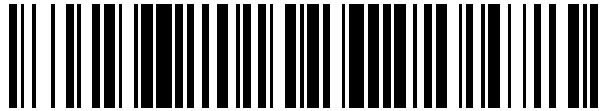


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 455**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2009 E 09753215 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2356252**

54 Título: **Método para la detección urinaria de cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

**13.11.2008 FR 0857707
23.12.2008 US 140277 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2015

73 Titular/es:

**ARRAY GENOMICS (100.0%)
30 Avenue Robert Surcouf
78960 Voisins Le Bretonneux, FR**

72 Inventor/es:

**CUSSENOT, OLIVIER;
JONES, IAN;
METERS, NEIL y
LOZACH, FRANÇOIS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 549 455 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección urinaria de cáncer de vejiga

La invención se refiere al diagnóstico de cáncer de vejiga y más particularmente a la detección urinaria del tipo transicional de carcinoma de vejiga (TCC: carcinoma de células transicionales).

- 5 Los carcinomas del tipo transicional se encuentran en tumores de epitelio transicional, que comprenden aproximadamente el 70% a 90% de los tumores de vejiga epitelial. Se caracterizan por su gran variabilidad morfológica, de manera que su pronóstico es a veces difícil de predecir.

10 En términos de histología, los tumores uroteliales pueden ser papilares o no papilares, de malignidad alta o baja (grado histológico), infiltrantes o no infiltrantes, siendo cada lesión los resultados combinados de estas tres características morfológicas.

15 Existen varias clasificaciones para los tumores uroteliales de la vejiga. La clasificación usada más comúnmente hasta el momento ha sido la de la OMS, que existe desde 1974. Clasificaba los cánceres transicionales del epitelio como benigno (papiloma exofítico, papiloma invertido) o maligno (carcinomas epiteliales transicionales de grados 1, 2 y 3). En 1998, después de varias reuniones que implicaban a patólogos anatómicos, urólogos, oncólogos y biólogos, se estableció y validó una clasificación consensuada de tumores uroteliales. Es esta nueva clasificación (Epstein J.I., *Am. J. Surg. Pathol.* (1998), 22: 1435-1448) la que se usa actualmente. Aunque sólo es ligeramente diferente a la clasificación previa de la OMS, tiene la ventaja de una mayor concordancia con la biología y el potencial evolutivo de los tumores uroteliales.

20 Según esta clasificación, los tumores de vejiga se clasifican por "grado", de G1 a G3, según diferentes criterios citomorfológicos. Cuanto mayor es el grado, menos diferenciada es la apariencia de las células y más agresivos son.

Los tumores también se clasifican según sus características superficiales (pTa y T1) o capacidad de invasión en el músculo (de T2 a T4). Los tumores de grado bajo son generalmente no invasivos o se han infiltrado en las capas superficiales (estadios Ta y T1), mientras los tumores de grado alto son más agresivos y frecuentemente se detectan en T1 o un estadio más avanzado.

25 La determinación del grado de las células tumorales tiene una importancia crítica para el médico, ya que ayudará a decidir qué métodos terapéuticos deben usarse.

30 Mientras la presencia de tumores invasivos de grado 3 requiere la ablación total de la vejiga y sus glándulas auxiliares, la mayor parte de los tumores de grado/estadio bajo (Ta y T1) pueden tratarse generalmente localmente permaneciendo el órgano intacto, mediante diferentes estrategias terapéuticas tales como quimioterapia, inmunoterapia o terapia BCG.

35 Los pacientes que padecen un tumor de grado bajo, no invasivo, tienen generalmente un buen pronóstico, pero tienen que someterse a un seguimiento periódico ya que el riesgo de recaída del cáncer es del orden de 70%. Consecuentemente, los pacientes deben monitorizarse de una manera regular después del tratamiento, cada tres meses durante los primeros dos años, y cada seis meses posteriormente, y en el caso de una recaída es muy importante monitorizar la progresión de los tumores.

Además, los tumores de grado bajo Ta invaden el músculo sólo en el 10-15% de los casos, mientras los tumores T1 progresan a grado T2 en el 30-35% de los casos. Los tumores de grado alto progresan más rápidamente, alcanzando los pacientes rápidamente el grado T2, y formándose metástasis remotas frecuentemente durante el curso de los dos años siguientes.

