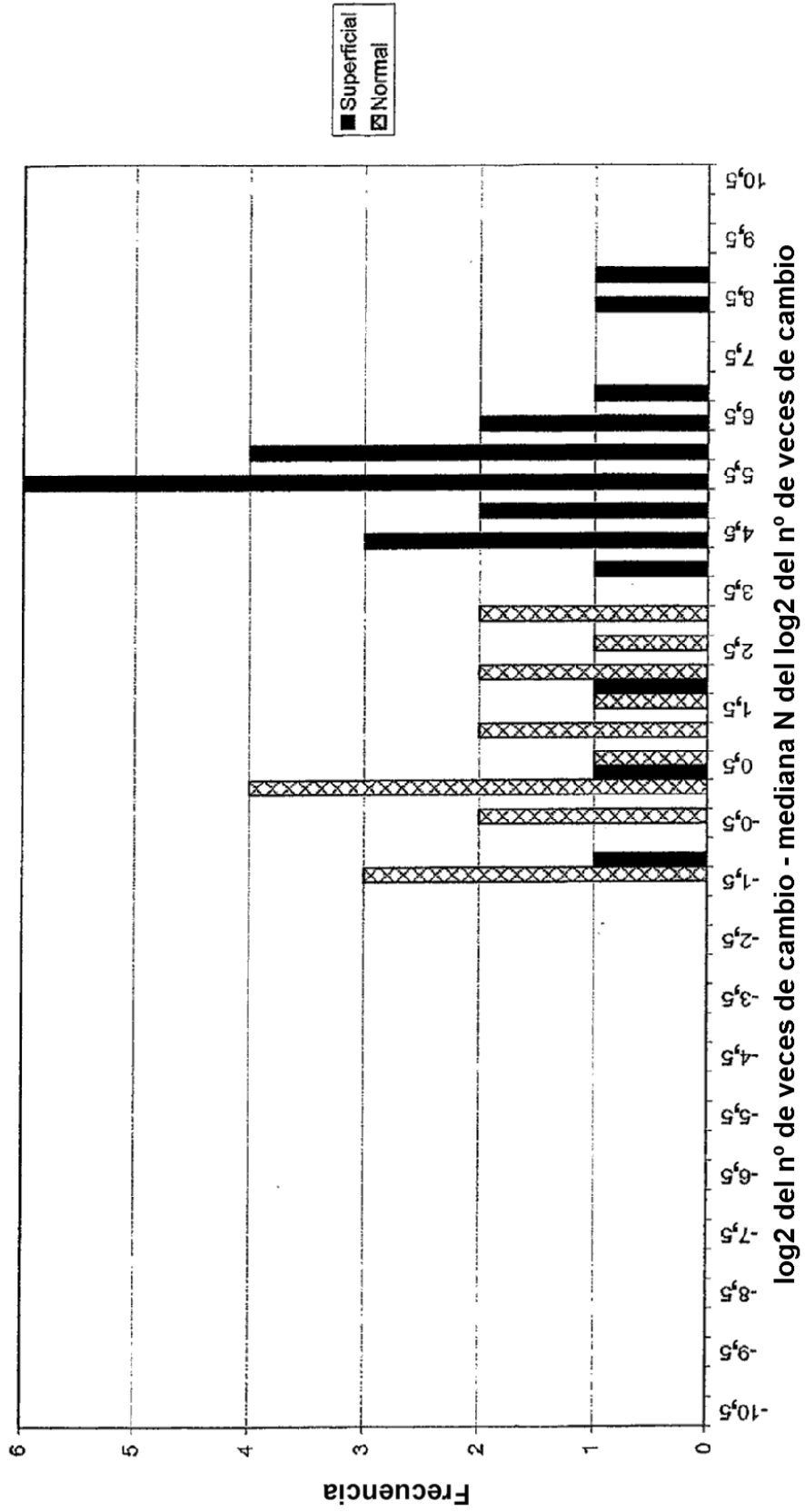


Figura 6c

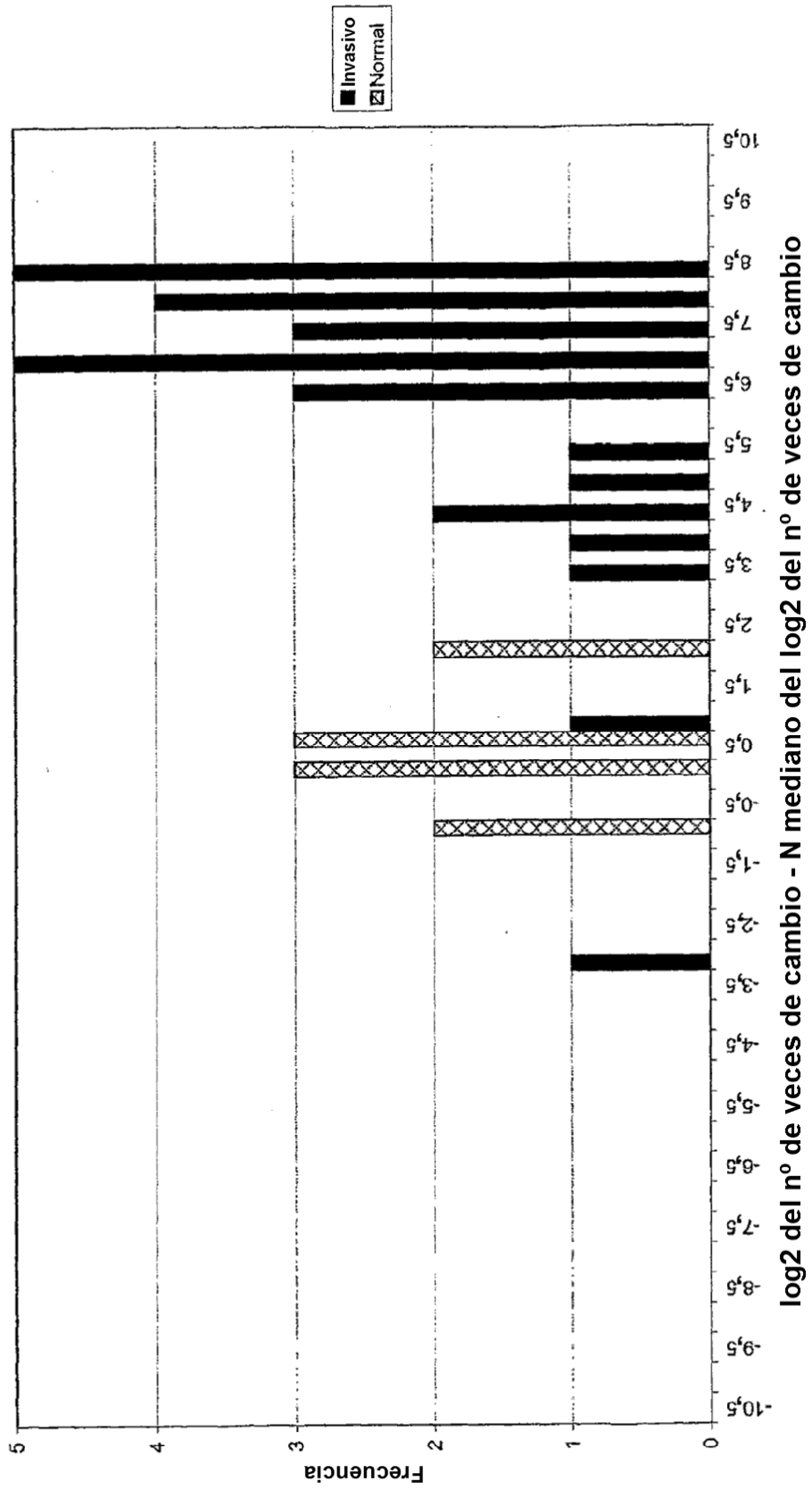


Figura 6f

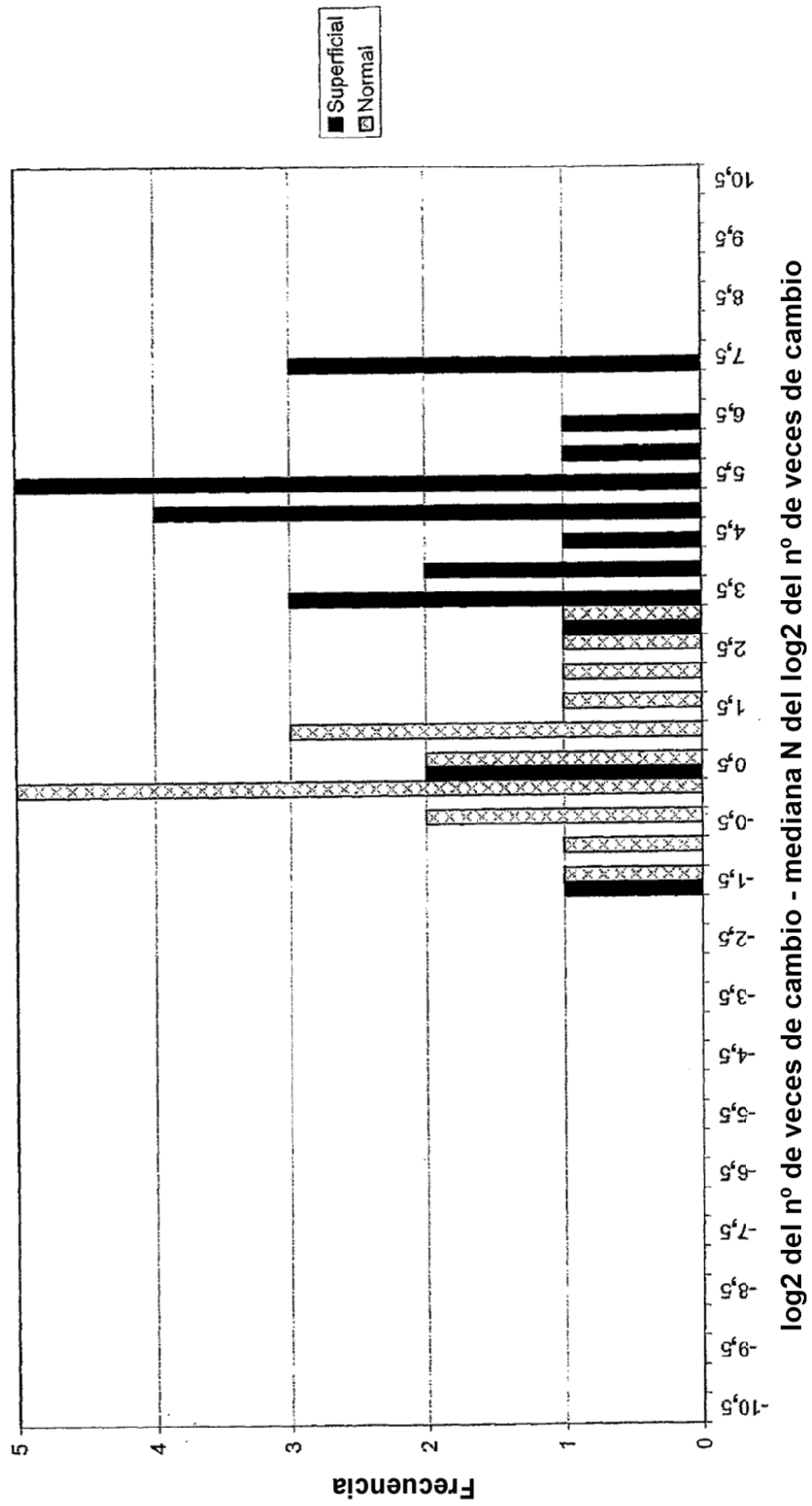


Figura 6g

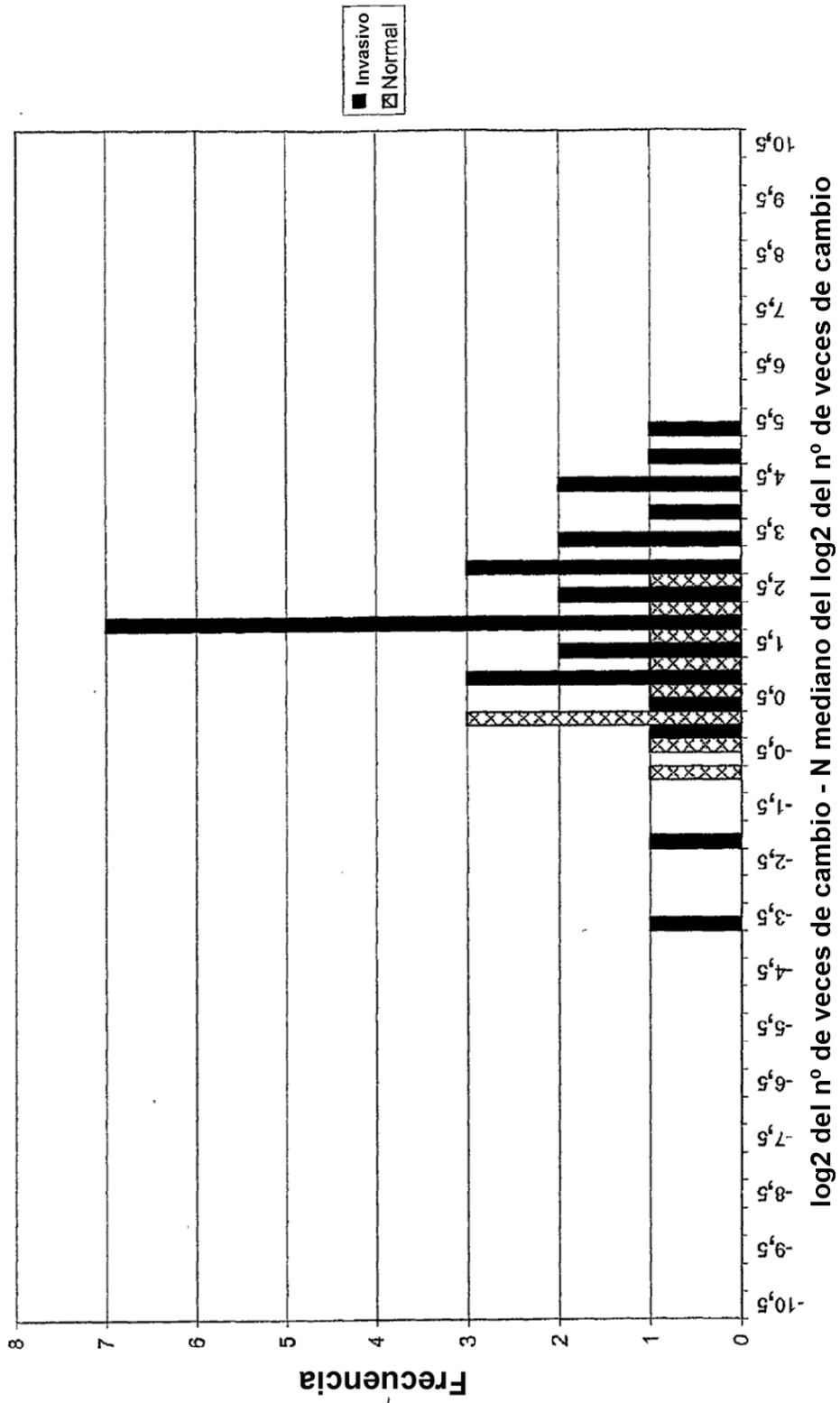


Figura 6h

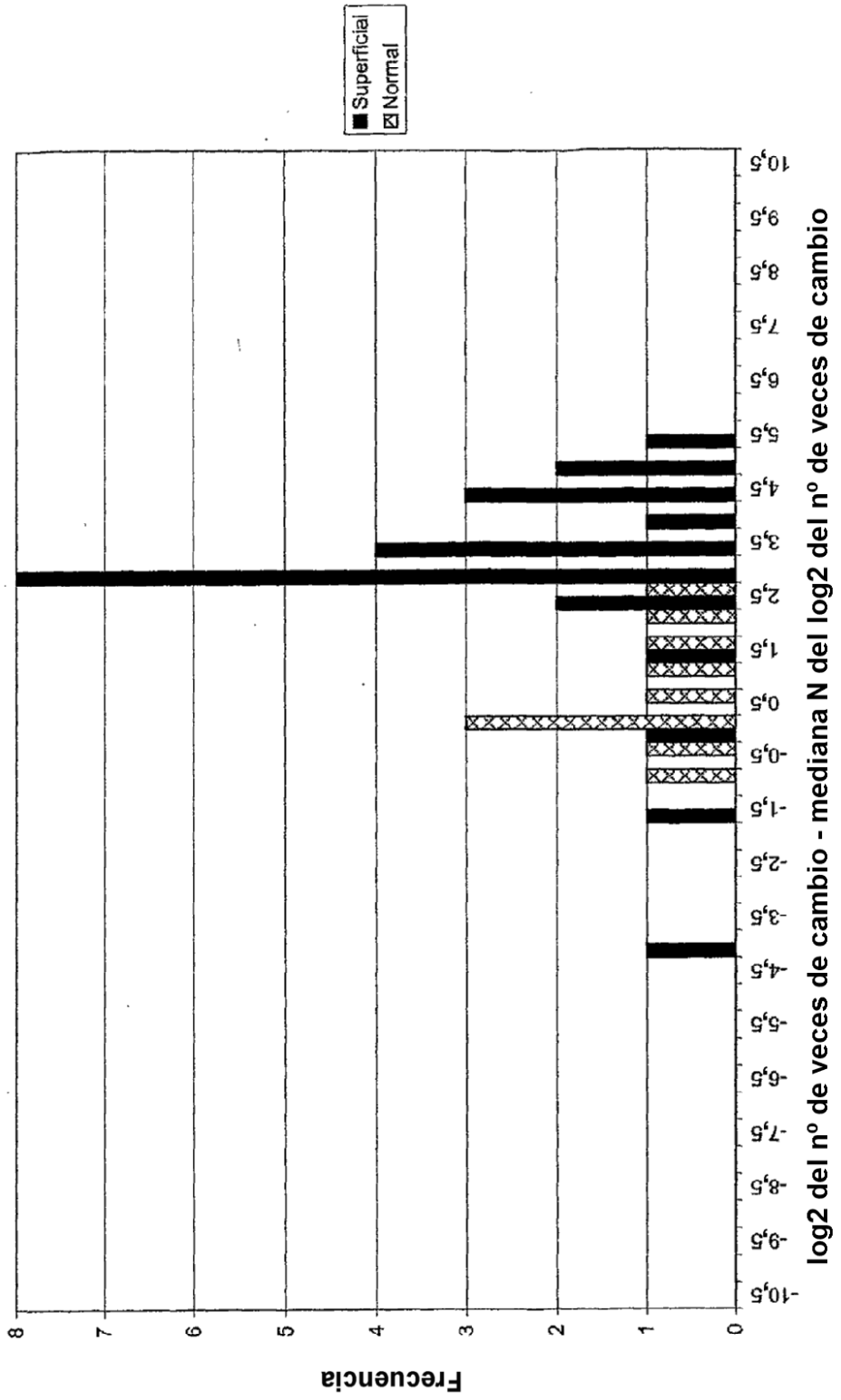




Figura 6i

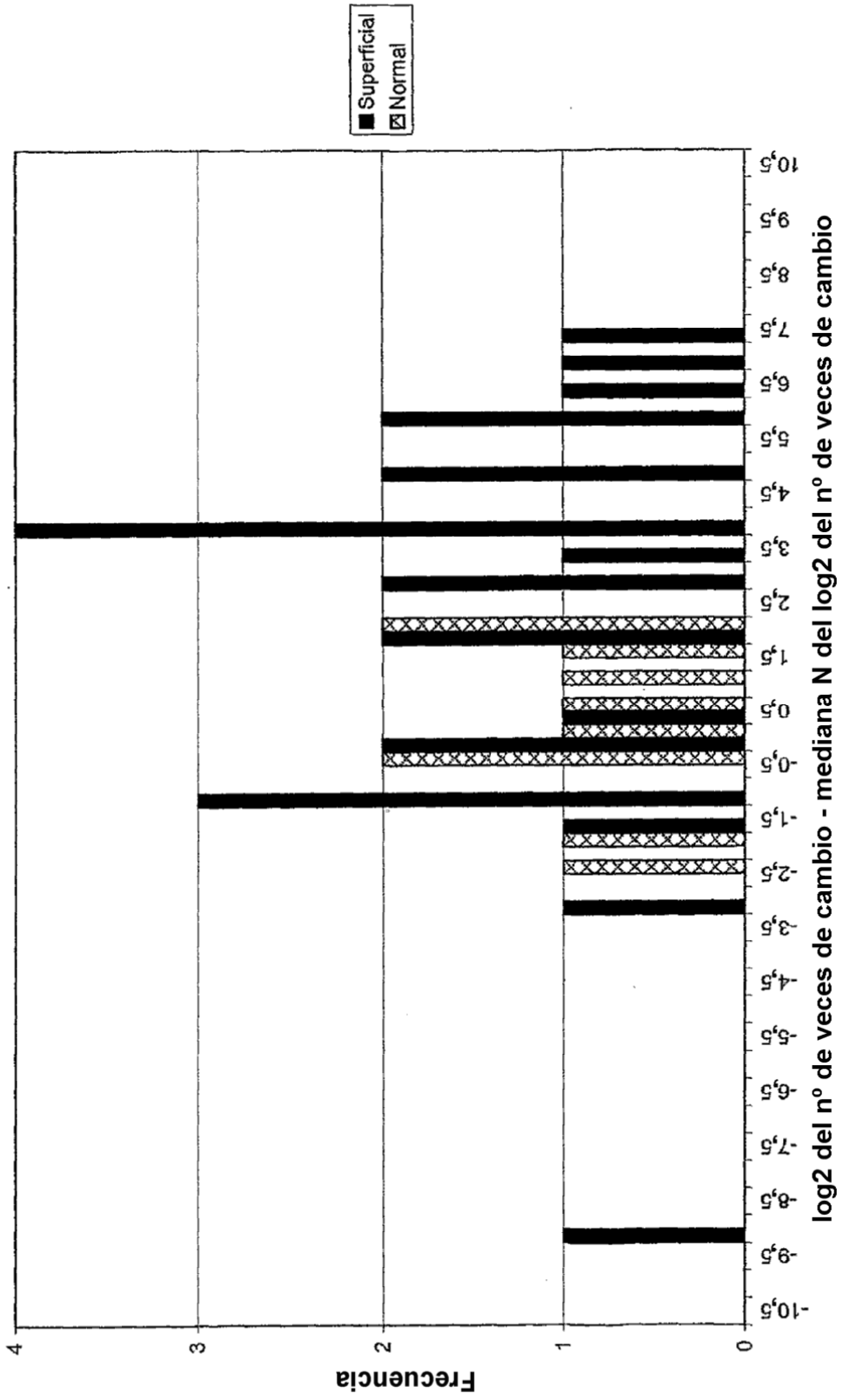