40 Actualmente, sólo los exámenes clínicos invasivos, en otras palabras que implican biopsia, visualización endoscópica directa de los tumores, o cirugía, pueden permitir establecer un diagnóstico fiable del grado de las células tumorales, y la implementación de una terapia apropiada.

45 Aún así, algunas veces la endoscopia no es fiable y es difícil de interpretar. Respecto a la citología después de una biopsia, varios estudios muestran que su fiabilidad es mediocre, lo que resulta en la detección fallida del 50% de los tumores (Boman, H., *et al.*, 2002, *J. Urol.*, 167(1): 80-83).

Debido a la alta prevalencia del cáncer de vejiga en la población, en particular en personas mayores de 50, y con el objetivo de mejorar tanto el diagnóstico como el confort de los pacientes, se han dedicado esfuerzos en investigación considerables para el desarrollo de una detección indirecta no invasiva del cáncer de vejiga.

50 A este respecto, varios equipos de investigación han intentado detectar tumores urológicos mediante muestras urinarias usando proteínas marcadoras de tumor convencionales.

Sin embargo, hasta ahora, se ha encontrado que la detección de estas proteínas no es suficientemente específica para ser fiable respecto al origen de las proteínas y el estadio del desarrollo de los tumores.

En 1999, un equipo americano describió la posibilidad de seguir la progresión del cáncer de vejiga analizando secuencias de ADN microsatélite contenidas en la orina (Steiner *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 621-624). Este método de detección, que consiste en amplificar y medir la variabilidad de algunas secuencias repetidas de ADN mitocondrial no codificadoras, se basa en la observación de que estas secuencias están alteradas generalmente en las células de carcinoma.

Sin embargo, esta técnica no es completamente satisfactoria, en tanto que no permite efectivamente determinar el grado de los tumores.

Otros métodos moleculares se basan en métodos de PCR, que intentan amplificar o detectar marcadores genéticos, tales como mutaciones locales en genes supresores de tumores, aplicados a los ADN presentes en la orina de los pacientes. Sin embargo, estos métodos requieren iniciadores específicos que comprenden 20 a 40 nucleótidos, que no son fáciles de desarrollar, a la vista del tamaño y variabilidad del genoma humano. Además, tan pronto como el ADN de las células tumorales se mezcla en la orina con los ADN de las células sanas, la amplificación deseada se enmascara con la causada por los últimos.

La hibridación genómica comparativa basada en micromatriz (CGH en micromatriz) es un método que se ha usado para identificar marcadores genéticos asociados con determinadas patologías. Snijders *et al.* [Snijders *et al.* (2001) "Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number" *Nature Genetics*, (29)] describen la matriz HumArray 1.14 que contiene 2.460 clones BAC y PI que abarcan el genoma humano.

Las estrategias de hibridación genómica comparativa basada en micromatriz se usaron en primer lugar para identificar algunos marcadores potenciales del cáncer de vejiga en 2003 [Veltman *et al.* (2003) "Array-based Comparative Genomic Hybridization for Genome-Wide Screening of DNA Copy Number in Bladder Tumors" *Cancer Research*, 63, 2872-2880]. Sin embargo, en este estudio no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el patrón de alteraciones en el número de copias y el estadio o grado del tumor.

Como resultado de la dificultad de emplear los diferentes marcadores genéticos conocidos del tipo transicional de carcinoma de vejiga, los inventores prefieren el uso de una estrategia innovadora basada en la detección simultánea de varias anomalías genéticas encontradas frecuentemente en las células TCC.

Para este propósito, listaron las anomalías genéticas principales encontradas en carcinomas de vejiga transicionales y seleccionaron las más representativas del grado de las células tumorales. En esta estrategia, dieron preferencia a las anomalías genéticas que consisten en alteraciones físicas en los cromosomas, tales como ploidías o deleciones, que resultan típicamente del análisis del cariotipo de las células tumorales. Después, desarrollaron un procedimiento innovador que permite la detección simultánea de la presencia o ausencia de anomalías genéticas seleccionadas en el ADN contenido en la orina de los pacientes.

Más particularmente, los inventores han seleccionado una matriz específica de 25 loci de cromosomas humanos (usando las técnicas de análisis comparativo de hibridación de cromosomas basado en matriz respecto al ADN total extraído de una muestra de orina) proporcionando una señal fluorescente significativa.