Figura 6j

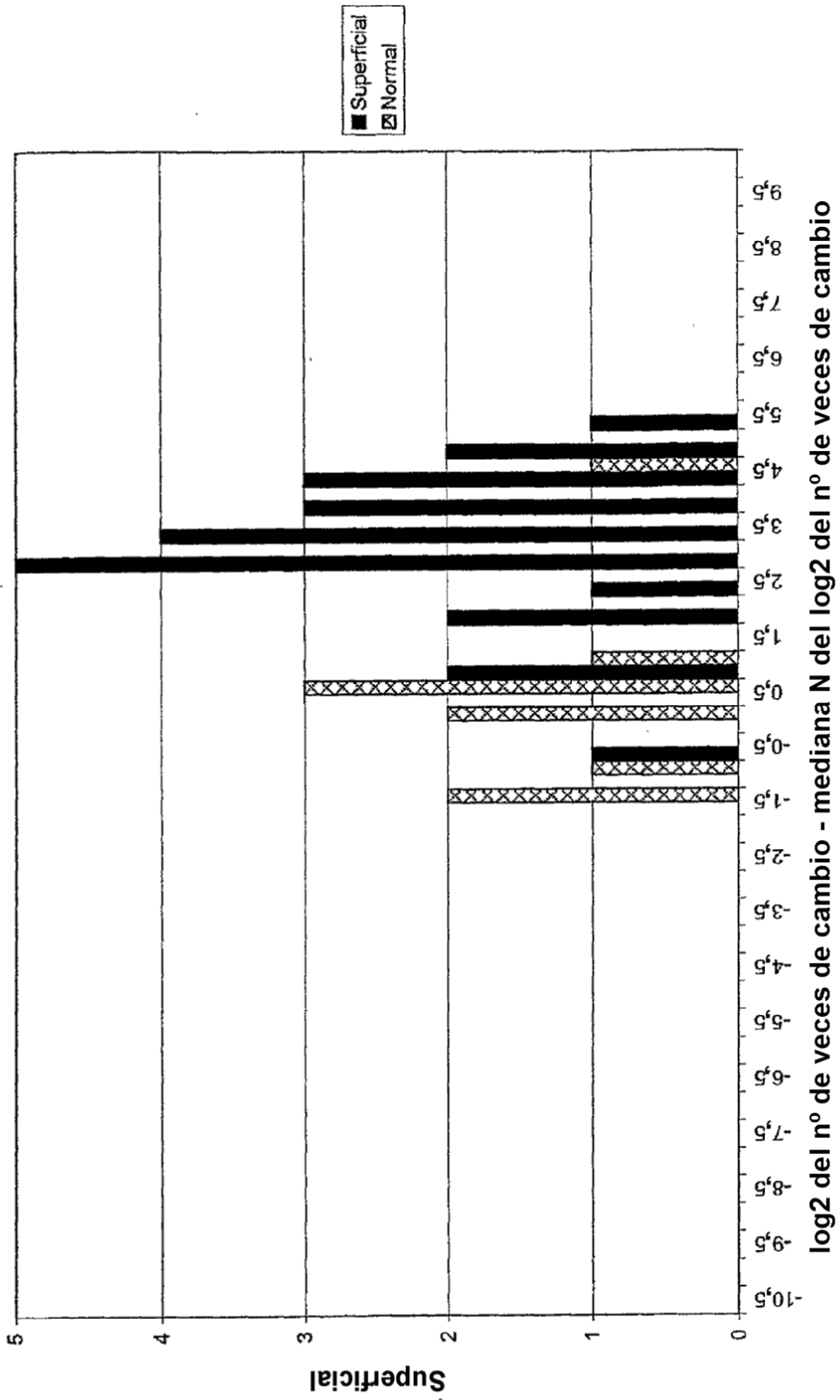


Figura 6k

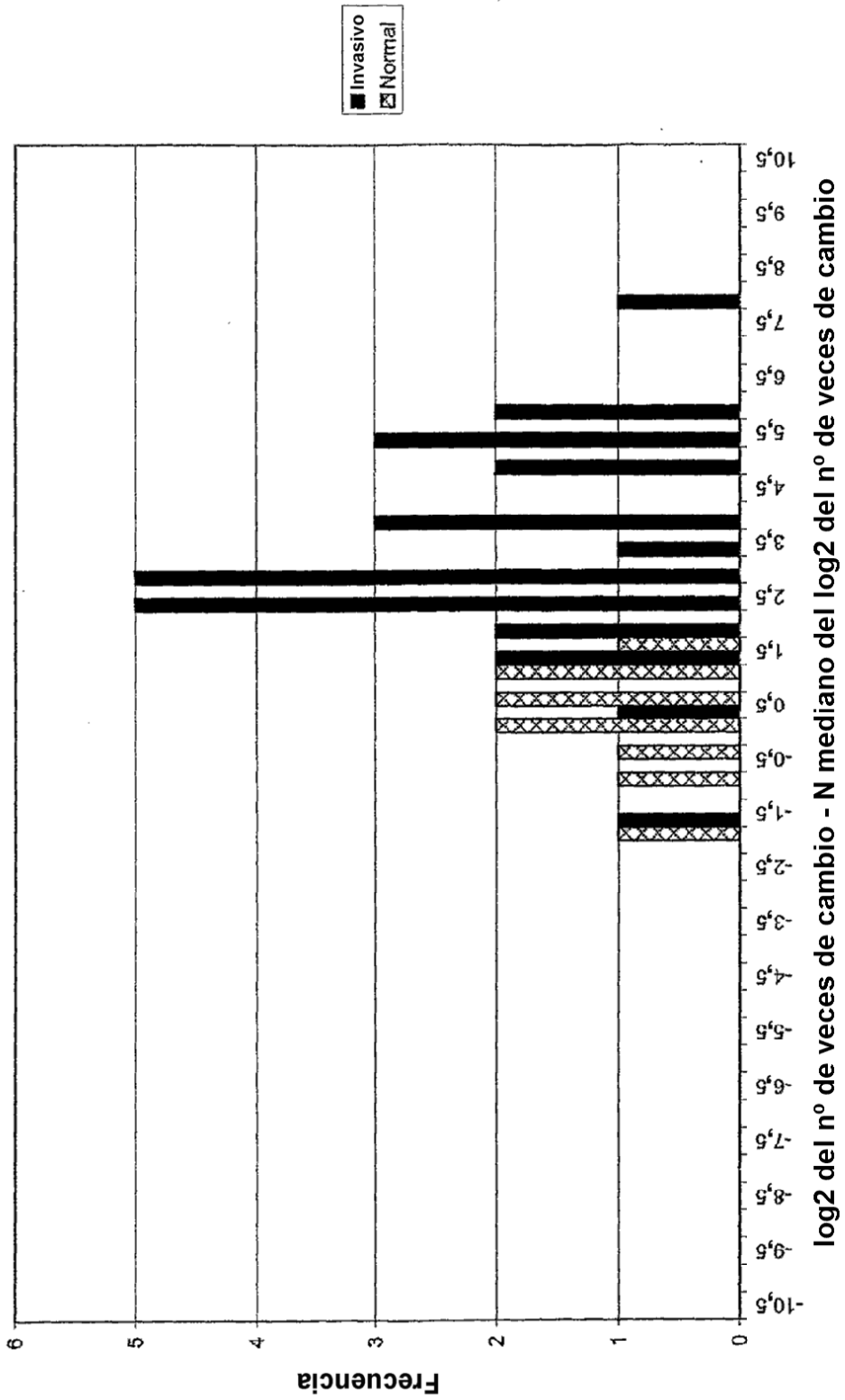


Figura 61

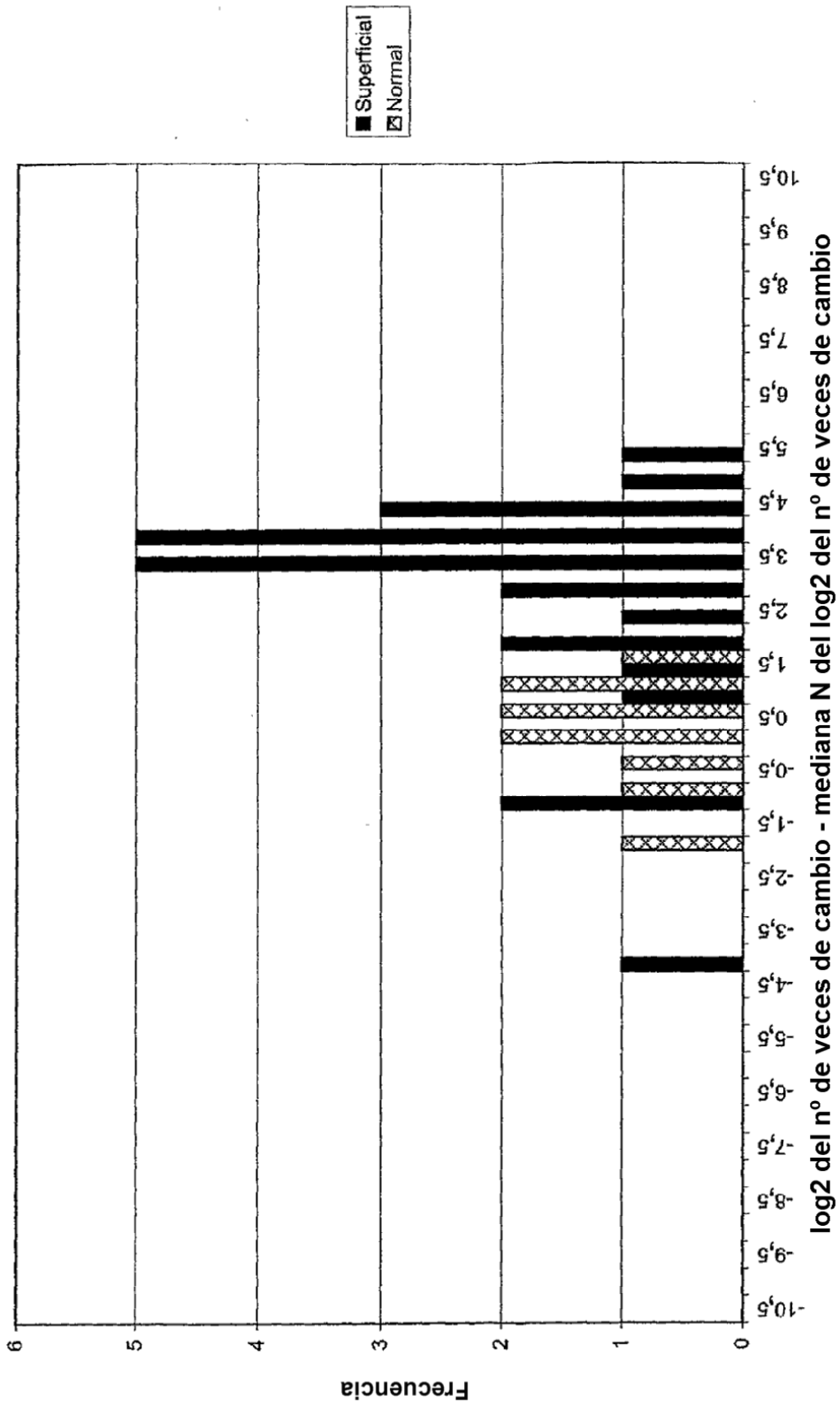


Figura 6m

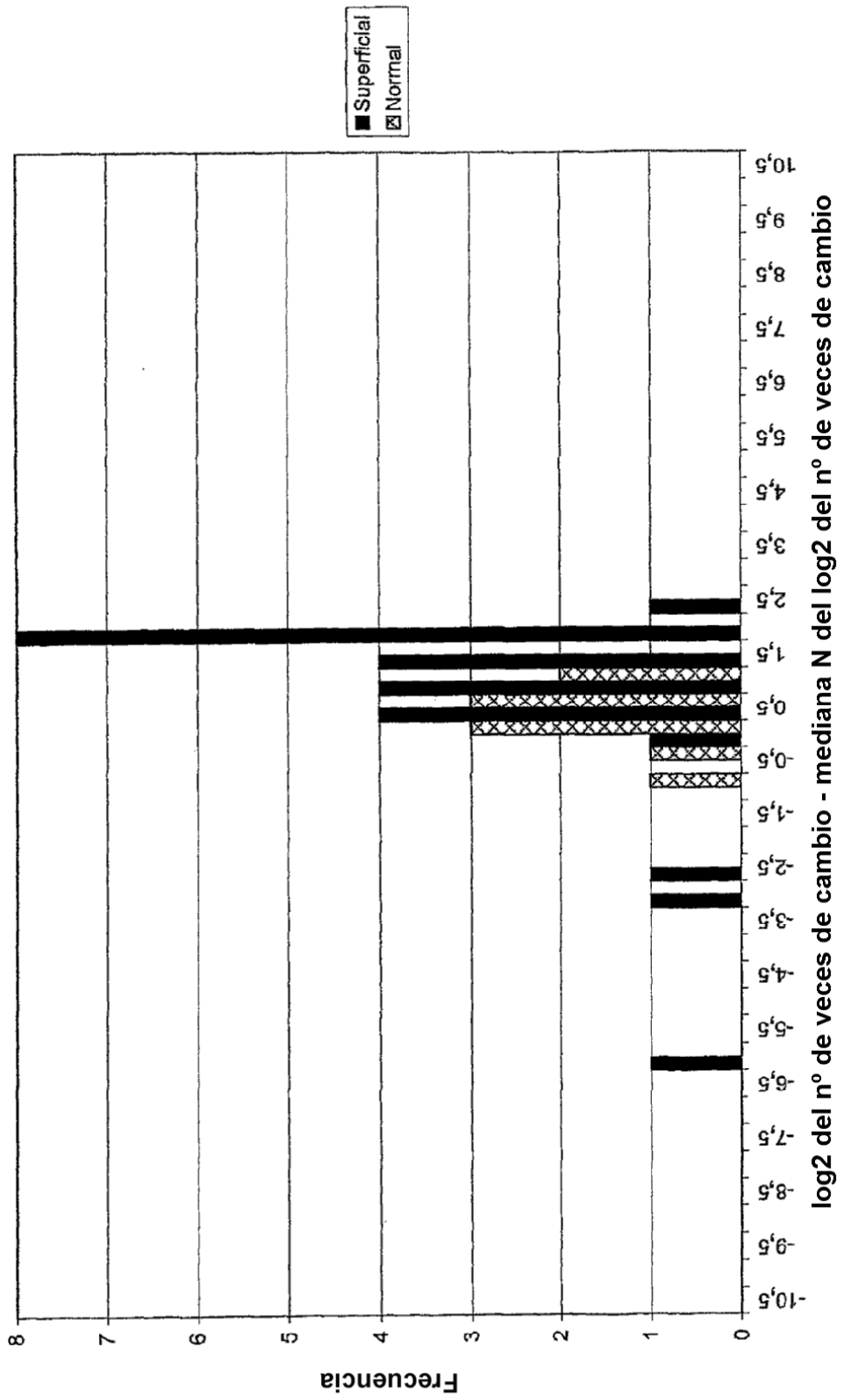


Figura 6n

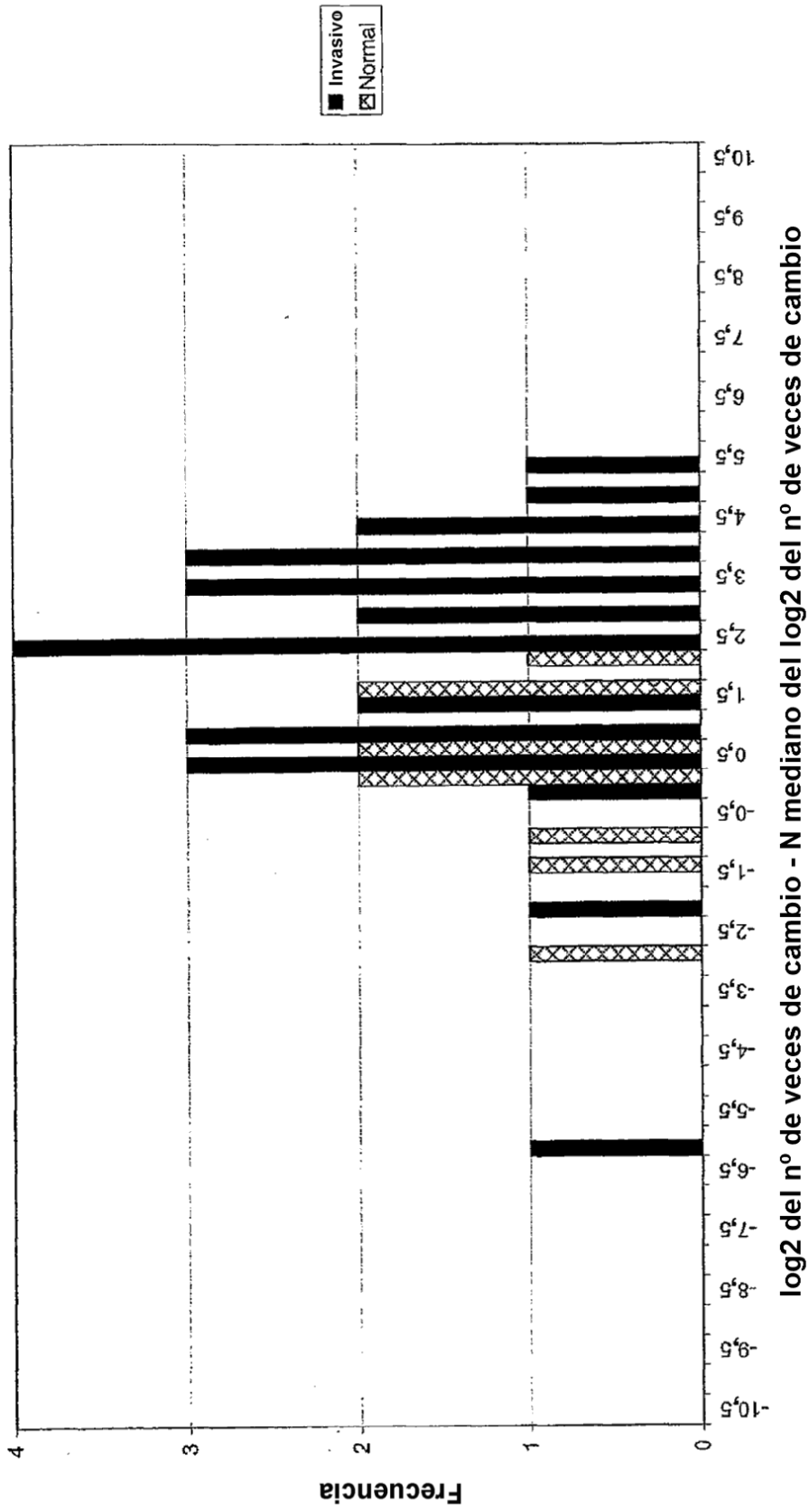
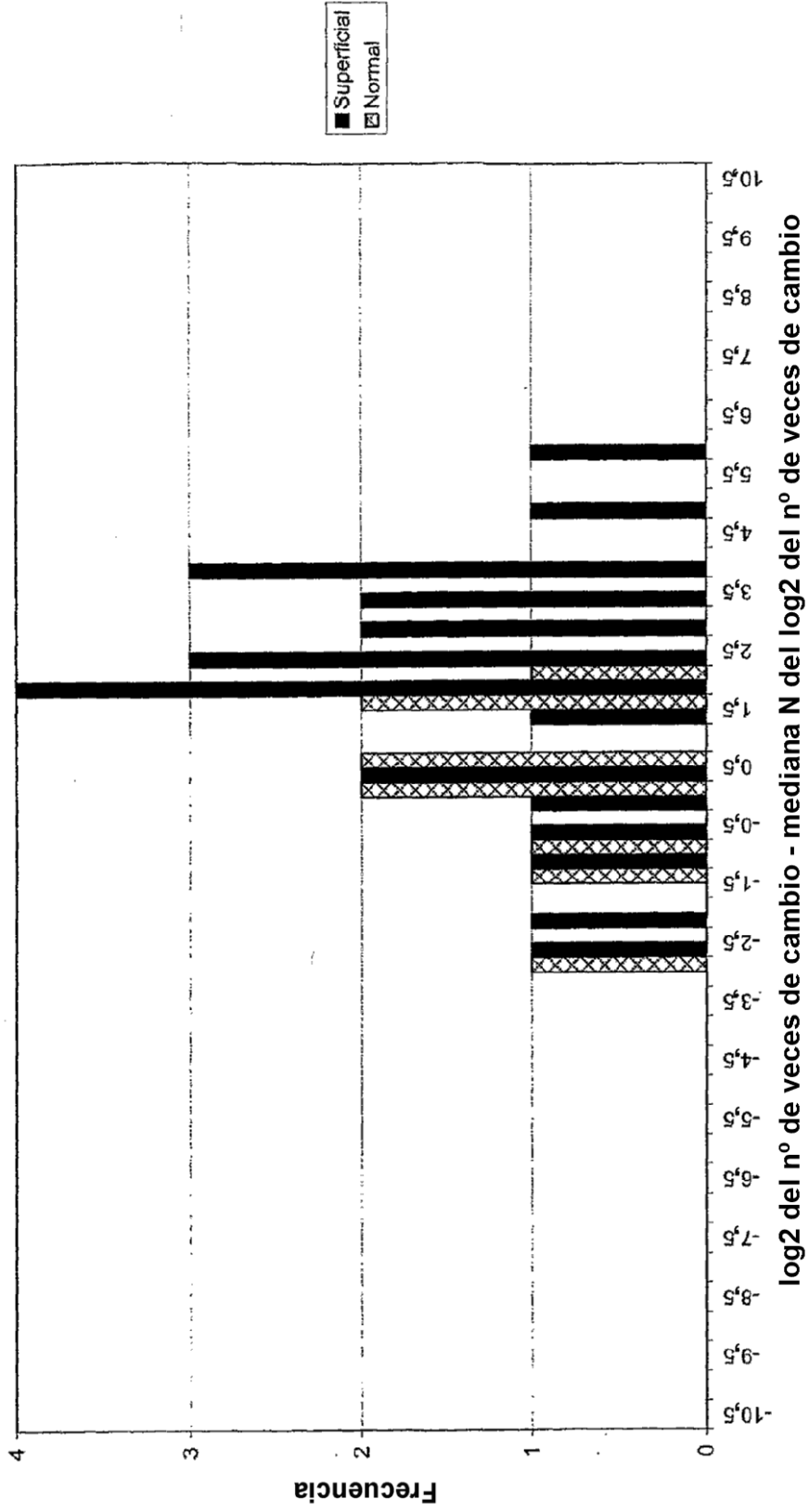


Figura 60



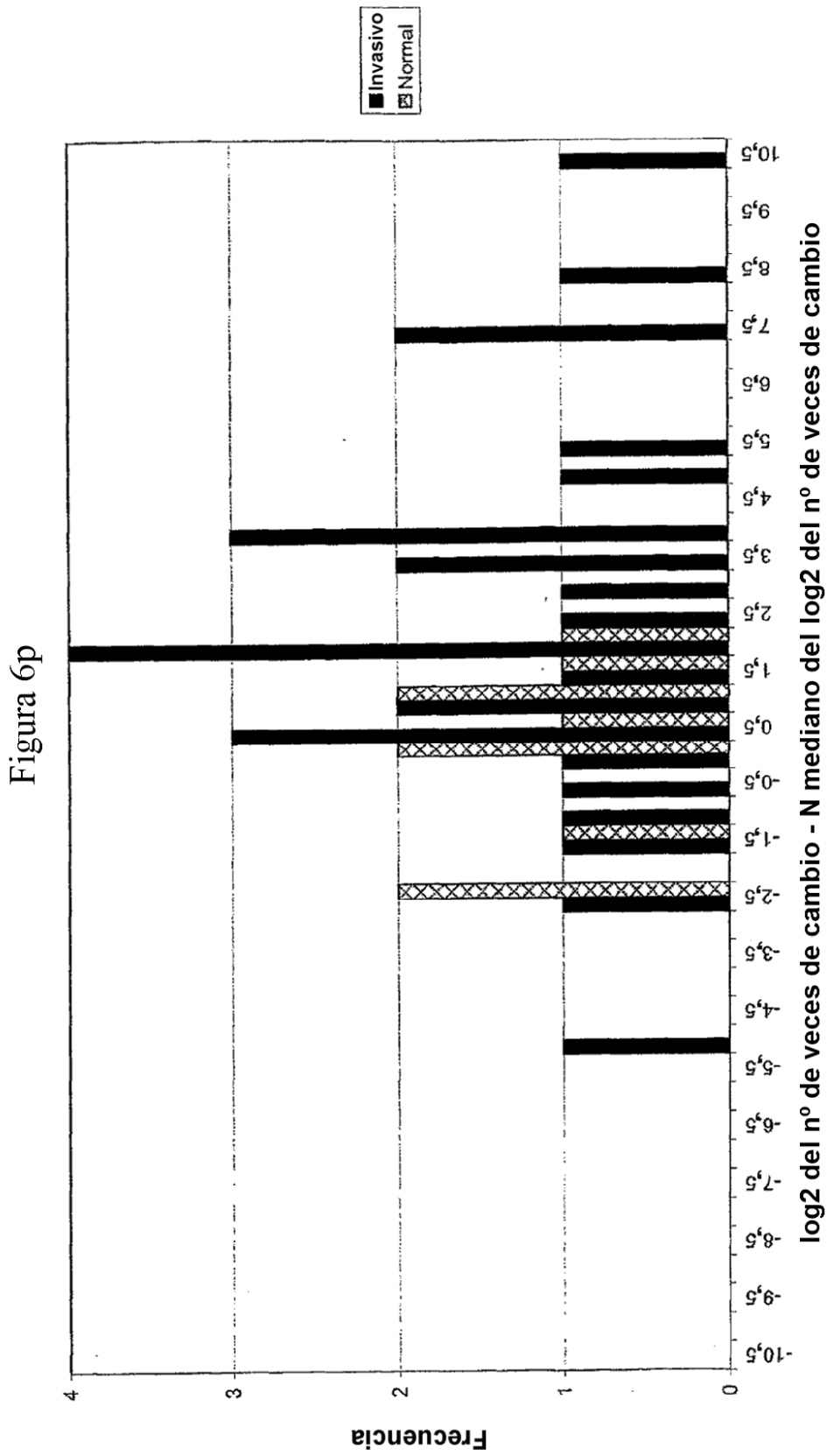




Figura 6q

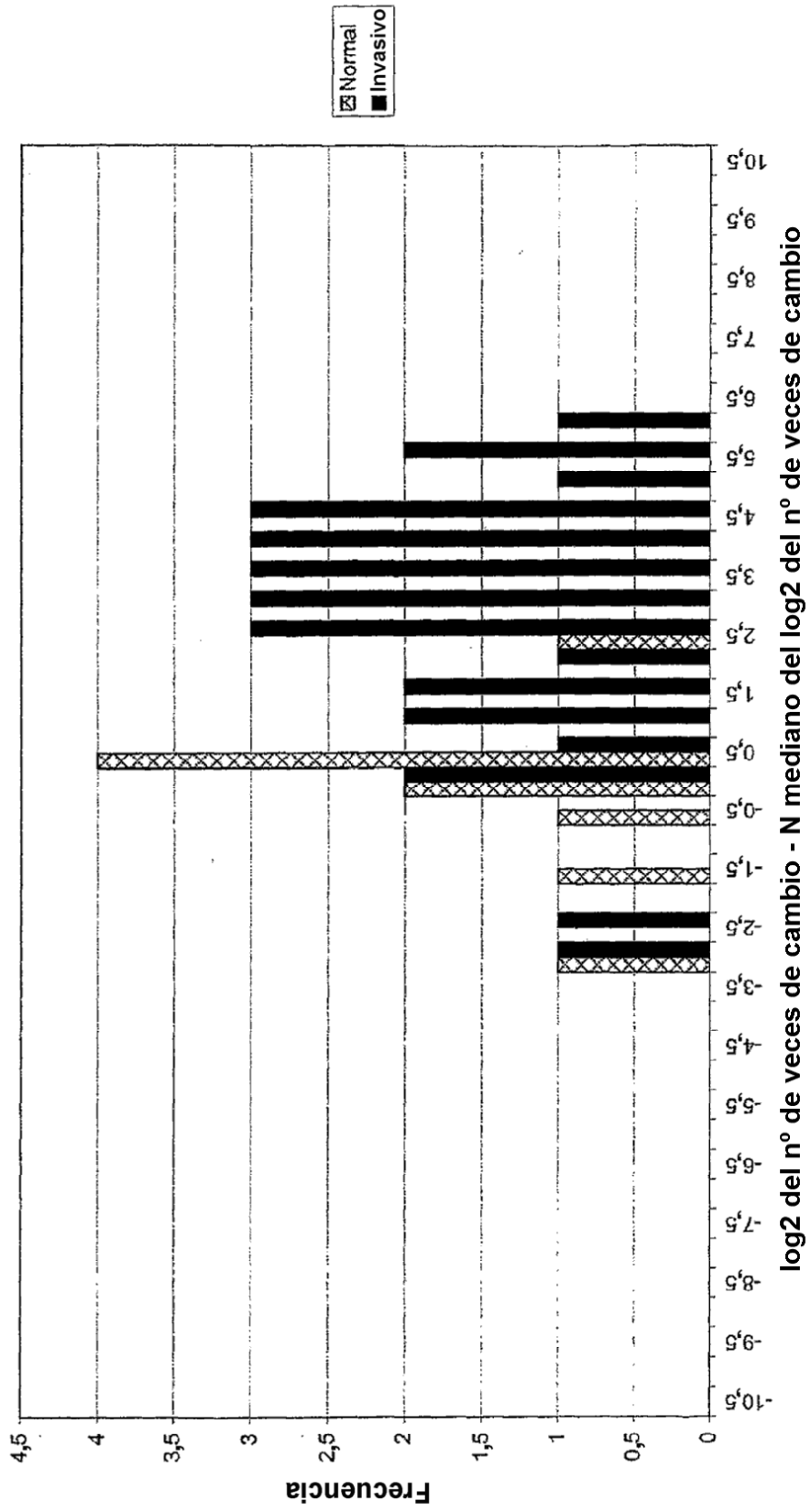


Figura 6r

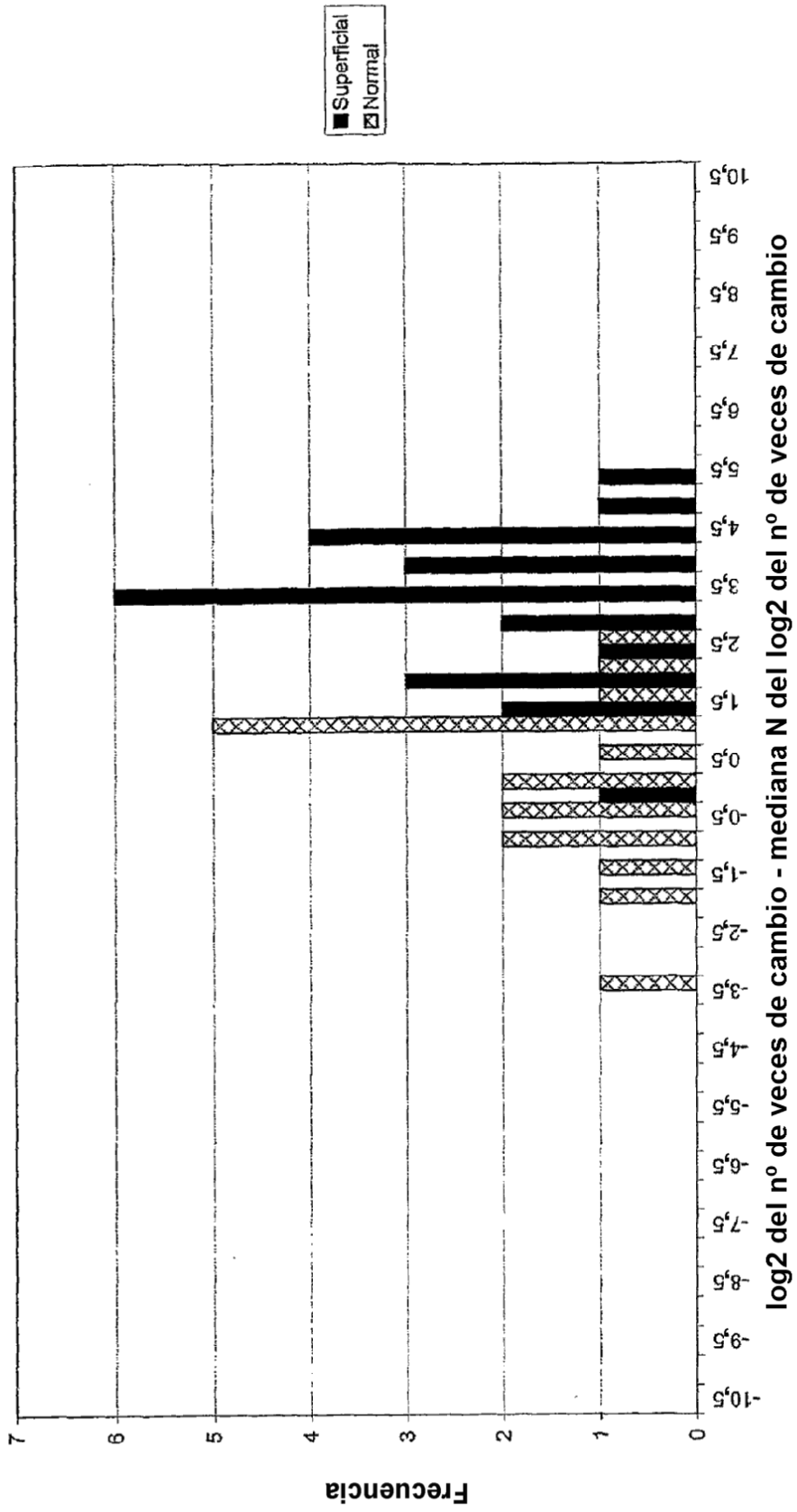


Figura 6s

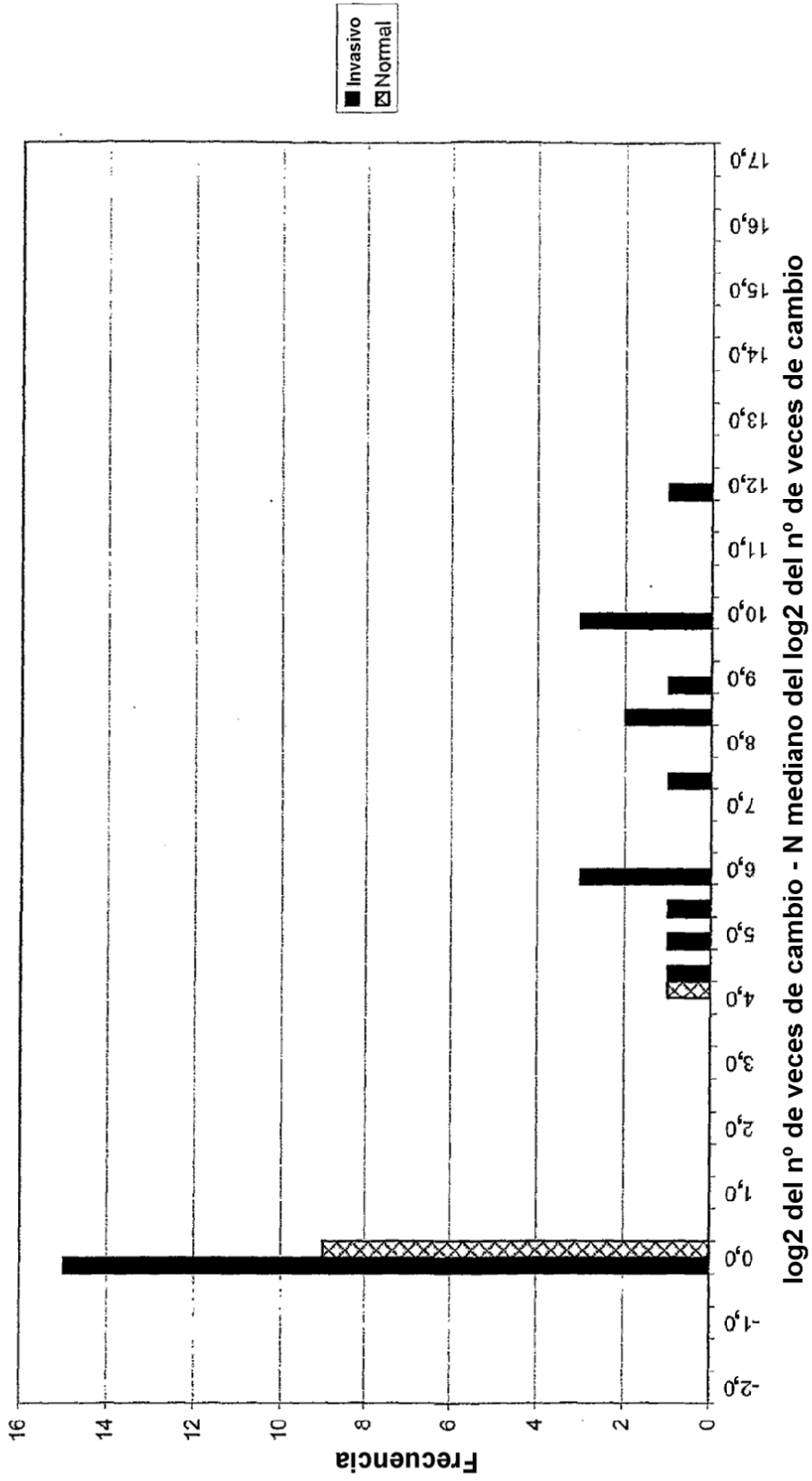


Figura 6t

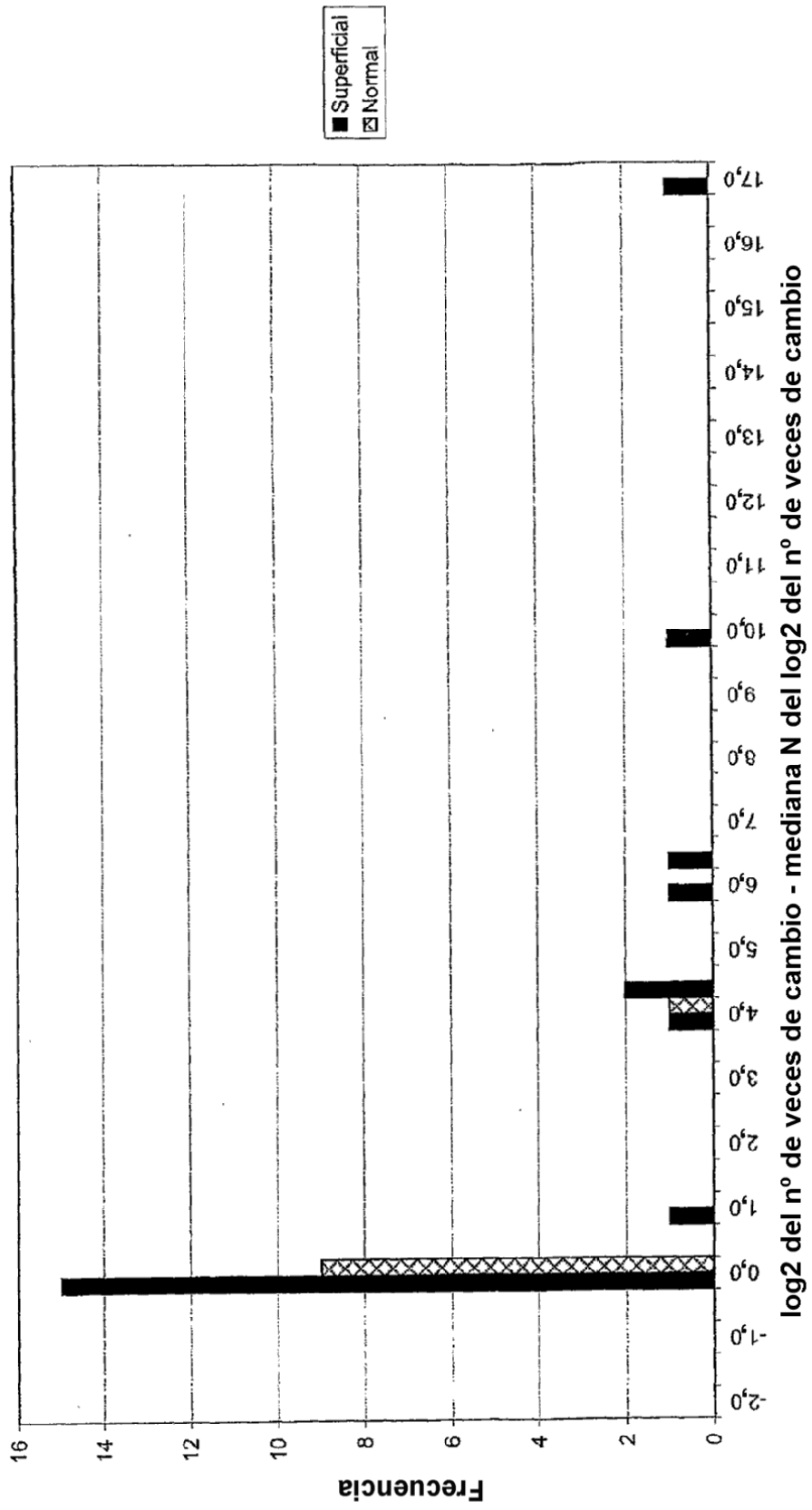


Figura 6u

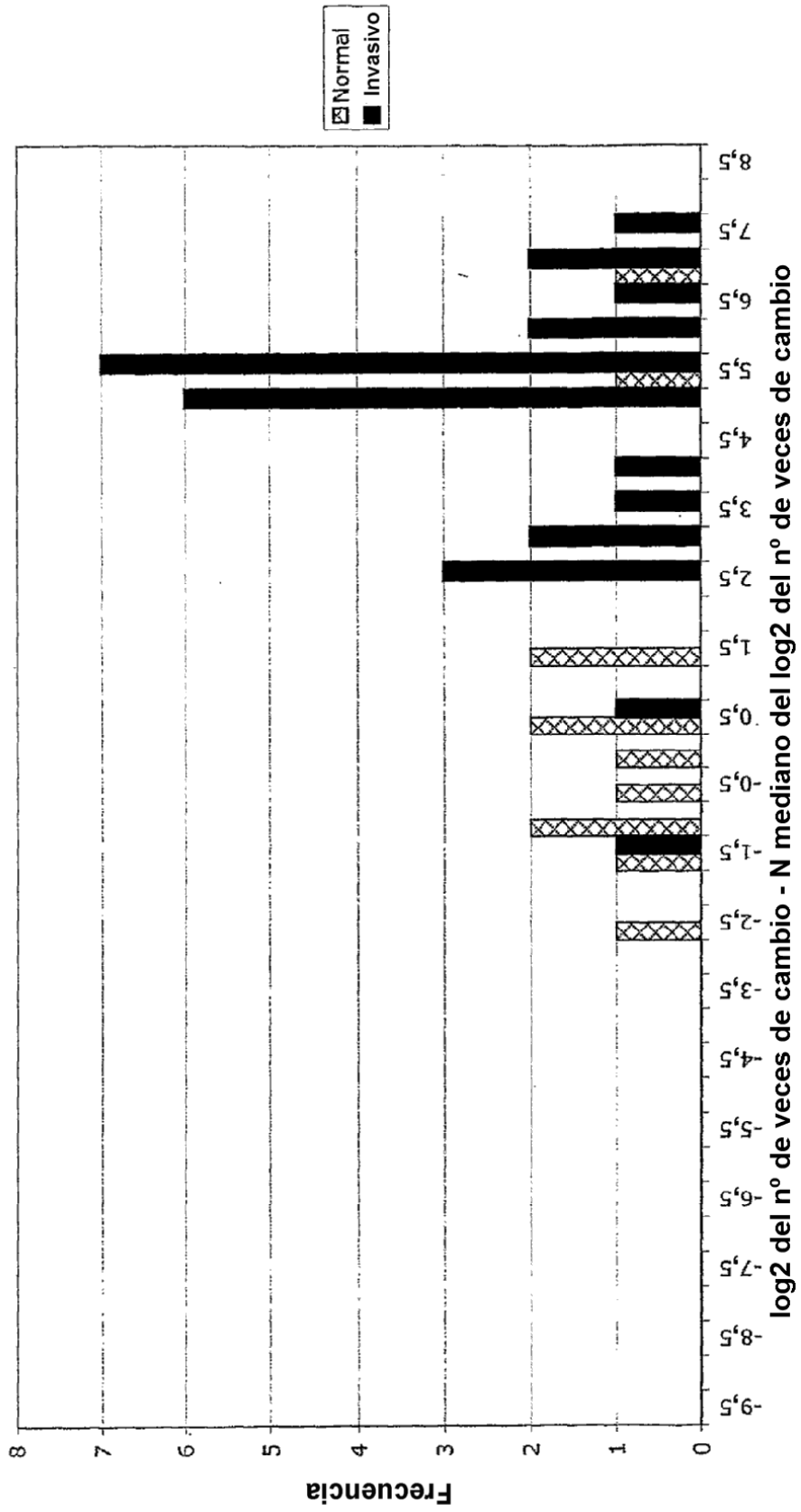


Figura 6v

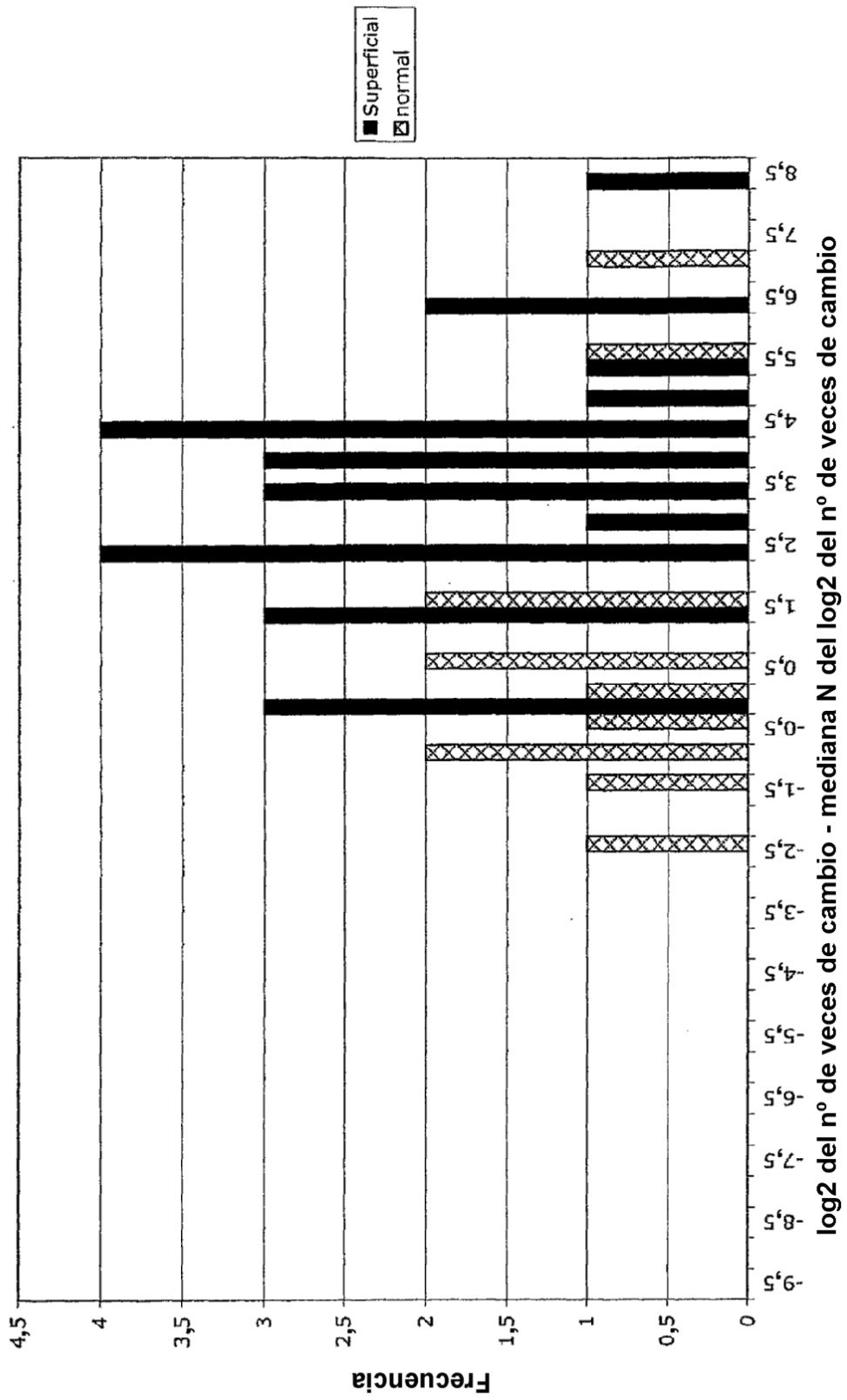


Figura 6w

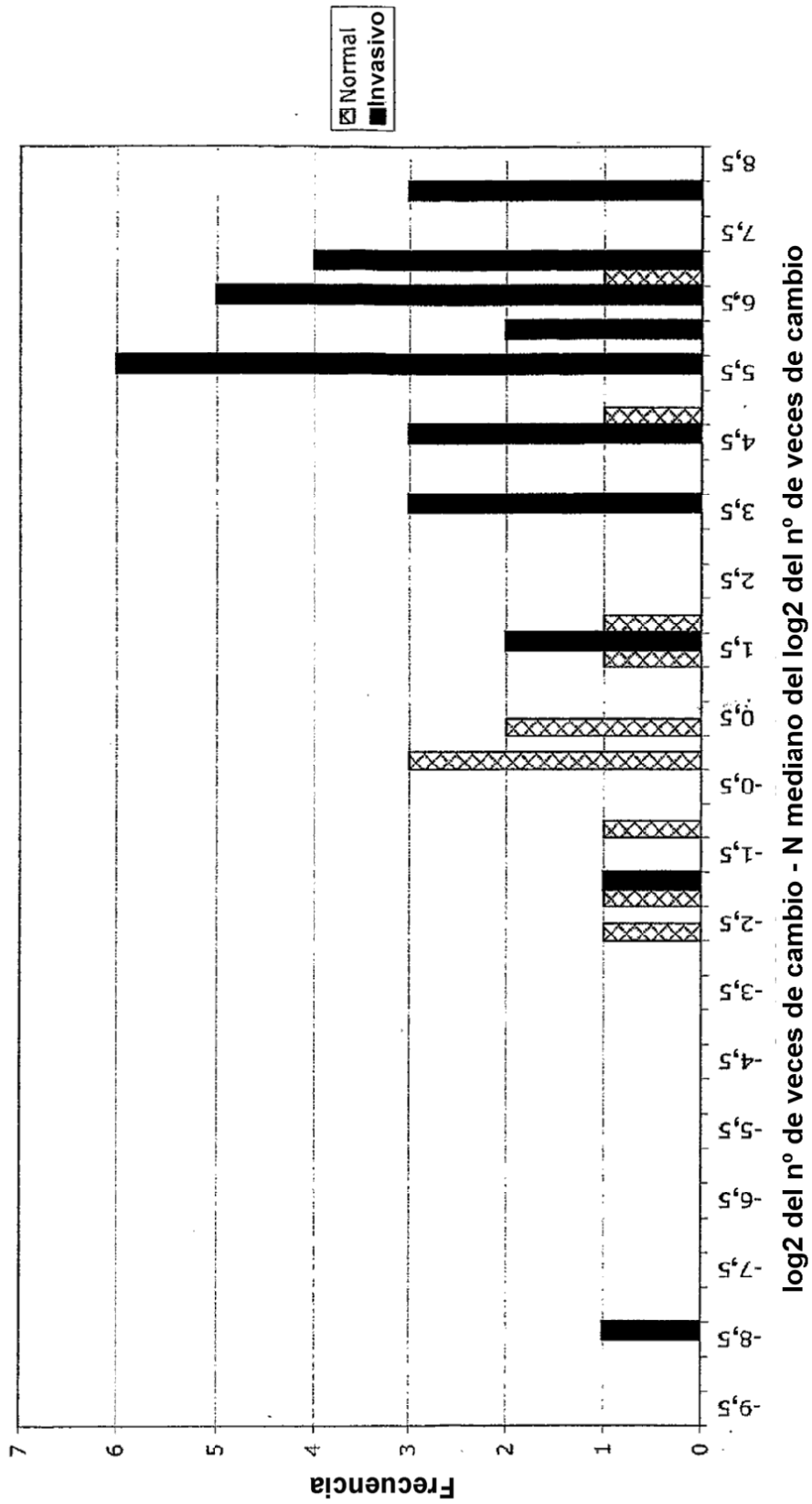


Figura 6x

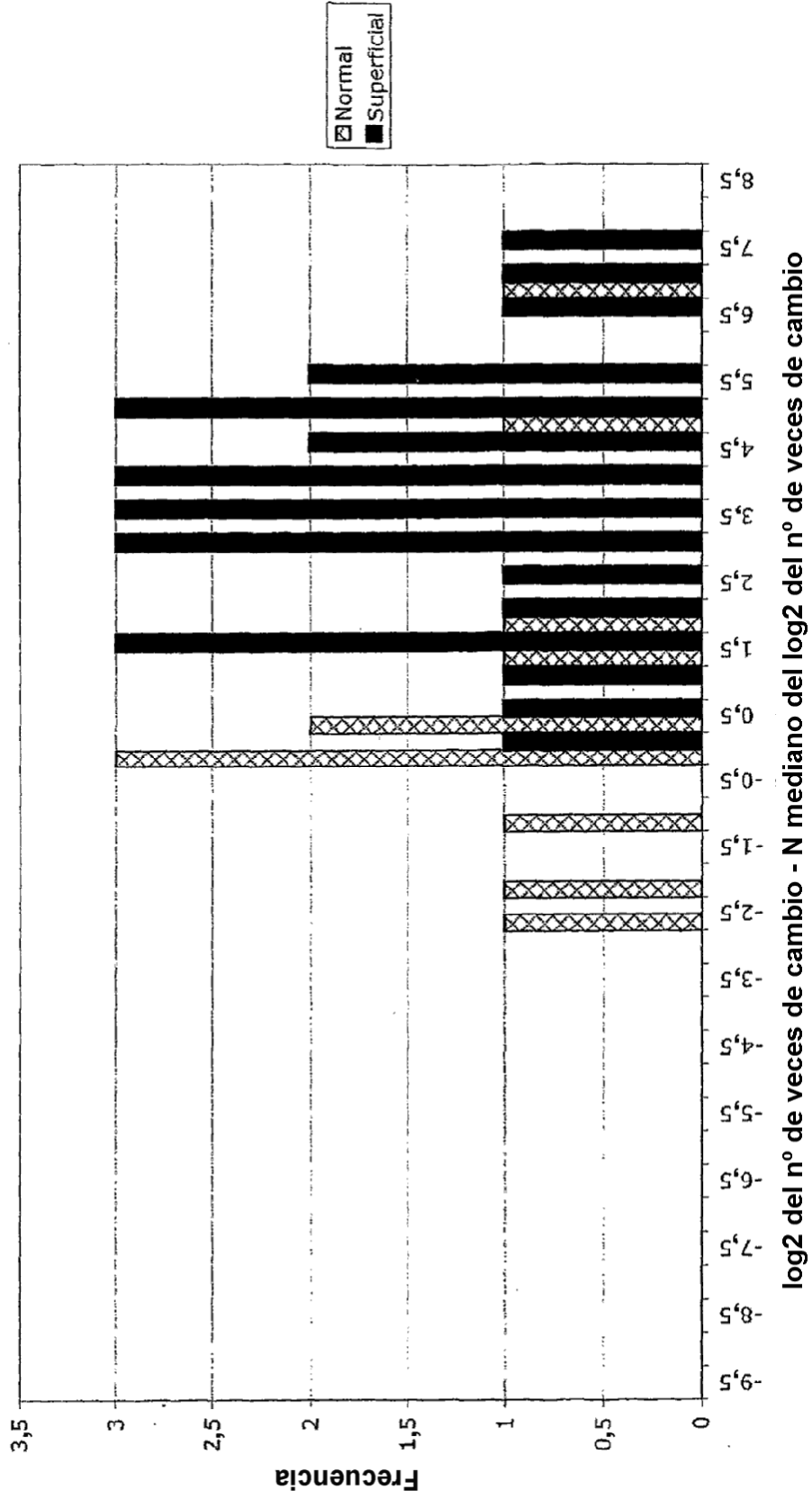




Figura 6y

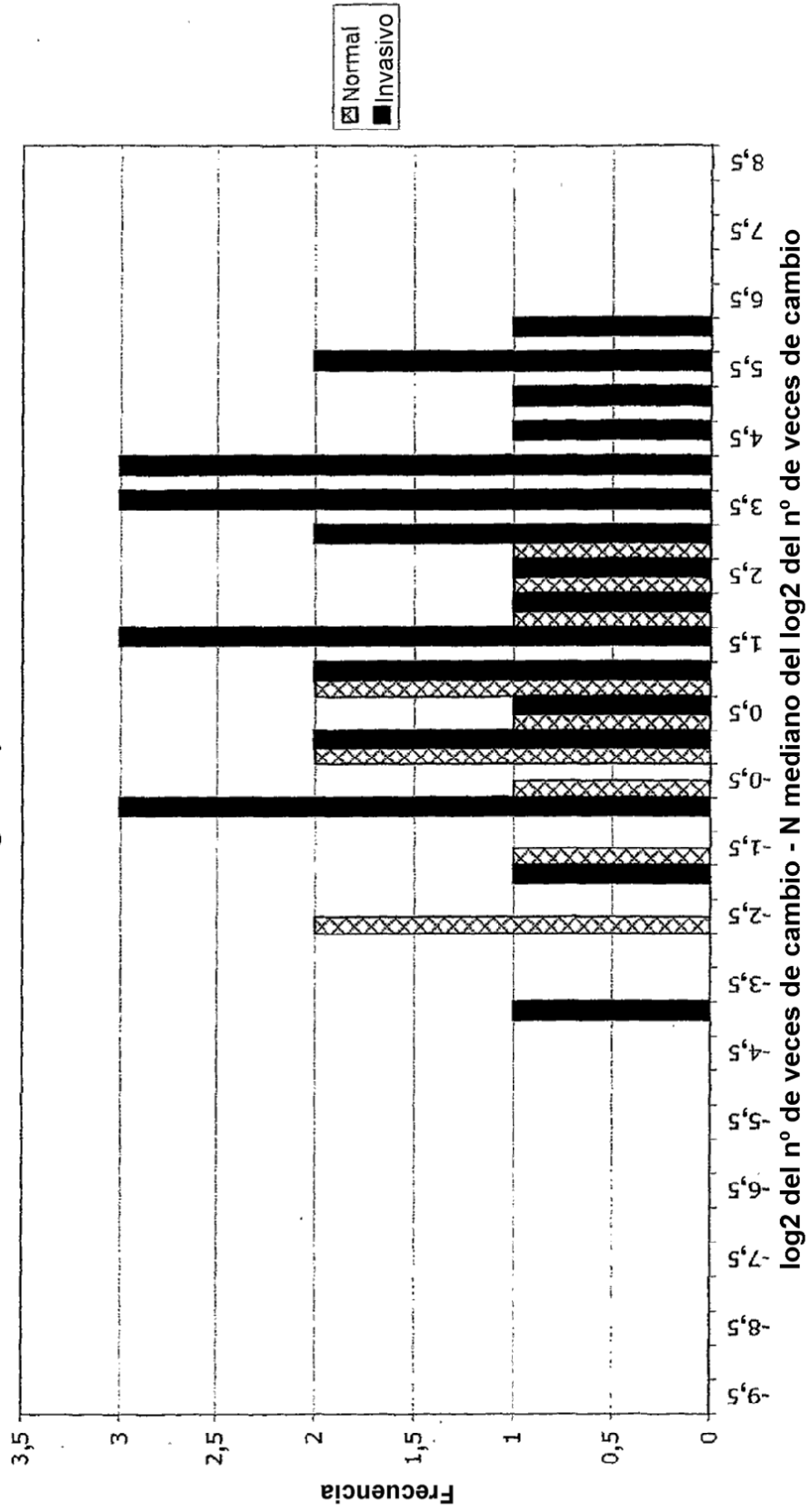


Figura 6aa

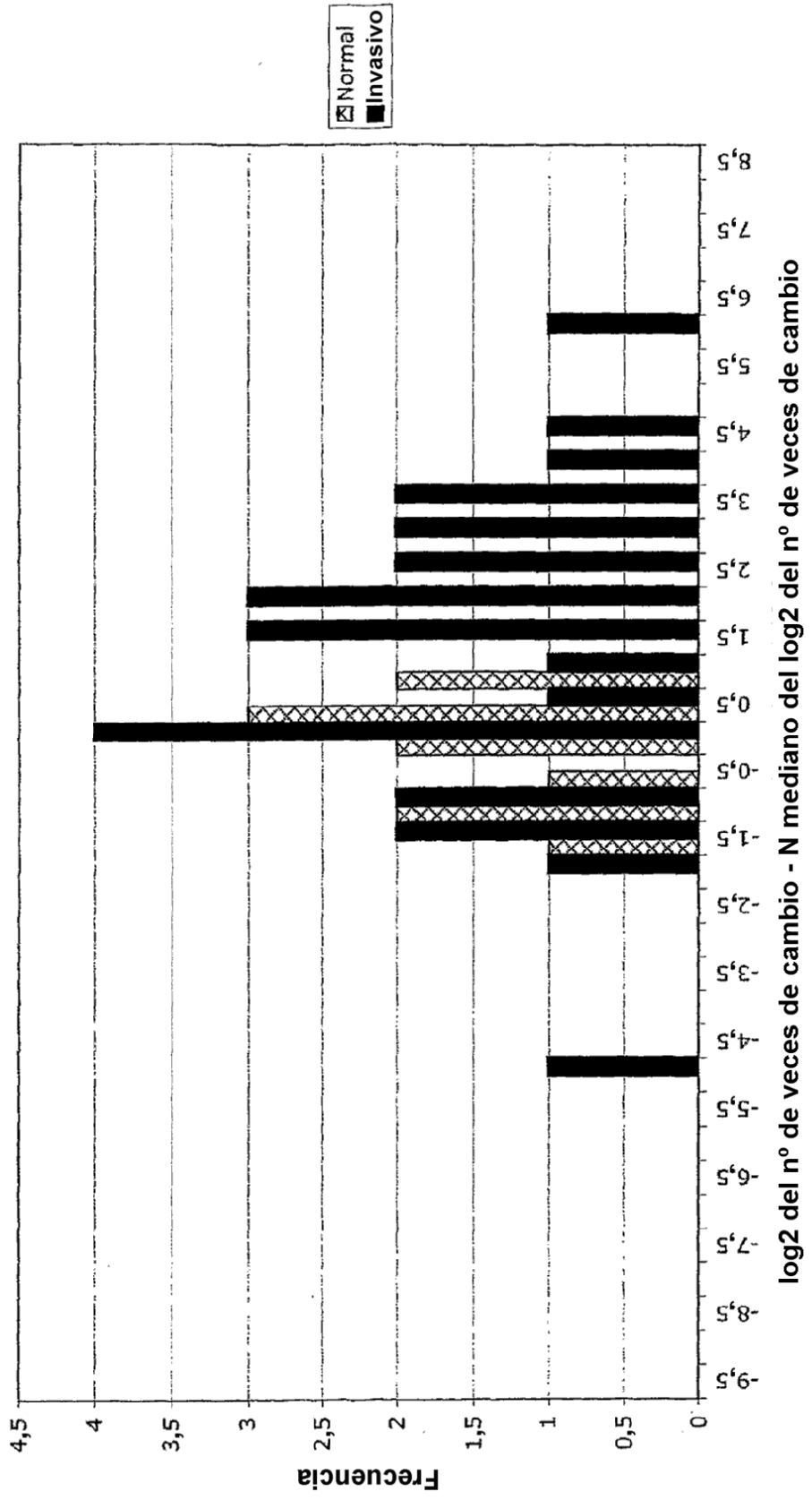


Figura 6ab

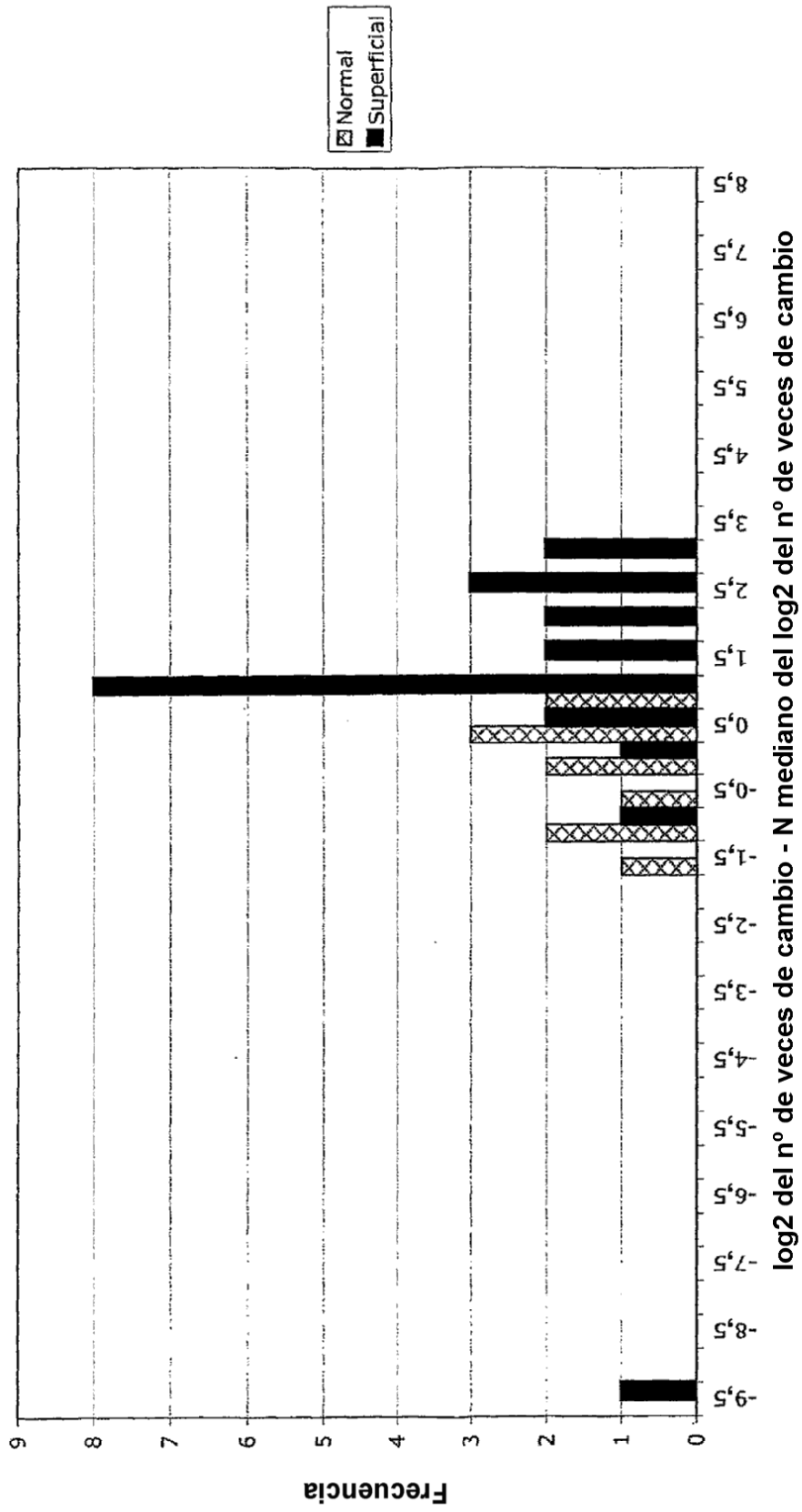


Figura 6ac

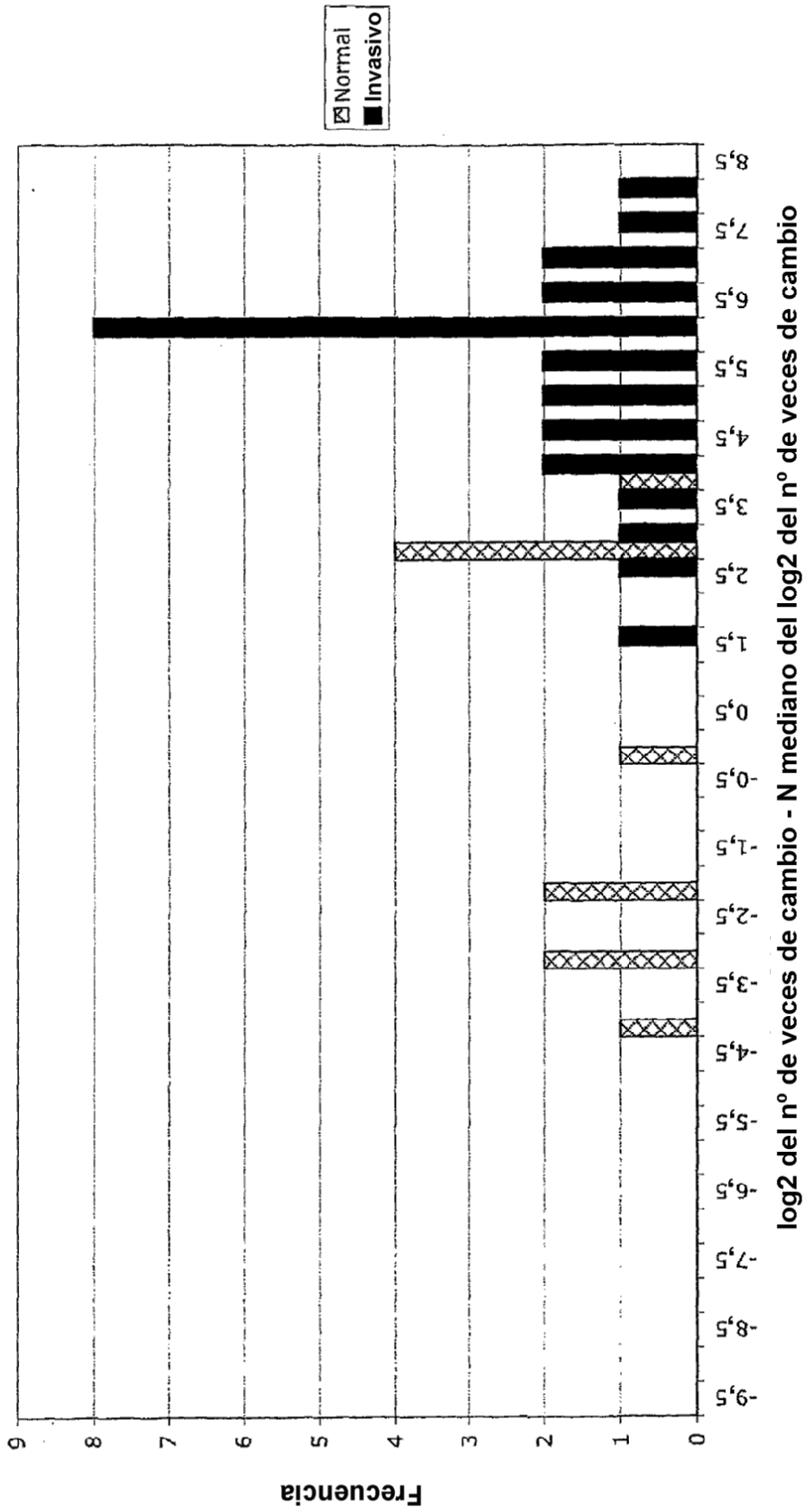