Hasta ahora, los ensayos basados en muestras de orina que ofrecen los mismos niveles de especificidad y sensibilidad, y que también son capaces de distinguir claramente entre tumores de grado bajo y alto no han estado disponibles (Budman L.I. *et al.*, 2008 *CUAJ* 2(3): 212-221).

Este método tiene una capacidad increíble para diagnosticar la presencia de células de carcinoma transicional de la vejiga, sin necesidad del examen quirúrgico de la vejiga, mientras proporciona una buena indicación del grado de estas células tumorales.

Fig. 1: Clasificación de los tumores analizados en los ejemplos, según los criterios clínicos habituales.

Fig. 2: clasificación de los pacientes cuya orina se analizó en los ejemplos, como una función de los resultados obtenidos usando endoscopia y citoscopia.

Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente solicitud es proporcionar un método para la detección de cáncer de vejiga, más particularmente la detección urinaria de cáncer de vejiga.

Esta detección se obtiene a través del marcaje de la cantidad total de ADN en la orina de un paciente, y la detección en este ADN, de secuencias cromosómicas comprendidas en loci, que podrían estar potencialmente afectadas por anomalías genéticas.

Estas secuencias cromosómicas, que son los ADN de referencia según la presente invención, podrían estar ausentes potencialmente en el caso de deleción del locus cromosómico al que pertenecen, o duplicadas, como por ejemplo en el caso de una trisomía.

Las células tumorales en el cáncer de vejiga frecuentemente son la fuente de reorganizaciones cromosómicas, lo que es indicativo hasta cierto punto del carácter tumoral de las células. Las regiones afectadas por esta reorganización cromosómica son sin embargo potencialmente numerosas y de un grado variable. En efecto, aunque algunos loci, en particular los que codifican genes supresores de tumores o están implicados en la regulación del ciclo celular, están alterados más sistemáticamente, las anomalías cromosómicas surgen cuando se producen recombinaciones intra e inter-cromosómicas entre regiones homólogas, que no son siempre las mismas.

Según una primera realización, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para la detección *in vitro* de cáncer de vejiga en un paciente, caracterizado porque comprende una o más de las etapas siguientes:

En una primera etapa (A), el ADN contenido en una muestra de orina tomada de dicho paciente se extrae usando uno de los numerosos métodos conocidos para un experto en la técnica. Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención permite ventajosamente determinar la afección cancerosa de la vejiga tomando como base la orina de los pacientes. Este método debe por lo tanto concentrar el ADN contenido en la muestra de orina, ADN que está en su estado residual ya que deriva, en parte, de células presentes en la vejiga. Como el ADN no es un material altamente frágil, no es necesario tomar medidas drásticas con el fin de conservar las muestras de orina que se van a analizar. Las muestras pueden tomarse así en la casa de los pacientes. El ADN extraído es completo, en el sentido en que contiene el ADN total recuperable presente en la orina, ya se origine o no de las células tumorales.

En una etapa siguiente (B), el ADN extraído en la etapa (i) se fragmenta, preferiblemente por sonicación, en fragmentos de ADN con un tamaño en su mayor parte mayor de 500 pares de bases (pb), preferiblemente mayor de 800 pb, y más preferiblemente entre 1.000 y 5.000 pb. Alternativamente, el ADN puede digerirse mediante enzimas tales como enzimas de restricción.

En una etapa siguiente (C), los fragmentos de ADN obtenidos se marcan uniformemente, mediante un primer agente marcador de manera que se forma un conjunto de ADN marcado. Así, se marca el ADN total extraído de la orina. Por "uniformemente" se quiere decir que el marcaje se produce de una manera no específica de forma que dos fragmentos de ADN diferentes con un tamaño idéntico se marcan con la misma intensidad. Para obtener dicho marcaje, se usan preferiblemente nucleótidos acoplados a un fluoróforo, que se introducen en el ADN durante el curso de una etapa de replicación. Esta etapa de replicación enzimática *in vitro* puede incrementar ventajosamente el número de copias de los fragmentos de ADN marcados disponibles en el conjunto de ADN. El conjunto de ADN marcado está comprendido preferentemente por fragmentos que tienen cortes aleatorios.