Figura 6ad

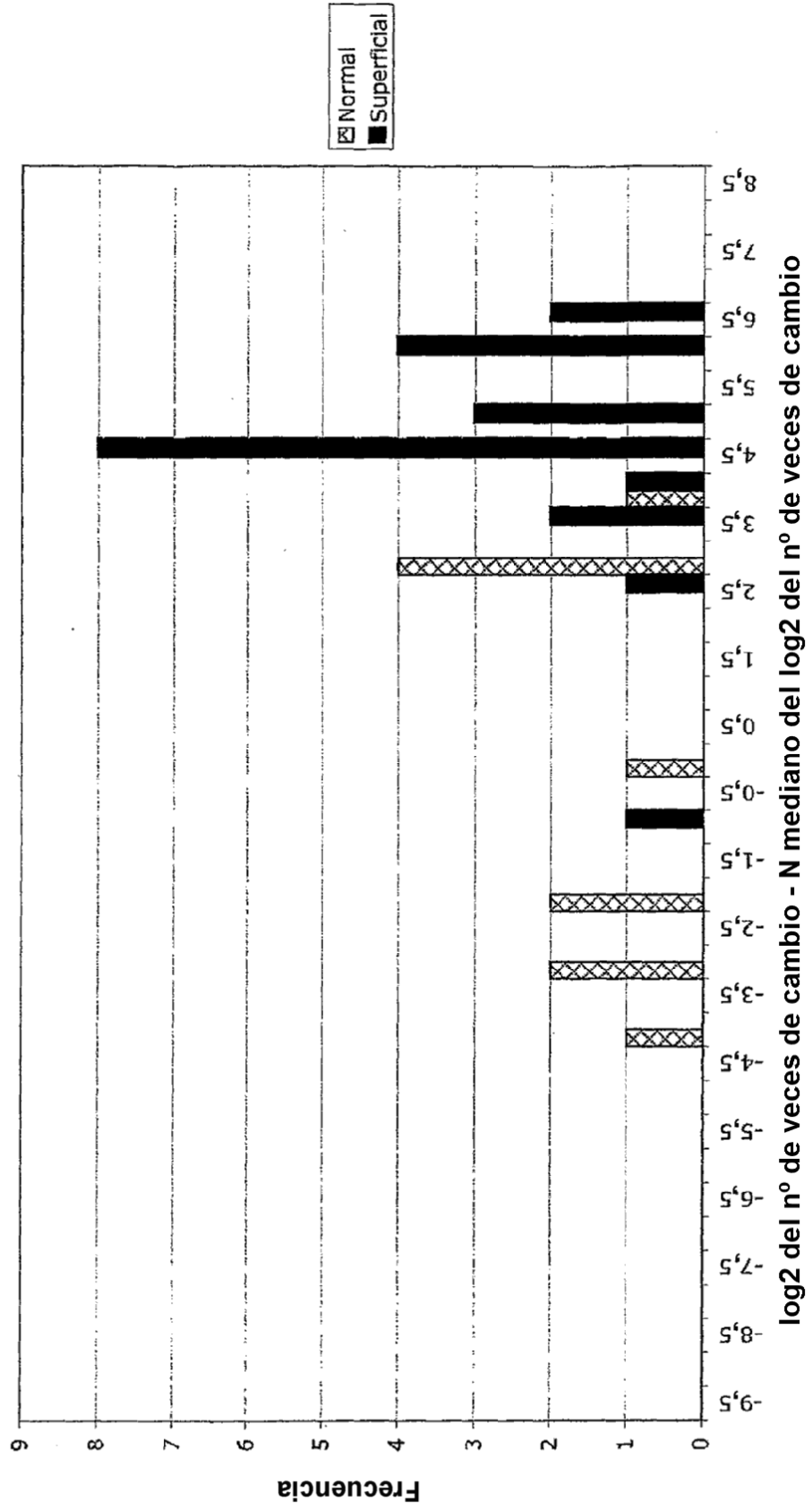


Figura 6ae

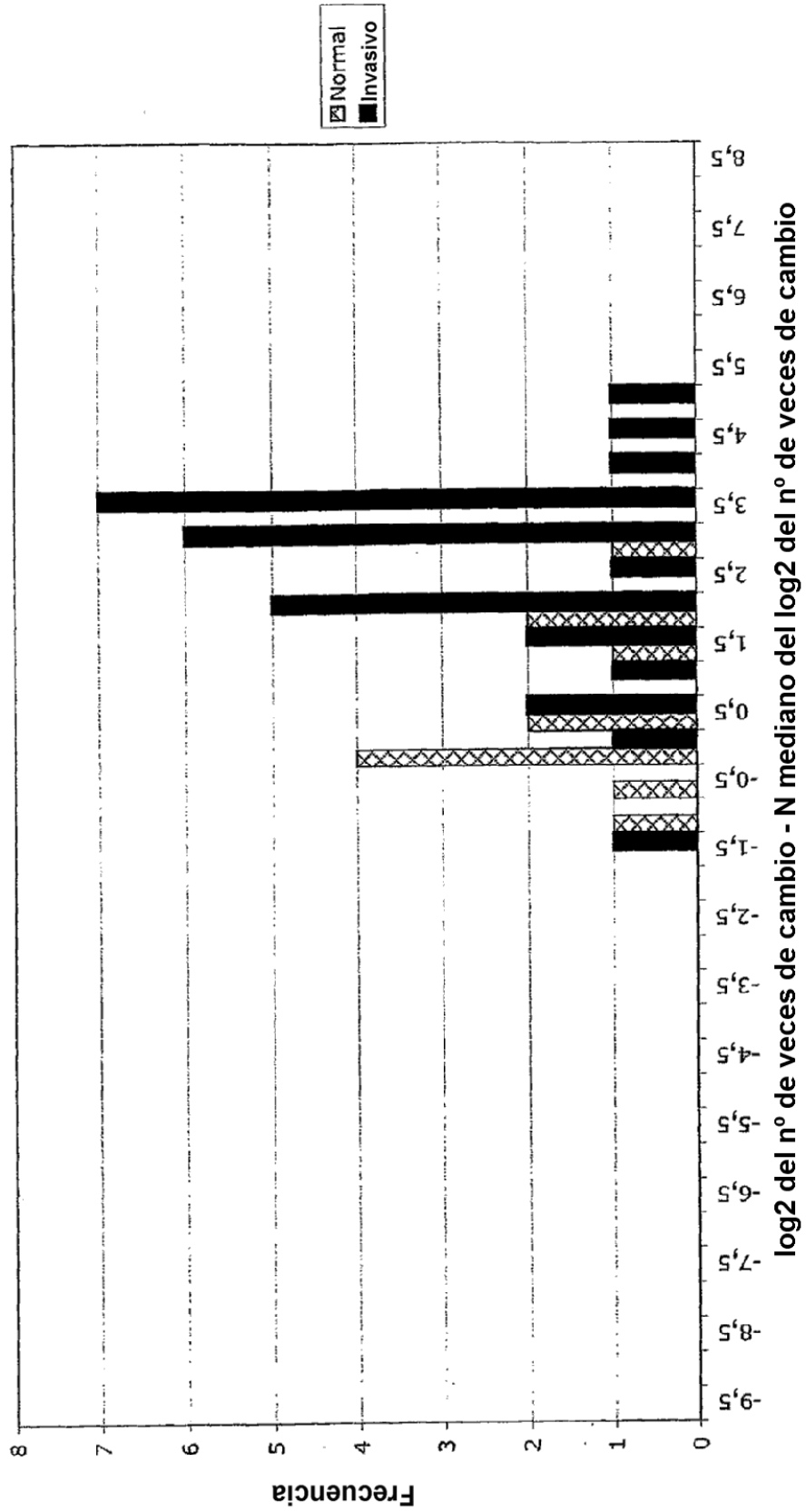
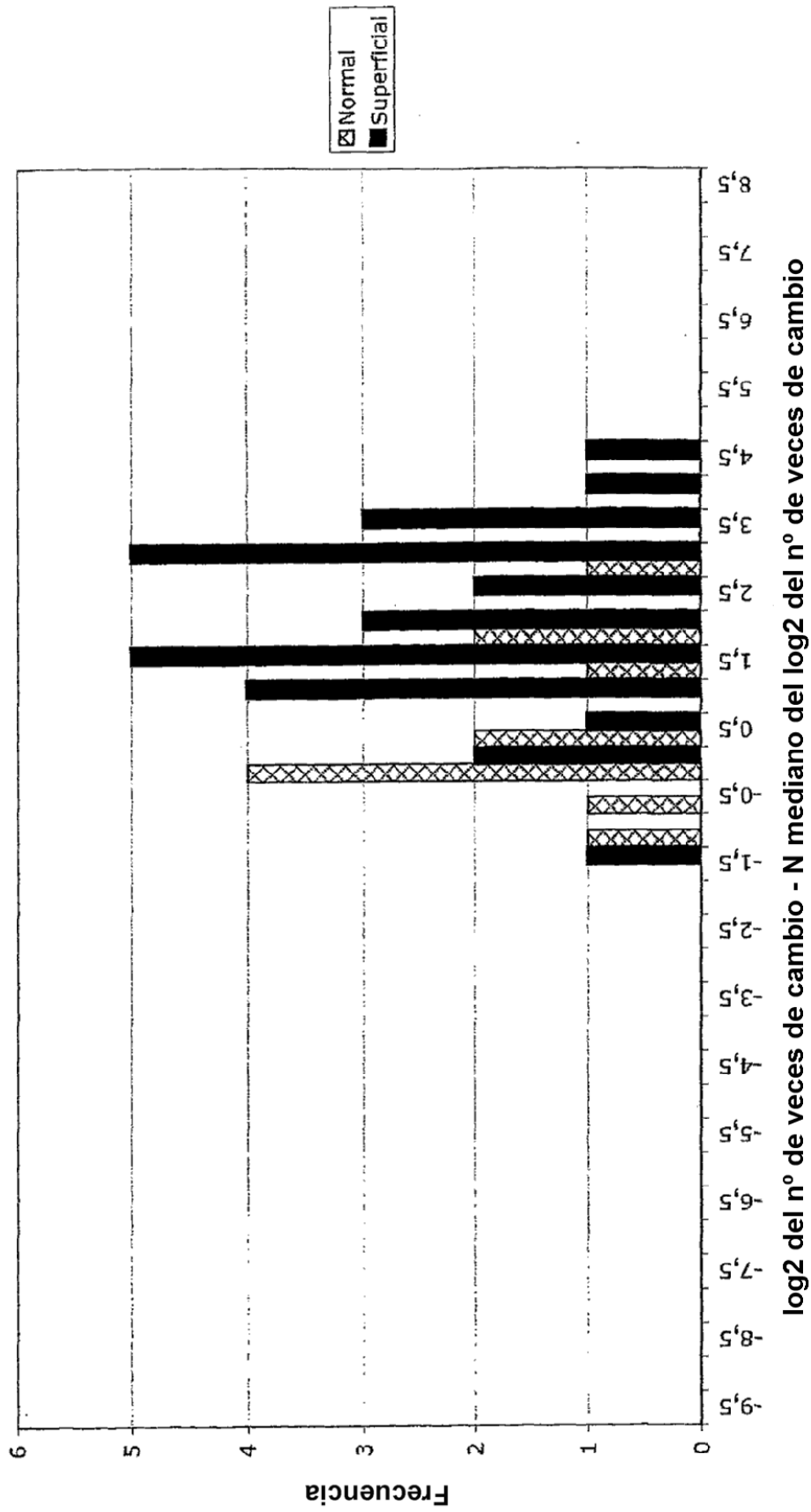


Figura 6af



Nombre	Símbolo	Mediana de pacientes: control del nº de veces de cambio	Máximo de pacientes: control del nº de veces de cambio
antígeno asociado al esperma 5	SPAG5	8	304
topoisomerasa (ADN) II alfa 170 kDa	TOP2A	165	5716
ciclo de división celular 2, desde G1 hasta S y desde G2 hasta M	GDC2	5	2370
endoglina (síndrome de Osler-Rendu-Weber 1)	ENG	12	240
proteína de unión al factor de crecimiento insulinoide 5	IGFBP5	85	14,862
gen del nefroblastoma sobreexpresado	NOV	6	730
neuropilina 1	NRP1	43	380
dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforina) 3F	SEMA3F	35	567
dominio de tipo EGF, múltiple 6	EGFL6	1	1
proteína de la matriz Gla	MGP	17	1147
semaforina sem2	SEM2	5	501
cromogranina A (proteína secretora paratiroidea 1)	CHGA	NT	NT
enzima de conjugación con ubiquitina E2C	UBE2C	63	1461
homeocaja A1 3	H0XA13	20	1221
midcina (factor promotor del crecimiento de las neuritas 2)	MDK	265	4188
antígeno de la superficie celular Thy-1	THY1	2	26
IAP de baculovirus que contiene repeticiones 5 (survivina)	BIRC5	81	3524
SMC4 de tipo 1 de mantenimiento estructural de los cromosomas 4-1	SMC4L1	13	232

Figura 7



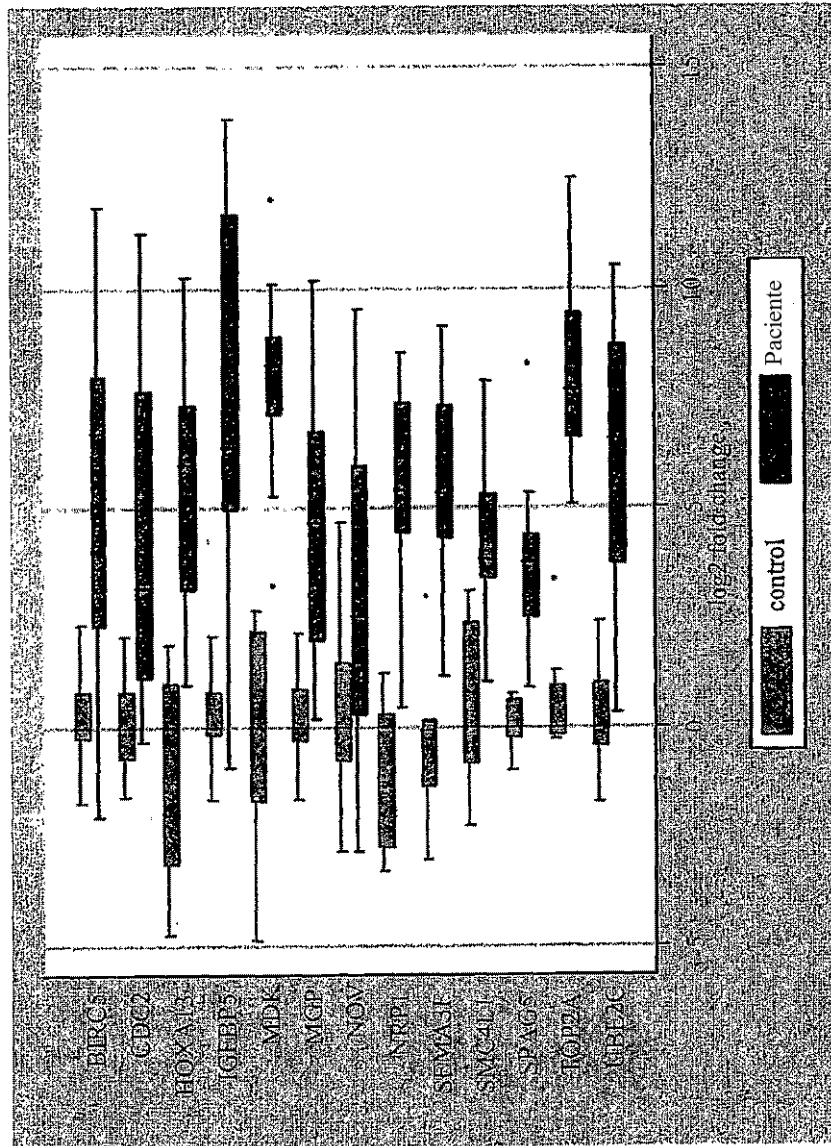
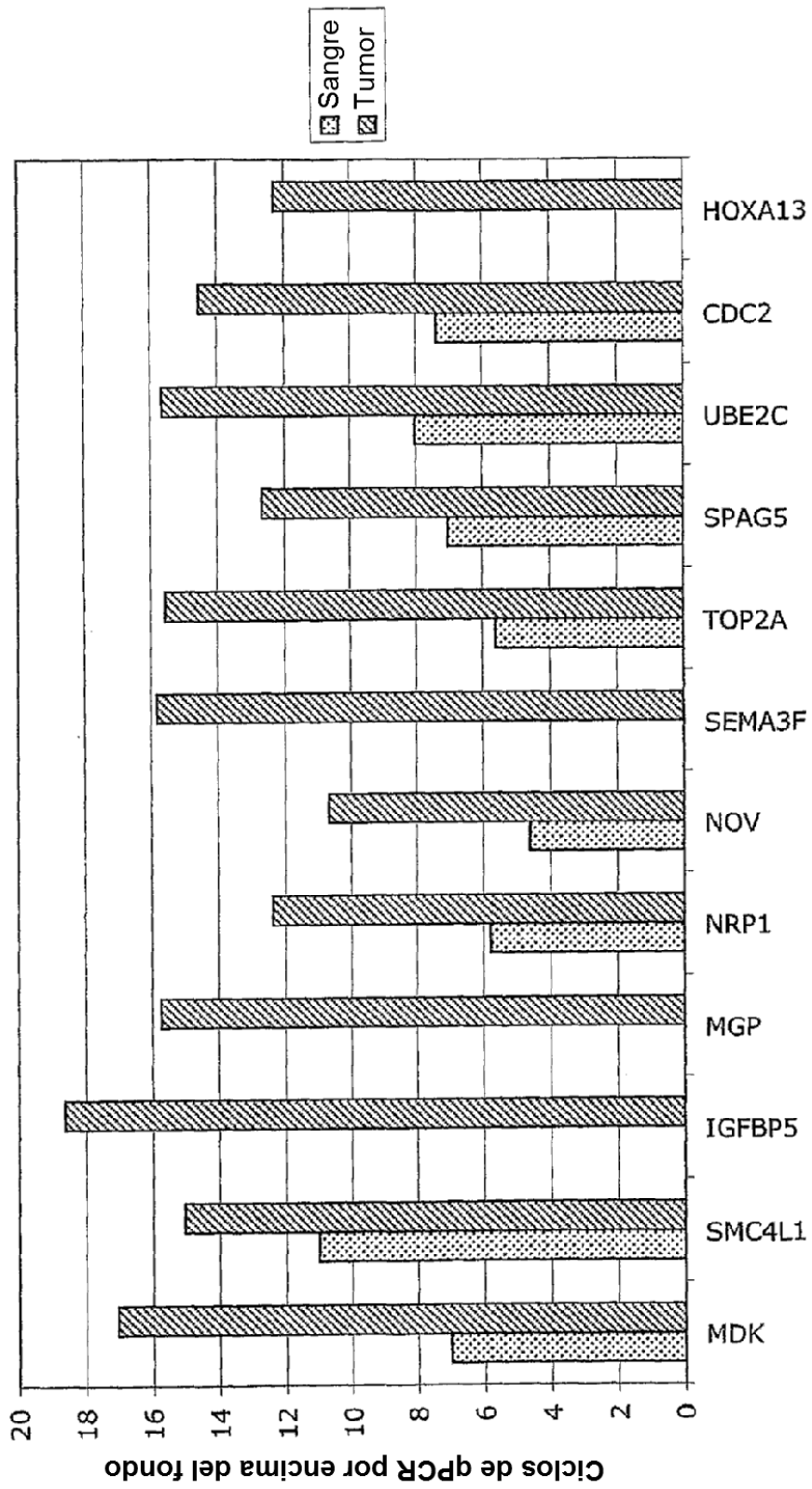