En una etapa siguiente (D), se forma al menos una alícuota a partir del conjunto de ADN marcado, siendo capaz dicha alícuota de formar, según las circunstancias, el conjunto de ADN marcado total. Cada alícuota se pone en contacto con uno, y preferiblemente varios, ADN de referencia, correspondiendo cada uno de estos ADN de referencia a una secuencia de ADN diferente incluida en el locus de un cromosoma que probablemente esté afectado por una anomalía genética. Dicha anomalía genética se correlaciona preferiblemente con un estadio de desarrollo específico del cáncer de vejiga y más particularmente con un estadio tal como el mencionado anteriormente. El ADN de referencia puede haberse elegido, por ejemplo, según los datos tomados de la bibliografía científica o resultados de análisis de biopsia.

Según la presente invención, los ADN de referencia están comprendidos por secuencias de ADN de cromosomas humanos con una longitud entre 1.000 y 200.000 pares de bases (pb), preferiblemente una longitud entre 2.000 y 180.000 pb, y aún más preferiblemente una longitud entre 5.000 y 160.000 pb, tales como los que se clonan en clones BAC (Cromosoma Artificial Bacteriano) o YAC (Cromosoma Artificial de Levadura) construidos a partir de secuencias genómicas humanas. Dichos clones BAC se describen en las bases de datos con acceso público relevantes para el genoma humano, tales como las de CNBI o el UCSC.

Así, mientras se ha probado que es difícil diagnosticar el cáncer de vejiga tomando como base marcadores aislados, en particular marcadores correspondientes a secuencias genéticas cortas que permiten llevar a cabo ensayos de amplificación genética (PCR, TMA, etc.), el método de detección según la presente invención se basa en un método de detección que usa secuencias de ADN que generalmente son mayores de 600 pb.

Los inventores han establecido que es preferible usar ADN de referencia cuya secuencia esté incluida en los loci de cromosomas humanos elegidos de: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22 como se refiere en la Tabla 1. El método según la invención implica ADN de referencia que comprenden las secuencias de ADN incluidas en cada uno de los loci siguientes presentes en los cromosomas humanos: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22.

Según la presente invención, el contacto entre los fragmentos de ADN marcados y los ADN de referencia se lleva a cabo en condiciones que permitan la hibridación específica, y preferiblemente en condiciones astringentes tales como las descritas en la parte experimental de la presente solicitud.

En paralelo a la etapa (D), una etapa (E) consiste en preparar un conjunto de ADN control tomado de uno o varios individuos que no padecen cáncer de vejiga. Idealmente, este ADN deriva de muestras urinarias tomadas de varios individuos que no padecen cáncer, elegidos aleatoriamente de la población humana. También es posible usar ADN

de referencia humano preparado comercialmente. Como en el caso del ADN extraído de la orina del paciente, el ADN control se marca uniformemente mediante un segundo marcador, preferiblemente fluorescente. Este marcador es preferiblemente diferente del usado para marcar el ADN del paciente.

5 Como en la etapa (D), una alícuota del ADN control marcado se pone en contacto con los ADN de referencia seleccionados, que son idénticos a los usados en la etapa (D). Esta operación de contacto puede llevarse a cabo separadamente o conjuntamente, en las mismas condiciones de hibridación a las usadas en la etapa (D). Cuando la operación de contacto se lleva a cabo conjuntamente, esto implica que el ADN del paciente y el ADN control, se ponen en contacto, preferiblemente simultáneamente, con el mismo ADN de referencia.

10 En una etapa siguiente (F), los fragmentos de ADN marcados, que no hibridaron específicamente con los ADN de referencia en las etapas (D) y (E), se eliminan. Esta etapa de lavado de ADN no hibridados se lleva a cabo según los procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, sin ninguna dificultad particular.

15 En una etapa siguiente (G), se determina la intensidad de la señal producida por los fragmentos marcados que han hibridado con cada uno de los ADN de referencia seleccionados. El tipo e intensidad de la señal depende del tipo de marcador usado. Cuando el primer y segundo marcadores usados tienen intensidades equivalentes, tal como por ejemplo en el caso de las cianinas 3 y 5, las variaciones observadas entre el ADN del paciente y el ADN control están directamente relacionadas con la cantidad de fragmentos de ADN hibridados localizados en cada ADN de referencia.