Figura 8



Marcador  
Figura 9

Marcador	<i>Mediana del log2 de la diferencia</i>	<i>Mediana del log2 de la diferencia</i>
	control de paciente: sano	control de paciente: no maligno
<b>HoxA13</b>	8	7,2
<b>IGFBP5</b>	10,4	10,1
<b>NRP1</b>	6,2	4,9
<b>Sema3F</b>	8,3	7,4
<b>Top2a</b>	6,3	6
<b>UBE2c</b>	6,4	4,6
<b>SMC4L1</b>	5,4	4
<b>MDK</b>	10,1	7,7
<b>MGP</b>	7,1	7,2

Figura 10

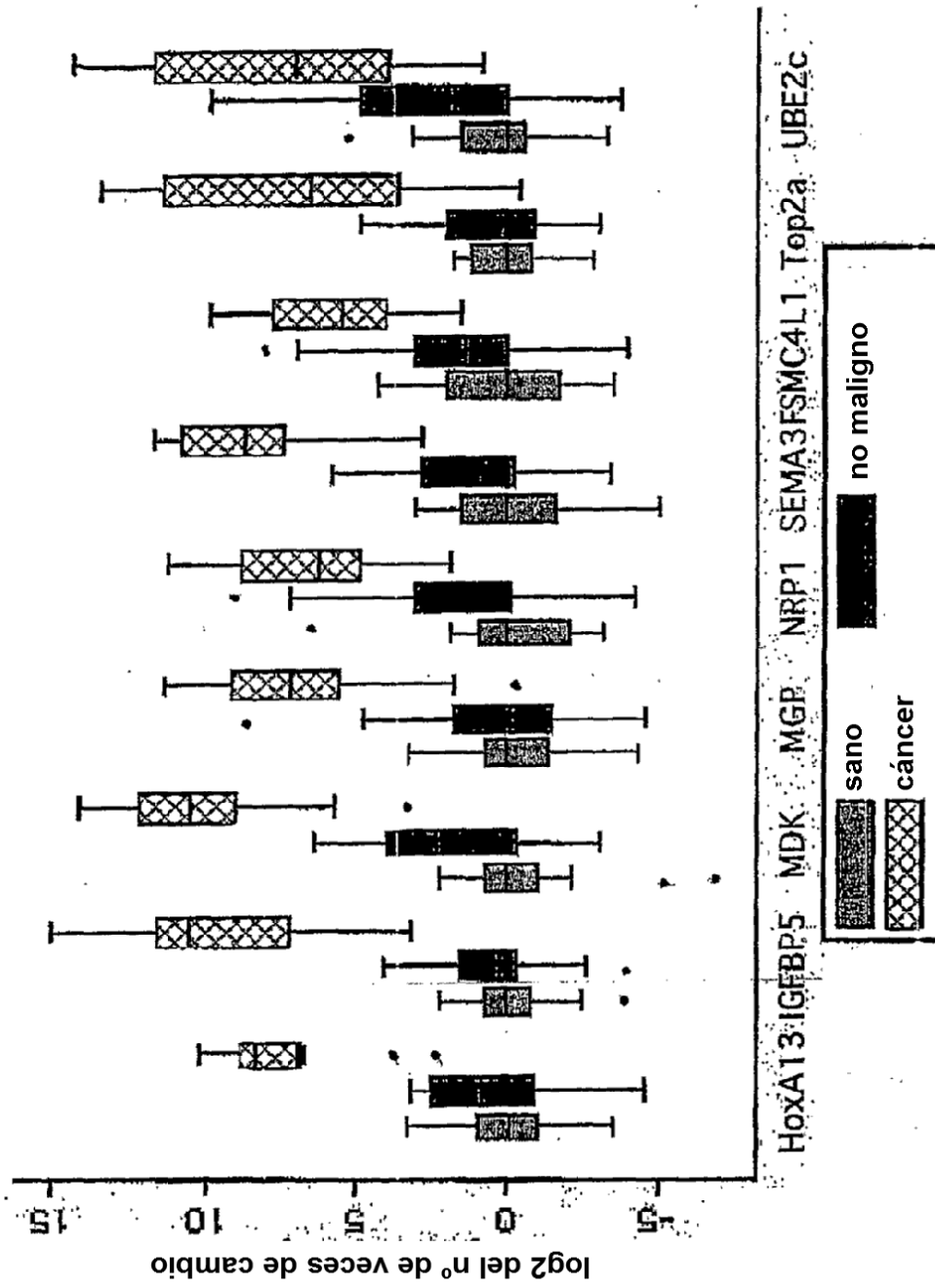


Figura 11

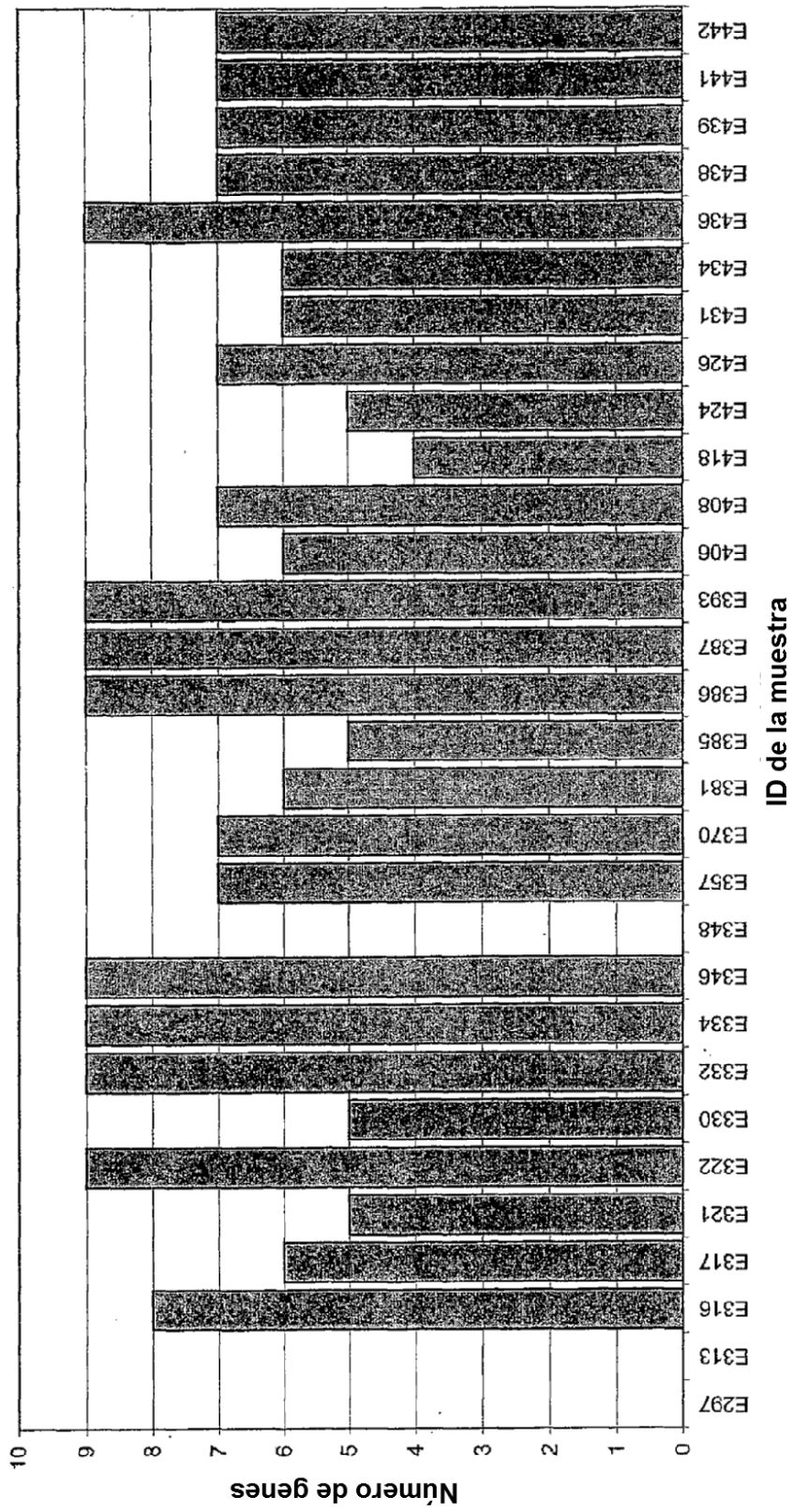


Figura 12a

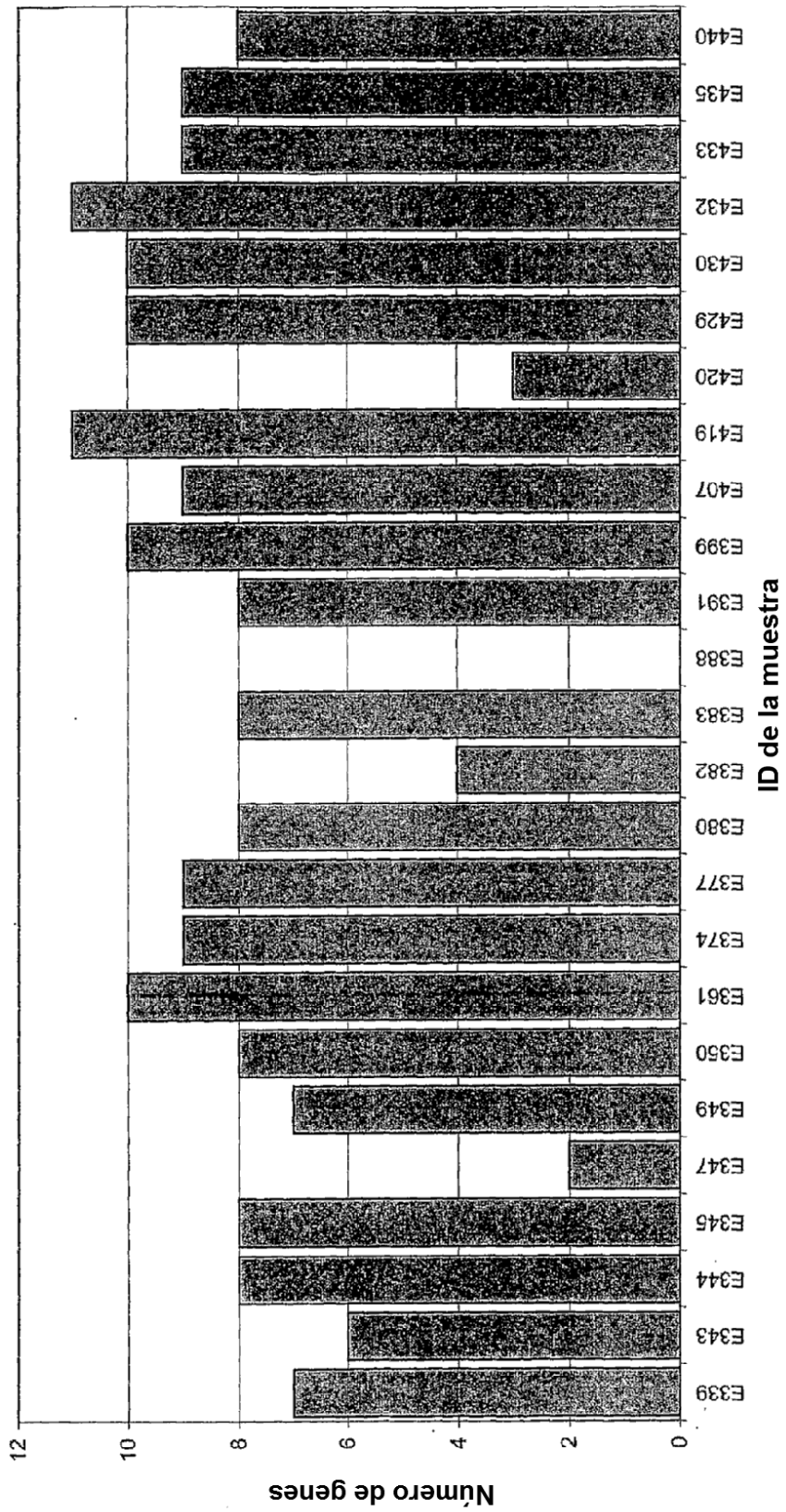


Figura 12b

Número de marcadores en la prueba	Total de pruebas posibles	Número de pruebas con sensibilidad			Proporción de pruebas con sensibilidad		
		>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %	>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %
1	15	3	2	0	20 %	13 %	0 %
2	105	42	13	3	40 %	13 %	3 %
3	455	247	233	62	54 %	51 %	14 %

Figura 13a

Número de marcadores en la prueba	Total de pruebas posibles	Número de pruebas con sensibilidad			Proporción de pruebas con sensibilidad		
		>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %	>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %
1	17	0	0	0	0 %	0 %	0 %
2	136	11	1	0	8 %	1 %	0 %
3	680	136	22	0	20 %	3 %	0 %

Figura 13b

**Marcador único**

<b>Marcador</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	<u>96,6 %</u>
SPAG5	<u>96,2 %</u>
CDC2	<u>94,8 %</u>
NRP1	<u>79,2 %</u>
CHGA	<u>70,6 %</u>
SEM2	<u>55,2 %</u>
THY1	<u>52,9 %</u>
SMC4L1	<u>50,3 %</u>
MGP	<u>49,4 %</u>
MDK	<u>48,7 %</u>
ENG	<u>47,7 %</u>
UBE2c	<u>45,3 %</u>
EGFL6	<u>39,2 %</u>
BIRC5	<u>36,1 %</u>
HOXA13	<u>32,6 %</u>

**Combinación de dos marcadores**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	CDC2	<u>99,4 %</u>
SPAG5	TOP2A	<u>99,3 %</u>
SPAG5	CDC2	<u>99,3 %</u>
NRP1	UBE2c	<u>98,1 %</u>
SPAG5	MDK	<u>96,8 %</u>
TOP2a	THY1	<u>96,7 %</u>
SPAG5	CHGA	<u>96,6 %</u>
TOP2a	CHGA	<u>96,5 %</u>
SPAG5	THY1	<u>96,5 %</u>
TOP2a	MDK	<u>96,2 %</u>
CDC2	CHGA	<u>95,4 %</u>
TOP2a	ENG	<u>95,3 %</u>
TOP2a	MGP	<u>95,1 %</u>
SPAG5	NRP1	<u>95,0 %</u>
SPAG5	BIRC5	<u>94,9 %</u>
TOP2a	NRP1	<u>94,9 %</u>
SPAG5	MGP	<u>94,8 %</u>
SPAG5	EGFL6	<u>94,8 %</u>
TOP2a	HOXA13	<u>94,7 %</u>
TOP2a	EGFL6	<u>94,7 %</u>

Figura 14a



**Combinación de dos marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	BIRC5	<u>94,7 %</u>
SPAG5	ENG	<u>94,6 %</u>
SPAG5	HOXA13	<u>94,4 %</u>
CDC2	THY1	<u>94,4 %</u>
CDC2	MDK	<u>93,9 %</u>
SPAG5	SEM2	<u>93,8 %</u>
TOP2a	SMC4L1	<u>93,7 %</u>
TOP2a	SEM2	<u>93,6 %</u>
CDC2	NRP1	<u>93,6 %</u>
CDC2	MGP	<u>93,3 %</u>
CDC2	ENG	<u>93,1 %</u>
TOP2a	UBE2c	<u>92,8 %</u>
SPAG5	UBE2c	<u>92,7 %</u>
CDC2	EGFL6	<u>92,4 %</u>
CDC2	BIRC5	<u>92,4 %</u>
SPAG5	SMC4L1	<u>92,4 %</u>
CDC2	HOXA13	<u>92,3 %</u>
CDC2	SEM2	<u>91,2 %</u>
NRP1	MDK	<u>91,2 %</u>
NRP1	THY1	<u>90,6 %</u>
CDC2	SMC4L1	<u>90,6 %</u>
CDC2	UBE2c	<u>90,0 %</u>

**Combinación de tres marcadores**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
SPAG5	TOP2a	CDC2	<u>100,0 %</u>
SPAG5	TOP2a	NRP1	<u>99,9 %</u>
TOP2a	CDC2	NRP1	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	CHGA	<u>99,9 %</u>
SPAG5	CDC2	NRP1	<u>99,9 %</u>
TOP2a	CDC2	CHGA	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	SEM2	<u>99,9 %</u>
SPAG5	CDC2	CHGA	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	THY1	<u>99,8 %</u>
SPAG5	TOP2a	SMC4L1	<u>99,8 %</u>
SPAG5	TOP2a	MGP	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	MDK	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	ENG	<u>99,9 %</u>
SPAG5	TOP2a	UBE2c	<u>99,8 %</u>
SPAG5	TOP2a	EGFL6	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	SEM2	<u>99,8 %</u>

Figura 14a (cont.)

<b>Combinación de tres marcadores (cont.)</b>			
<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
SPAG5	TOP2a	BIRC5	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	THY1	<u>99,7 %</u>
SPAG5	TOP2a	HOXA13	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	SMC4L1	<u>99,8 %</u>
SPAG5	CDC2	SEM2	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	MGP	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	MDK	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	ENG	<u>99,8 %</u>
SPAG5	CDC2	THY1	<u>99,7 %</u>
TOP2a	CDC2	UBE2c	<u>99,7 %</u>
SPAG5	CDC2	SMC4L1	<u>99,8 %</u>
SPAG5	CDC2	MGP	<u>99,8 %</u>
SPAG5	CDC2	MDK	<u>99,8 %</u>
SPAG5	CDC2	ENG	<u>99,8 %</u>
TOP2a	CDC2	EGFL6	<u>99,7 %</u>
SPAG5	CDC2	UBE2c	<u>99,7 %</u>
TOP2a	CDC2	BIRC5	<u>99,7 %</u>
TOP2a	CDC2	HOXA13	<u>99,7 %</u>
SPAG5	CDC2	EGFL6	<u>99,7 %</u>
SPAG5	CDC2	BIRC5	<u>99,7 %</u>
SPAG5	CDC2	HOXA13	<u>99,7 %</u>
TOP2a	NRP1	CHGA	<u>99,5 %</u>
SPAG5	NRP1	CHGA	<u>99,5 %</u>
TOP2a	NRP1	SEM2	<u>99,2 %</u>
CDC2	NRP1	CHGA	<u>99,3 %</u>
TOP2a	NRP1	THY1	<u>98,9 %</u>
TOP2a	NRP1	SMC4L1	<u>99,1 %</u>
SPAG5	NRP1	SEM2	<u>99,2 %</u>
TOP2a	NRP1	MGP	<u>99,2 %</u>
TOP2a	NRP1	MDK	<u>99,2 %</u>
TOP2a	ENG	NRP1	<u>99,1 %</u>
SPAG5	NRP1	THY1	<u>98,9 %</u>
TOP2a	NRP1	UBE2c	<u>99,0 %</u>
SPAG5	NRP1	SMC4L1	<u>99,1 %</u>
SPAG5	NRP1	MGP	<u>99,2 %</u>
SPAG5	NRP1	MDK	<u>99,2 %</u>
SPAG5	ENG	NRP1	<u>99,1 %</u>
TOP2a	NRP1	EGFL6	<u>99,0 %</u>
SPAG5	NRP1	UBE2c	<u>99,0 %</u>
TOP2a	SEM2	CHGA	<u>99,1 %</u>
TOP2a	NRP1	BIRC5	<u>98,8 %</u>

Figura 14a (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	CHGA	THY1	<b><u>98,8 %</u></b>
TOP2a	NRP1	HOXA13	<b><u>98,9 %</u></b>
SPAG5	NRP1	EGFL6	<b><u>99,0 %</u></b>
CDC2	NRP1	SEM2	<b><u>98,7 %</u></b>
TOP2a	CHGA	SMC4L1	<b><u>99,0 %</u></b>
SPAG5	SEM2	CHGA	<b><u>99,1 %</u></b>
SPAG5	NRP1	BIRC5	<b><u>98,8 %</u></b>
TOP2a	MGP	CHGA	<b><u>99,1 %</u></b>
CDC2	NRP1	THY1	<b><u>98,3 %</u></b>
TOP2a	CHGA	MDK	<b><u>99,1 %</u></b>
TOP2a	ENG	CHGA	<b><u>99,0 %</u></b>
SPAG5	CHGA	THY1	<b><u>98,8 %</u></b>
SPAG5	NRP1	HOXA13	<b><u>98,9 %</u></b>
CDC2	NRP1	SMC4L1	<b><u>98,6 %</u></b>
TOP2a	CHGA	UBE2c	<b><u>98,9 %</u></b>
CDC2	NRP1	MGP	<b><u>98,7 %</u></b>
SPAG5	CHGA	SMC4L1	<b><u>99,0 %</u></b>
CDC2	NRP1	MDK	<b><u>98,7 %</u></b>
SPAG5	MGP	CHGA	<b><u>99,1 %</u></b>
CDC2	ENG	NRP1	<b><u>98,6 %</u></b>
SPAG5	CHGA	MDK	<b><u>99,1 %</u></b>
SPAG5	ENG	CHGA	<b><u>99,0 %</u></b>
CDC2	NRP1	UBE2c	<b><u>98,5 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	CHGA	<b><u>98,9 %</u></b>
SPAG5	CHGA	UBE2c	<b><u>98,9 %</u></b>
TOP2a	CHGA	BIRC5	<b><u>98,7 %</u></b>
CDC2	NRP1	EGFL6	<b><u>98,4 %</u></b>
TOP2a	CHGA	HOXA13	<b><u>98,8 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	CHGA	<b><u>98,9 %</u></b>
CDC2	SEM2	CHGA	<b><u>98,6 %</u></b>
CDC2	NRP1	BIRC5	<b><u>98,1 %</u></b>
SPAG5	CHGA	BIRC5	<b><u>98,7 %</u></b>
TOP2a	SEM2	THY1	<b><u>97,8 %</u></b>
CDC2	CHGA	THY1	<b><u>98,1 %</u></b>
CDC2	NRP1	HOXA13	<b><u>98,3 %</u></b>
SPAG5	CHGA	HOXA13	<b><u>98,8 %</u></b>
TOP2a	SEM2	SMC4L1	<b><u>98,2 %</u></b>
CDC2	CHGA	SMC4L1	<b><u>98,4 %</u></b>
TOP2a	MGP	SEM2	<b><u>98,3 %</u></b>
CDC2	MGP	CHGA	<b><u>98,5 %</u></b>
TOP2a	SEM2	MDK	<b><u>98,4 %</u></b>

Figura 14a (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	CHGA	MDK	<u>98,6 %</u>
TOP2a	THY1	SMC4L1	<u>97,5 %</u>
TOP2a	ENG	SEM2	<u>98,3 %</u>
SPAG5	SEM2	THY1	<u>97,8 %</u>
CDC2	ENG	CHGA	<u>98,5 %</u>
TOP2a	MGP	THY1	<u>97,7 %</u>
TOP2a	MDK	THY1	<u>97,8 %</u>
TOP2a	SEM2	UBE2c	<u>98,1 %</u>
TOP2a	ENG	THY1	<u>97,6 %</u>
CDC2	CHGA	UBE2c	<u>98,3 %</u>
SPAG5	SEM2	SMC4L1	<u>98,2 %</u>
TOP2a	MGP	SMC4L1	<u>98,2 %</u>
SPAG5	MGP	SEM2	<u>98,3 %</u>
TOP2a	MDK	SMC4L1	<u>98,2 %</u>
SPAG5	SEM2	MDK	<u>98,4 %</u>
TOP2a	UBE2c	THY1	<u>97,4 %</u>
TOP2a	MGP	MDK	<u>98,3 %</u>
TOP2a	ENG	SMC4L1	<u>98,1 %</u>
SPAG5	THY1	SMC4L1	<u>97,5 %</u>
SPAG5	ENG	SEM2	<u>98,3 %</u>
TOP2a	ENG	MGP	<u>98,2 %</u>
SPAG5	MGP	THY1	<u>97,7 %</u>
TOP2a	ENG	MDK	<u>98,2 %</u>
SPAG5	MDK	THY1	<u>97,8 %</u>
TOP2a	UBE2c	SMC4L1	<u>97,8 %</u>
TOP2a	EGFL6	SEM2	<u>98,0 %</u>
SPAG5	SEM2	UBE2c	<u>98,1 %</u>
SPAG5	ENG	THY1	<u>97,6 %</u>
CDC2	EGFL6	CHGA	<u>98,3 %</u>
TOP2a	MGP	UBE2c	<u>98,0 %</u>
SPAG5	MGP	SMC4L1	<u>98,1 %</u>
TOP2a	UBE2c	MDK	<u>98,1 %</u>
SPAG5	MDK	SMC4L1	<u>98,2 %</u>
TOP2a	EGFL6	THY1	<u>97,3 %</u>
TOP2a	ENG	UBE2c	<u>97,9 %</u>
TOP2a	SEM2	BIRC5	<u>97,7 %</u>
SPAG5	UBE2c	THY1	<u>97,3 %</u>
CDC2	CHGA	BIRC5	<u>97,9 %</u>
SPAG5	MGP	MDK	<u>98,3 %</u>
SPAG5	ENG	SMC4L1	<u>98,1 %</u>
SPAG5	ENG	MGP	<u>98,2 %</u>

Figura 14a (cont.)

<b>Combinación de tres marcadores (cont.)</b>			
<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
SPAG5	ENG	MDK	<b><u>98,2 %</u></b>
TOP2a	BIRC5	THY1	<b><u>96,8 %</u></b>
TOP2a	SEM2	HOXA13	<b><u>97,8 %</u></b>
TOP2a	EGF L6	SMC4L1	<b><u>97,8 %</u></b>
SPAG5	UBE2c	SMC4L1	<b><u>97,8 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	SEM2	<b><u>98,0 %</u></b>
CDC2	CHGA	HOXA13	<b><u>98,1 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	MGP	<b><u>98,0 %</u></b>
SPAG5	MGP	UBE2c	<b><u>98,0 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	MDK	<b><u>98,0 %</u></b>
SPAG5	UBE2c	MDK	<b><u>98,1 %</u></b>
TOP2a	HOXA13	THY1	<b><u>97,0 %</u></b>
TOP2a	BIRC5	SMC4L1	<b><u>97,4 %</u></b>
TOP2a	ENG	EGFL6	<b><u>97,9 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	THY1	<b><u>97,3 %</u></b>
SPAG5	ENG	UBE2c	<b><u>97,9 %</u></b>
SPAG5	SEM2	BIRC5	<b><u>97,6 %</u></b>
TOP2a	MGP	BIRC5	<b><u>97,6 %</u></b>
CDC2	SEM2	THY1	<b><u>96,6 %</u></b>
TOP2a	BIRC5	MDK	<b><u>97,6 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	UBE2c	<b><u>97,6 %</u></b>
TOP2a	ENG	BIRC5	<b><u>97,4 %</u></b>
TOP2a	HOXA13	SMC4L1	<b><u>97,5 %</u></b>
SPAG5	BIRC5	THY1	<b><u>96,8 %</u></b>
SPAG5	SEM2	HOXA13	<b><u>97,8 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	SMC4L1	<b><u>97,8 %</u></b>
TOP2a	MGP	HOXA13	<b><u>97,7 %</u></b>
CDC2	SEM2	SMC4L1	<b><u>97,2 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	MGP	<b><u>98,0 %</u></b>
TOP2a	HOXA13	MDK	<b><u>97,8 %</u></b>
SPAG5	EGFL6	MDK	<b><u>98,0 %</u></b>
CDC2	MGP	SEM2	<b><u>97,4 %</u></b>
TOP2a	BIRC5	UBE2c	<b><u>97,2 %</u></b>
TOP2a	ENG	HOXA13	<b><u>97,6 %</u></b>
SPAG5	HOXA13	THY1	<b><u>97,0 %</u></b>
CDC2	SEM2	MDK	<b><u>97,5 %</u></b>
SPAG5	BIRC5	SMC4L1	<b><u>97,4 %</u></b>
SPAG5	ENG	EGFL6	<b><u>97,9 %</u></b>
CDC2	THY1	SMC4L1	<b><u>96,2 %</u></b>
CDC2	ENG	SEM2	<b><u>97,3 %</u></b>
SPAG5	MGP	BIRC5	<b><u>97,6 %</u></b>

Figura 14a (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
SPAG5	BIRC5	MDK	<u>97,6 %</u>
CDC2	MGP	THY1	<u>96,4 %</u>
TOP2a	UBE2c	HOXA13	<u>97,4 %</u>
CDC2	MDK	THY1	<u>96,5 %</u>
SPAG5	EGFL6	UBE2c	<u>97,6 %</u>
SPAG5	ENG	BIRC5	<u>97,4 %</u>
SPAG5	HOXA13	SMC4L1	<u>97,5 %</u>
CDC2	SEM2	UBE2c	<u>97,0 %</u>
CDC2	ENG	THY1	<u>96,3 %</u>
SPAG5	MGP	HOXA13	<u>97,7 %</u>
SPAG5	HOXA13	MDK	<u>97,8 %</u>
CDC2	MGP	SMC4L1	<u>97,1 %</u>
TOP2a	EGFL6	BIRC5	<u>97,1 %</u>
SPAG5	BIRC5	UBE2c	<u>97,2 %</u>
CDC2	MDK	SMC4L1	<u>97,2 %</u>
SPAG5	ENG	HOXA13	<u>97,6 %</u>
CDC2	UBE2c	THY1	<u>95,9 %</u>
CDC2	MGP	MDK	<u>97,4 %</u>
CDC2	ENG	SMC4L1	<u>97,0 %</u>
CDC2	ENG	MGP	<u>97,2 %</u>
TOP2a	EGFL6	HOXA13	<u>97,3 %</u>
SPAG5	UBE2c	HOXA13	<u>97,3 %</u>
CDC2	ENG	MDK	<u>97,3 %</u>
CDC2	UBE2c	SMC4L1	<u>96,6 %</u>
CDC2	EGFL6	SEM2	<u>96,9 %</u>
CDC2	MGP	UBE2c	<u>96,9 %</u>
TOP2a	BIRC5	HOXA13	<u>96,8 %</u>
CDC2	UBE2c	MDK	<u>97,0 %</u>
SPAG5	EGFL6	BIRC5	<u>97,1 %</u>
CDC2	EGFL6	THY1	<u>95,8 %</u>
CDC2	ENG	UBE2c	<u>96,7 %</u>
CDC2	SEM2	BIRC5	<u>96,3 %</u>
SPAG5	EGFL6	HOXA13	<u>97,3 %</u>
CDC2	BIRC5	THY1	<u>95,0 %</u>
CDC2	SEM2	HOXA13	<u>96,6 %</u>
CDC2	EGFL6	SMC4L1	<u>96,6 %</u>
CDC2	EGFL6	MGP	<u>96,8 %</u>
CDC2	EGFL6	MDK	<u>96,9 %</u>
SPAG5	BIRC5	HOXA13	<u>96,8 %</u>
CDC2	HOXA13	THY1	<u>95,3 %</u>
CDC2	BIRC5	SMC4L1	<u>95,9 %</u>

Figura 14a (cont.)

**Marcador único**

<b>Marcador</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	<u>84,5 %</u>
CHGA	<u>63,7 %</u>
NRP1	<u>66,9 %</u>
ENG	<u>62,2 %</u>
SPAG5	<u>64,8 %</u>
SEM2	<u>71,0 %</u>
MDK	<u>43,4 %</u>
HOXA13	<u>56,8 %</u>
IGFBP5	<u>44,4 %</u>
SEMA3F	<u>39,7 %</u>
EGFL6	<u>40,6 %</u>
SMC4L1	<u>35,8 %</u>
NOV	<u>26,6 %</u>
UBE2c	<u>26,8 %</u>
BIRC5	<u>18,8 %</u>
THY1	<u>30,9 %</u>

**Combinación de dos marcadores**      **Sensibilidad**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	TOP2a	<u>95,4 %</u>
TOP2a	SEM2	<u>91,2 %</u>
CDC2	SEM2	<u>90,7 %</u>
TOP2a	NRP1	<u>91,9 %</u>
TOP2a	SPAG5	<u>91,2 %</u>
TOP2a	CHGA	<u>92,2 %</u>
CDC2	NRP1	<u>91,5 %</u>
TOP2a	ENG	<u>90,9 %</u>
CDC2	SPAG5	<u>90,7 %</u>
CDC2	CHGA	<u>91,8 %</u>
CDC2	ENG	<u>90,4 %</u>

**Combinación de tres marcadores**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	TOP2a	CHGA	<u>97,8 %</u>
CDC2	TOP2a	NRP1	<u>97,5 %</u>
CDC2	TOP2a	SPAG5	<u>97,3 %</u>
CDC2	TOP2a	ENG	<u>97,2 %</u>
CDC2	TOP2a	SEM2	<u>97,0 %</u>
HOXA13	CDC2	TOP2a	<u>96,6 %</u>

Figura 14b

<b>Combinación de tres marcadores (cont.)</b>			
<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	ENG	EGFL6	<b><u>96,7 %</u></b>
CDC2	MGP	BIRC5	<b><u>96,2 %</u></b>
CDC2	BIRC5	MDK	<b><u>96,3 %</u></b>
CDC2	EGFL6	UBE2c	<b><u>96,3 %</u></b>
CDC2	ENG	BIRC5	<b><u>96,0 %</u></b>
CDC2	HOXA13	SMC4L1	<b><u>96,2 %</u></b>
CDC2	MGP	HOXA13	<b><u>96,4 %</u></b>
CDC2	HOXA13	MDK	<b><u>96,5 %</u></b>
CDC2	BIRC5	UBE2c	<b><u>95,6 %</u></b>
CDC2	ENG	HOXA13	<b><u>96,3 %</u></b>
CDC2	UBE2c	HOXA13	<b><u>95,9 %</u></b>
CDC2	EGFL6	BIRC5	<b><u>95,5 %</u></b>
CDC2	EGFL6	HOXA13	<b><u>95,8 %</u></b>
CDC2	BIRC5	HOXA13	<b><u>95,0 %</u></b>
NRP1	SEM2	CHGA	<b><u>94,6 %</u></b>
NRP1	CHGA	THY1	<b><u>92,6 %</u></b>
NRP1	CHGA	SMC4L1	<b><u>94,0 %</u></b>
NRP1	MGP	CHGA	<b><u>94,4 %</u></b>
NRP1	CHGA	MDK	<b><u>94,6 %</u></b>
ENG	NRP1	CHGA	<b><u>94,1 %</u></b>
NRP1	CHGA	UBE2c	<b><u>93,5 %</u></b>
NRP1	EGFL6	CHGA	<b><u>93,4 %</u></b>
NRP1	CHGA	BIRC5	<b><u>92,1 %</u></b>
NRP1	CHGA	HOXA13	<b><u>92,6 %</u></b>
NRP1	SEM2	THY1	<b><u>86,8 %</u></b>
NRP1	SEM2	SMC4L1	<b><u>89,3 %</u></b>
NRP1	MGP	SEM2	<b><u>90,0 %</u></b>
NRP1	SEM2	MDK	<b><u>90,3 %</u></b>

Figura 14a (cont.)



**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	TOP2a	MDK	<u>96,4 %</u>
CDC2	TOP2a	IGFBP5	<u>96,3 %</u>
TOP2a	NRP1	CHGA	<u>96,2 %</u>
CDC2	TOP2a	SEMA3F	<u>96,1 %</u>
CDC2	NRP1	CHGA	<u>96,1 %</u>
CDC2	TOP2a	EGFL6	<u>95,8 %</u>
TOP2a	SPAG5	CHGA	<u>95,8 %</u>
TOP2a	ENG	CHGA	<u>95,7 %</u>
CDC2	SPAG5	CHGA	<u>95,6 %</u>
CDC2	ENG	CHGA	<u>95,6 %</u>
CDC2	TOP2a	SMC4L1	<u>95,4 %</u>
TOP2a	SEM2	CHGA	<u>95,4 %</u>
TOP2a	NRP1	SPAG5	<u>95,3 %</u>
CDC2	SEM2	CHGA	<u>95,3 %</u>
TOP2a	NRP1	ENG	<u>95,2 %</u>
CDC2	NRP1	SPAG5	<u>95,2 %</u>
CDC2	NRP1	ENG	<u>95,1 %</u>
TOP2a	NRP1	SEM2	<u>94,9 %</u>
CDC2	TOP2a	NOV	<u>94,9 %</u>
CDC2	NRP1	SEM2	<u>94,8 %</u>
UBE2c	CDC2	TOP2a	<u>94,8 %</u>
TOP2a	ENG	SPAG5	<u>94,7 %</u>
HOXA13	TOP2a	CHGA	<u>94,7 %</u>
CDC2	ENG	SPAG5	<u>94,6 %</u>
CDC2	TOP2a	THY1	<u>94,6 %</u>
HOXA13	CDC2	CHGA	<u>94,5 %</u>
BIRC5	CDC2	TOP2a	<u>94,5 %</u>
TOP2a	SPAG5	SEM2	<u>94,4 %</u>
TOP2a	MDK	CHGA	<u>94,4 %</u>
TOP2a	ENG	SEM2	<u>94,3 %</u>
CDC2	SPAG5	SEM2	<u>94,3 %</u>
TOP2a	IGFBP5	CHGA	<u>94,2 %</u>
CDC2	MDK	CHGA	<u>94,2 %</u>
CDC2	ENG	SEM2	<u>94,2 %</u>
HOXA13	TOP2a	NRP1	<u>94,1 %</u>
CDC2	IGFBP5	CHGA	<u>94,1 %</u>
HOXA13	CDC2	NRP1	<u>94,0 %</u>
TOP2a	SEMA3F	CHGA	<u>93,9 %</u>
TOP2a	NRP1	MDK	<u>93,8 %</u>
CDC2	SEMA3F	CHGA	<u>93,7 %</u>
TOP2a	NRP1	IGFBP5	<u>93,6 %</u>

Figura 14b (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
CDC2	NRP1	MDK	<b><u>93,6 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	SPAG5	<b><u>93,5 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	CHGA	<b><u>93,5 %</u></b>
CDC2	NRP1	IGFBP5	<b><u>93,4 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	ENG	<b><u>93,4 %</u></b>
HOXA13	CDC2	SPAG5	<b><u>93,3 %</u></b>
CDC2	EGFL6	CHGA	<b><u>93,3 %</u></b>
TOP2a	NRP1	SEMA3F	<b><u>93,3 %</u></b>
HOXA13	CDC2	ENG	<b><u>93,3 %</u></b>
TOP2a	SPAG5	MDK	<b><u>93,1 %</u></b>
CDC2	NRP1	SEMA3F	<b><u>93,1 %</u></b>
TOP2a	ENG	MDK	<b><u>93,0 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	SEM2	<b><u>93,0 %</u></b>
TOP2a	SPAG5	IGFBP5	<b><u>92,9 %</u></b>
TOP2a	SMC4L1	CHGA	<b><u>92,9 %</u></b>
CDC2	SPAG5	MDK	<b><u>92,9 %</u></b>
TOP2a	ENG	IGFBP5	<b><u>92,9 %</u></b>
CDC2	ENG	MDK	<b><u>92,8 %</u></b>
HOXA13	CDC2	SEM2	<b><u>92,8 %</u></b>
TOP2a	NRP1	EGFL6	<b><u>92,8 %</u></b>
CDC2	SPAG5	IGFBP5	<b><u>92,7 %</u></b>
CDC2	SMC4L1	CHGA	<b><u>92,7 %</u></b>
CDC2	ENG	IGFBP5	<b><u>92,7 %</u></b>
CDC2	NRP1	EGFL6	<b><u>92,6 %</u></b>
TOP2a	SEM2	MDK	<b><u>92,6 %</u></b>
TOP2a	SPAG5	SEMA3F	<b><u>92,6 %</u></b>
NRP1	SPAG5	CHGA	<b><u>92,5 %</u></b>
TOP2a	ENG	SEMA3F	<b><u>92,5 %</u></b>
NRP1	ENG	CHGA	<b><u>92,5 %</u></b>
TOP2a	SEM2	IGFBP5	<b><u>92,4 %</u></b>
CDC2	SEM2	MDK	<b><u>92,4 %</u></b>
CDC2	SPAG5	SEMA3F	<b><u>92,4 %</u></b>
CDC2	ENG	SEMA3F	<b><u>92,3 %</u></b>
TOP2a	NRP1	SMC4L1	<b><u>92,2 %</u></b>
CDC2	SEM2	IGFBP5	<b><u>92,2 %</u></b>
TOP2a	NOV	CHGA	<b><u>92,1 %</u></b>
TOP2a	SPAG5	EGFL6	<b><u>92,0 %</u></b>
TOP2a	SEM2	SEMA3F	<b><u>92,0 %</u></b>
CDC2	NRP1	SMC4L1	<b><u>92,0 %</u></b>
NRP1	SEM2	CHGA	<b><u>92,0 %</u></b>
UBE2c	TOP2a	CHGA	<b><u>91,9 %</u></b>

Figura 14b (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
TOP2a	ENG	EGFL6	<b><u>91,9 %</u></b>
CDC2	NOV	CHGA	<b><u>91,9 %</u></b>
CDC2	SPAG5	EGFL6	<b><u>91,8 %</u></b>
CDC2	SEM2	SEMA3F	<b><u>91,8 %</u></b>
UBE2c	CDC2	CHGA	<b><u>91,7 %</u></b>
CDC2	ENG	EGFL6	<b><u>91,7 %</u></b>
ENG	SPAG5	CHGA	<b><u>91,7 %</u></b>
TOP2a	THY1	CHGA	<b><u>91,6 %</u></b>
BIRC5	THY1	CHGA	<b><u>91,5 %</u></b>
TOP2a	EGFL6	SEM2	<b><u>91,4 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	MDK	<b><u>91,4 %</u></b>
TOP2a	SPAG5	SMC4L1	<b><u>91,4 %</u></b>
CDC2	THY1	CHGA	<b><u>91,3 %</u></b>
TOP2a	NRP1	NOV	<b><u>91,3 %</u></b>
TOP2a	ENG	SMC4L1	<b><u>91,3 %</u></b>
BIRC5	CDC2	CHGA	<b><u>91,2 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	IGFBP5	<b><u>91,2 %</u></b>
CDC2	EGFL6	SEM2	<b><u>91,2 %</u></b>
HOXA13	CDC2	MDK	<b><u>91,2 %</u></b>
CDC2	SPAG5	SMC4L1	<b><u>91,1 %</u></b>
SPAG5	SEM2	CHGA	<b><u>91,1 %</u></b>
UBE2c	TOP2a	NRP1	<b><u>91,1 %</u></b>
CDC2	NRP1	NOV	<b><u>91,0 %</u></b>
CDC2	ENG	SMC4L1	<b><u>91,0 %</u></b>
ENG	SEM2	CHGA	<b><u>91,0 %</u></b>
HOXA13	CDC2	IGFBP5	<b><u>90,9 %</u></b>
UBE2c	CDC2	NRP1	<b><u>90,9 %</u></b>
NRP1	ENG	SPAG5	<b><u>90,8 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	SEMA3F	<b><u>90,7 %</u></b>
TOP2a	SEM2	SMC4L1	<b><u>90,7 %</u></b>
TOP2a	NRP1	THY1	<b><u>90,7 %</u></b>
HOXA13	NRP1	CHGA	<b><u>90,7 %</u></b>
TOP2a	MDK	IGFBP5	<b><u>90,6 %</u></b>
BIRC5	TOP2a	NRP1	<b><u>90,6 %</u></b>
HOXA13	CDC2	SEMA3F	<b><u>90,5 %</u></b>
CDC2	SEM2	SMC4L1	<b><u>90,4 %</u></b>
CDC2	NRP1	THY1	<b><u>90,4 %</u></b>
CDC2	MDK	IGFBP5	<b><u>90,4 %</u></b>
TOP2a	NOV	SPAG5	<b><u>90,4 %</u></b>
BIRC5	CDC2	NRP1	<b><u>90,3 %</u></b>
TOP2a	ENG	NOV	<b><u>90,2 %</u></b>

Figura 14b (cont.)

**Combinación de tres marcadores (cont.)**

<b>Marcador 1</b>	<b>Marcador 2</b>	<b>Marcador 3</b>	<b>Sensibilidad</b>
NRP1	SPAG5	SEM2	<b><u>90,2 %</u></b>
UBE2c	TOP2a	SPAG5	<b><u>90,2 %</u></b>
TOP2a	MDK	SEMA3F	<b><u>90,1 %</u></b>
NRP1	MDK	CHGA	<b><u>90,1 %</u></b>
CDC2	NOV	SPAG5	<b><u>90,1 %</u></b>
NRP1	ENG	SEM2	<b><u>90,1 %</u></b>
HOXA13	TOP2a	EGFL6	<b><u>90,0 %</u></b>
UBE2c	TOP2a	ENG	<b><u>90,0 %</u></b>
CDC2	ENG	NOV	<b><u>90,0 %</u></b>

Figura 14b (cont.)

Número de marcadores en la prueba	Total de pruebas posibles	Número de pruebas con sensibilidad			Proporción de pruebas con sensibilidad			
		>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %	>= 90 %	>= 95 %	>= 99 %	
1	9	1	1	1	0	11 %	11 %	0 %
2	36	15	8	2	2	42 %	22 %	6 %
3	84	59	37	13	13	70 %	44 %	16 %

Figura 15

**Marcador único**

Marcador	Sensibilidad (%)
IGFBP5	98
HoxA13	85
Sema3F	80
UBE2c	42
NRP1	37
Top2a	74
SMC4L1	34
MDK	79
MGP	70

**Combinaciones de dos marcadores**

Marcador 1	Marcador 2	Sensibilidad (%)
IGFBP5	HoxA13	99,2
IGFBP5	Sema3F	99,0
IGFBP5	MDK	98,9
IGFBP5	Top2a	98,9
IGFBP5	MGP	98,6
IGFBP5	UBE2c	97,5
IGFBP5	NRP1	97,3
IGFBP5	SMC4L1	97,2
HoxA13	Sema3F	94,0
HoxA13	MDK	93,5
HoxA13	Top2a	93,1
Sema3F	MDK	92,2
Sema3F	Top2a	91,7
HoxA13	MGP	91,3
Top2a	MDK	91,0

**Combinaciones de tres marcadores**

Marcador 1	Marcador 2	Marcador 3	Sensibilidad (%)
IGFBP5	HoxA13	Sema3F	99,6
IGFBP5	HoxA13	Top2a	99,6
IGFBP5	HoxA13	MDK	99,6
IGFBP5	Sema3F	Top2a	99,5
IGFBP5	Sema3F	MDK	99,5

Figura 16

## Combinaciones de tres marcadores (cont.)

Marcador 1	Marcador 1	Marcador 1	Sensibilidad (%)
IGFBP5	Top2a	MDK	99,5
IGFBP5	HoxA13	MGP	99,5
IGFBP5	Sema3F	MGP	99,4
IGFBP5	Top2a	MGP	99,3
IGFBP5	MDK	MGP	99,3
IGFBP5	HoxA13	UBE2c	99,1
IGFBP5	HoxA13	NRP1	99,0
IGFBP5	HoxA13	SMC4L1	99,0
IGFBP5	Sema3F	UBE2c	99,0
IGFBP5	UBE2c	Top2a	98,9
IGFBP5	Sema3F	NRP1	98,9
IGFBP5	UBE2c	MDK	98,9
IGFBP5	Sema3F	SMC4L1	98,9
IGFBP5	NRP1	Top2a	98,8
IGFBP5	NRP1	MDK	98,8
IGFBP5	Top2a	SMC4L1	98,8
IGFBP5	SMC4L1	MDK	98,8
IGFBP5	UBE2c	MGP	98,5
IGFBP5	NRP1	MGP	98,4
IGFBP5	SMC4L1	MGP	98,4
IGFBP5	UBE2c	NRP1	97,3
IGFBP5	UBE2c	SMC4L1	97,3
HoxA13	Sema3F	Top2a	97,2
HoxA13	Sema3F	MDK	97,2
IGFBP5	NRP1	SMC4L1	97,1
HoxA13	Top2a	MDK	97,0
Sema3F	Top2a	MDK	96,5
HoxA13	Sema3F	MGP	96,3
HoxA13	Top2a	MGP	96,0
HoxA13	MDK	MGP	96,0
Sema3F	Top2a	MGP	95,3
Sema3F	MDK	MGP	95,3
Top2a	MDK	MGP	94,9
HoxA13	Sema3F	UBE2c	93,9
HoxA13	UBE2c	Top2a	93,4
HoxA13	Sema3F	NRP1	93,4
HoxA13	UBE2c	MDK	93,3
HoxA13	Sema3F	SMC4L1	93,3
HoxA13	NRP1	Top2a	92,8

Figura 16 (cont.)

ES 2 540 108 T3

HoxA13	NRP1	MDK	92,7
HoxA13	Top2a	SMC4L1	92,7
HoxA13	SMC4L1	MDK	92,7
Sema3F	UBE2c	Top2a	92,3
Sema3F	UBE2c	MDK	92,3
Sema3F	NRP1	Top2a	91,6
UBE2c	Top2a	MDK	91,6
Sema3F	NRP1	MDK	91,6
Sema3F	Top2a	SMC4L1	91,6
Sema3F	SMC4L1	MDK	91,6
HoxA13	UBE2c	MGP	91,2
NRP1	Top2a	MDK	90,9
Top2a	SMC4L1	MDK	90,8
HpxAI 3	NRP1	MGP	90,4
HoxA13	SMC4L1	MGP	90,4



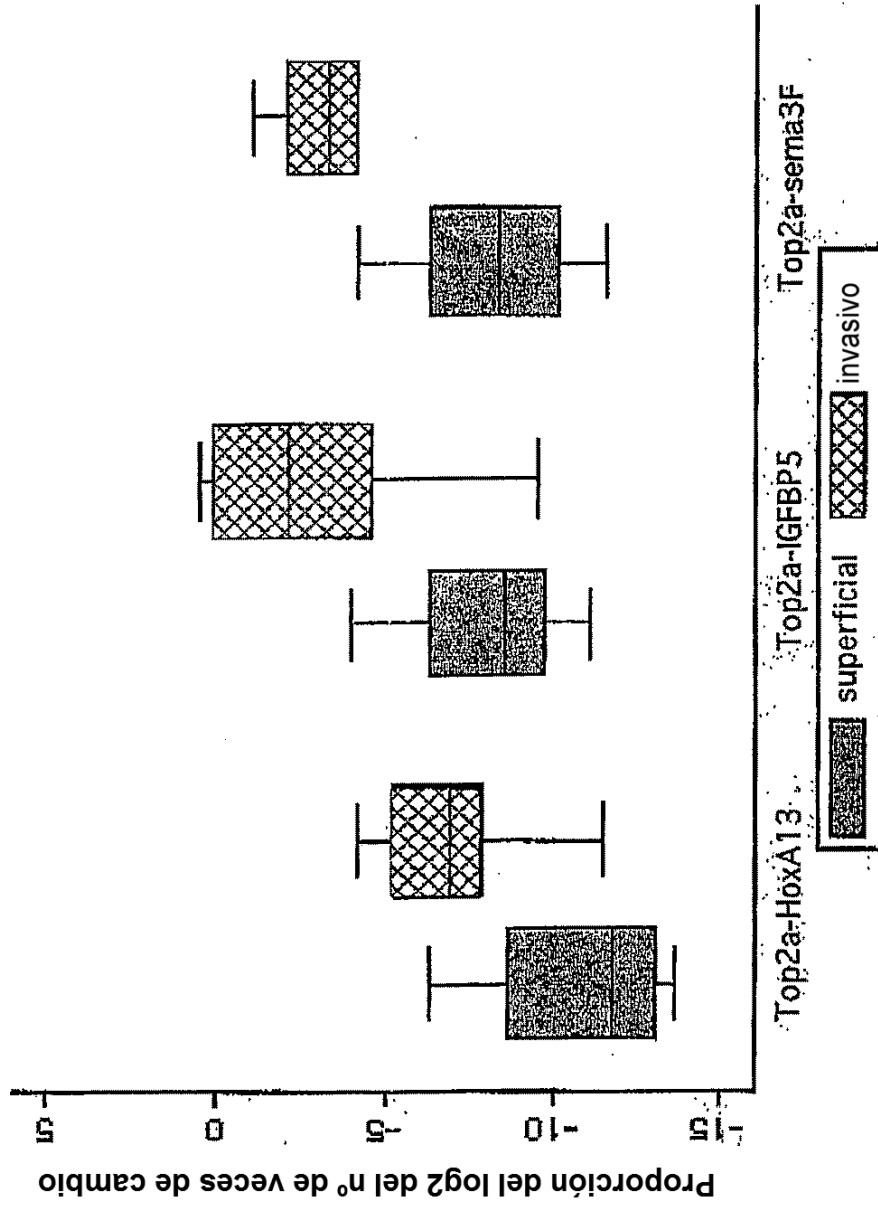


Figura 17

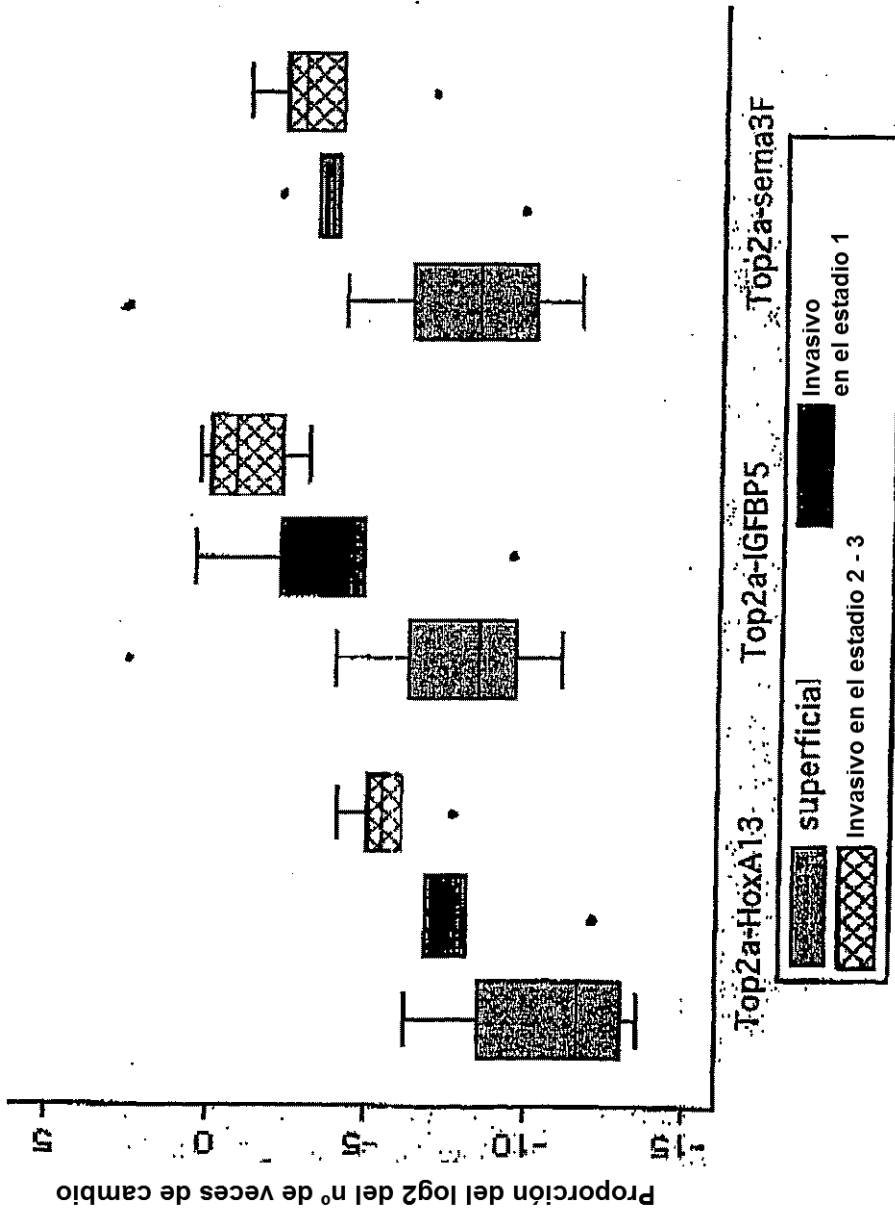


Figura 18

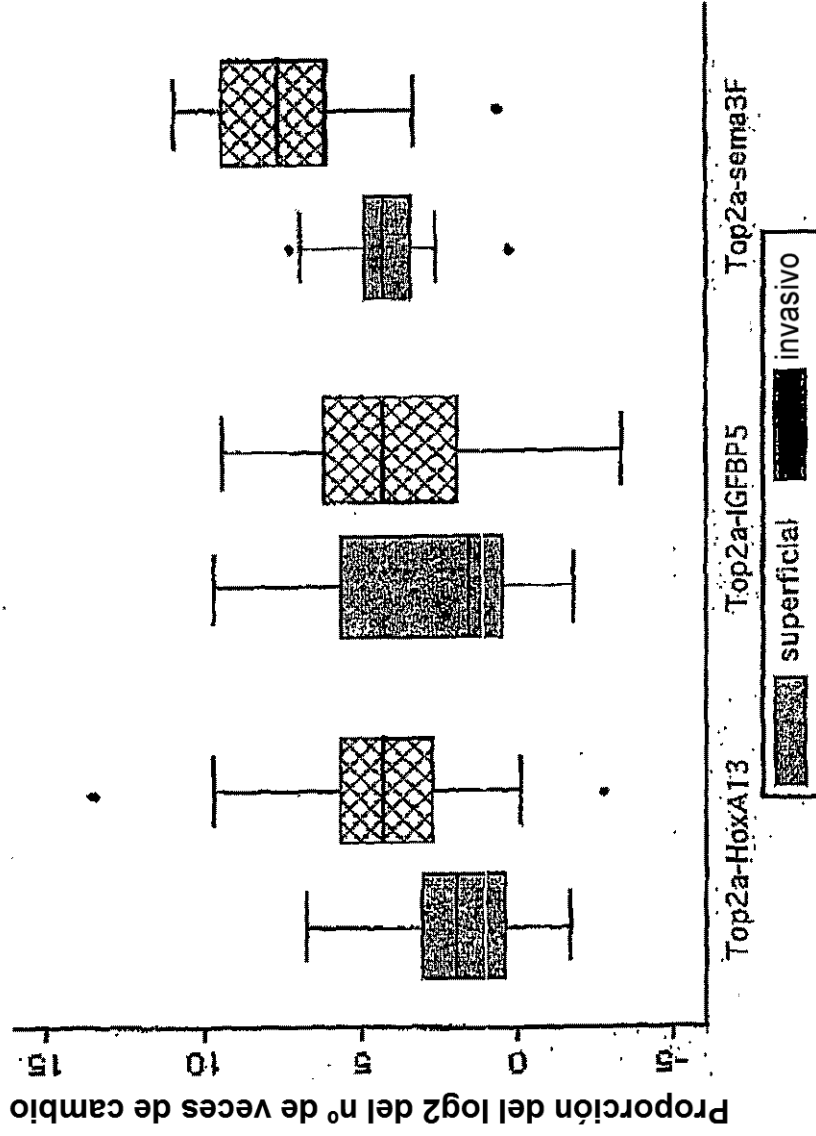


Figura 19

Niveles del marcador en la orina de pacientes con TCC y de controles

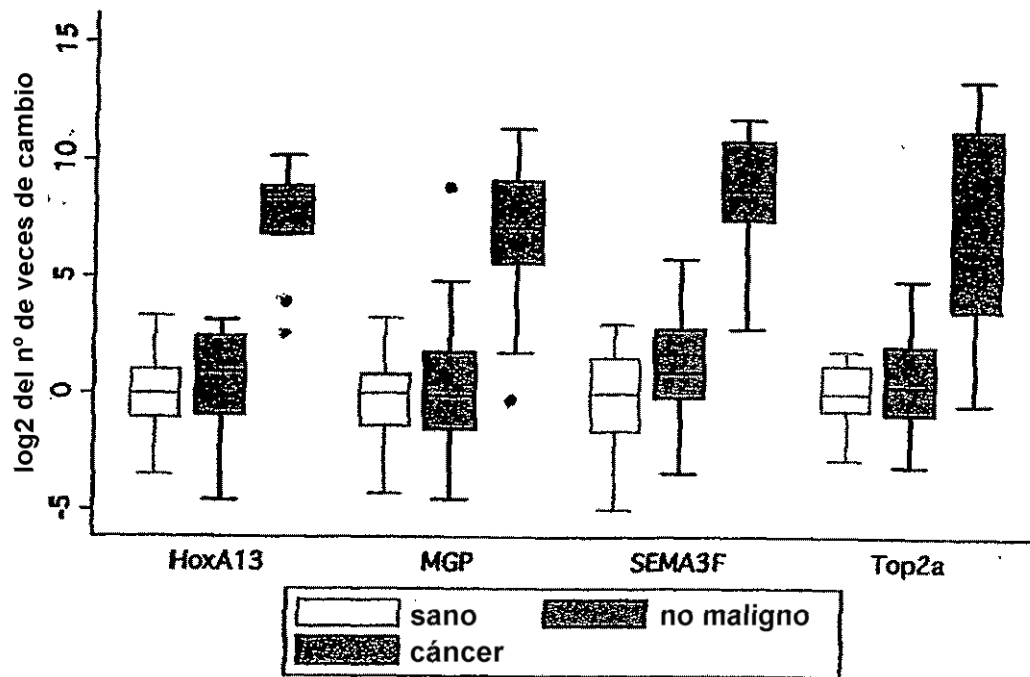


Figura 20

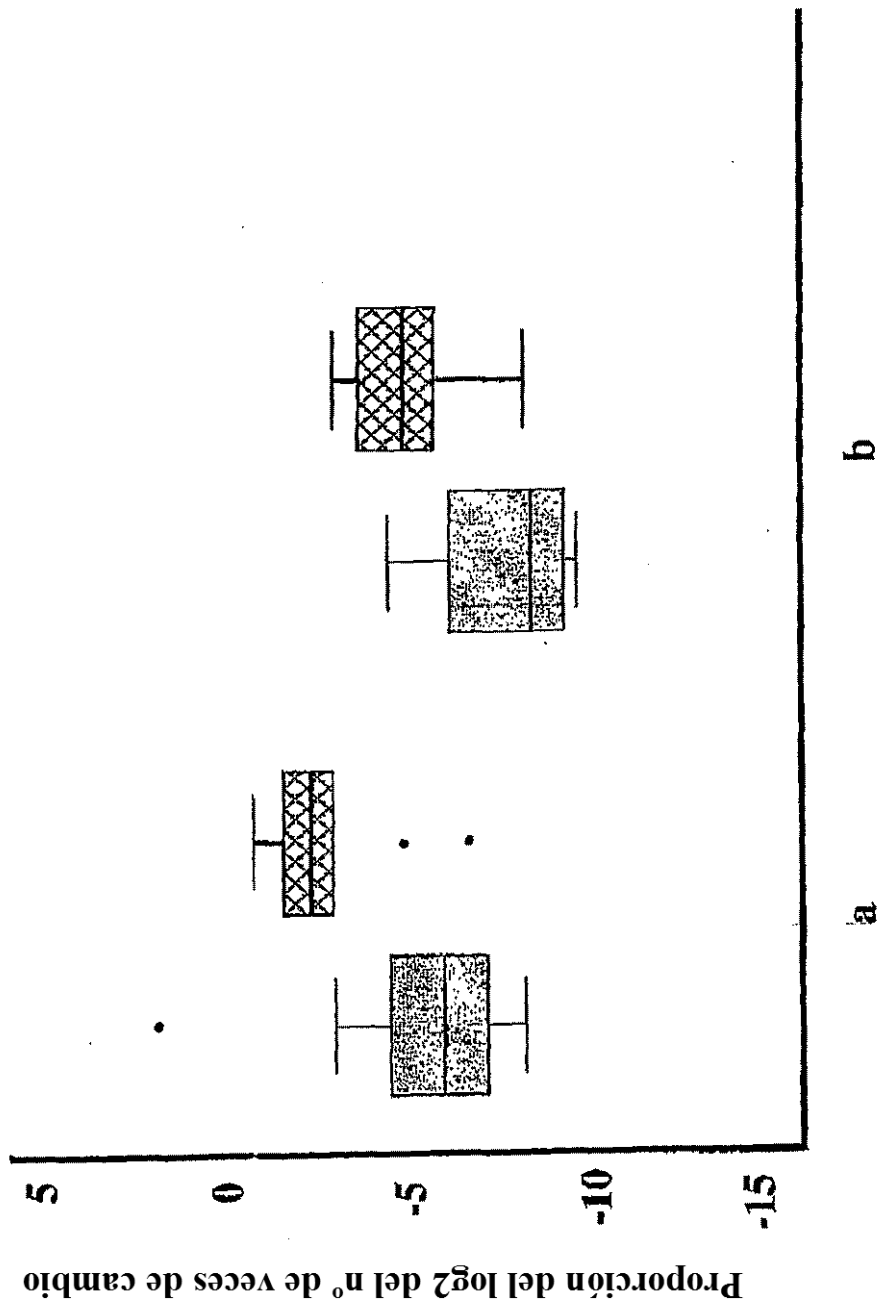


Figura 21

### REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

#### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20040038207 A [0008]
- US 6335170 B [0105]
- NZ 534289 [0156]
- NZ 539219 [0156]
- US 60692619 B [0156]

#### Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **LOTAN ; ROEHRBORN.** *Urology*, 2003, vol. 61, 109-118 [0002]
- **SAMBROOK, J. ; E FRITSCH, E ; T MANIATIS.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0040]
- **NOLTE, F.S.** Branched DNA signal amplification for direct quantitation of nucleic acid sequences in clinical specimens. *Adv. Clin. Chem.*, 1998, vol. 33, 201-35 [0040]
- **HAUKANES, B-I ; KVAM, C.** Application of magnetic beads in bioassays. *BioTechnology*, 1993, vol. 11, 60-63 [0040]
- **SPIRO, A. ; LOWE, M. ; BROWN, D.** A Bead-Based Method for Multiplexed Identification and Quantitation of DNA Sequences Using Flow Cytometry. *Appl. Env. Micro.*, 2000, vol. 66, 4258-4265 [0040]
- **SAMBROOK, J. ; E FRITSCH, E. ; T MANIATIS.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0043]
- **CROWTHER, J.R.** *The ELISA guidebook*. Humana Press, 2000 [0045]
- **HARLOW, E. ; LANE, D.** *Using antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0045] [0048] [0050]
- **HUST M. ; DUBEL S.** Phage display vectors for the in vitro generation of human antibody fragments. *Methods Mol Biol.*, 2005, vol. 295, 71-96 [0045]
- **EMANUELSSON et al.** *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 300, 1005-1006 [0105]