En una etapa siguiente (H), se determina la desviación entre las señales registradas del ADN del paciente y del ADN control para cada ADN de referencia.

20 Según una realización preferida de la presente invención, los fragmentos de ADN tomados del paciente en la etapa (C) se dividen en dos conjuntos, marcándose uno usando un primer marcador y marcándose el segundo usando un segundo marcador. Los fragmentos de ADN control de la etapa (D) también se dividen en dos conjuntos, marcándose uno usando el primer marcador y el segundo usando el segundo marcador. Con este procedimiento, puede determinarse una determinación cruzada de la desviación de la señal con el primer y después con el segundo
25 marcador. Si las desviaciones observadas entre el ADN control y el ADN del paciente son del mismo orden, independientemente del marcador usado, esto es indicativo de desviaciones significativas.

30 En una etapa siguiente (I), el estadio canceroso del paciente se obtiene a partir de las desviaciones observadas en la etapa previa. Así, según la presente invención, cuanto mayor es el número de desviaciones obtenidas, más exacta es la detección del cáncer de vejiga. Además, las desviaciones proporcionan una indicación cualitativa del estadio de los tumores implicados, en particular cuando se emplean simultáneamente varios loci que indican el grado tumoral.

Alternativamente, si se considera que un locus es un marcador altamente representativo de la malignidad de las células tumorales, pueden seleccionarse varios ADN de referencia del mismo locus con el fin de verificar el resultado derivado de este locus.

35 El método según la presente invención permite así, en la etapa (I), comparar varios ADN de referencia y establecer una tabla extendida de las anomalías genéticas encontradas. Durante esta etapa, puede resultar útil pesar los resultados obtenidos para cada ADN de referencia, con el fin de tener en cuenta, por ejemplo, para un tumor en un estadio dado, la probabilidad de encontrar una anomalía genética en el locus seleccionado. Cuando se usan varios
40 ADN de referencia para detectar una anomalía en el mismo locus, también es posible pesar la desviación obtenida para un ADN de referencia, teniendo en cuenta de esta manera su peso respecto a los otros loci representados. Este pesaje, o uso de constantes con el fin de ajustar correlaciones entre diferentes loci, puede usarse para diseñar un algoritmo que permita determinar un "estadio teórico" tomando como base los datos recogidos durante la etapa (H).

45 El método anterior puede resumirse como un método para la detección *in vitro* de cáncer de vejiga en un paciente, caracterizado porque comprende las etapas de:

(i) extraer el ADN contenido en una muestra de orina tomada de dicho paciente;

(ii) fragmentar el ADN extraído en la etapa (i);

(iii) marcar los fragmentos de ADN obtenidos uniformemente con un agente marcador de manera que se forma un conjunto de ADN marcado;

50 (iv) formar al menos una alícuota del conjunto de ADN marcado y poner en contacto cada alícuota con un conjunto de ADN de referencia, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permiten la hibridación específica de los fragmentos de ADN marcados con dichos ADN de referencia;

comprendiendo dichos ADN de referencia las secuencias de ADN incluidas en cada uno de los loci siguientes presentes en los cromosomas humanos: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7,
55 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22;

(v) eliminar los fragmentos de ADN marcados que no hibridan específicamente con los ADN de referencia;

(vi) determinar la intensidad de la señal producida por los fragmentos marcados hibridados con cada uno de los ADN de referencia seleccionados;

5 (vii) determinar, para cada ADN de referencia, las desviaciones entre las señales obtenidas en comparación con las obtenidas con un ADN control de un paciente sano;

(viii) derivar el estadio del cáncer del paciente de dichas desviaciones observadas.

Los loci, que están preferiblemente abarcados por los ADN de referencia según la presente invención, se resumen en la Tabla 1.

10 Los ADN de referencia corresponden a una o varias secuencias incluidas en las secuencias correspondientes como se referencia por el NCBI (posiciones de inicio y final en la secuencia genómica de cada cromosoma).

Tabla 1

Localización de los ADN de referencia

Localización cromosómica	Inicio de la secuencia genómica	Final de la secuencia genómica
1p	20365560	113105490
3q	123351123	182149547
8q22-qter	95030146	143909236
20	151454	57934415
5p12-p13	1771703	9682916
9p	14010384	37091069
9q	70785194	137897571
18q12	33436616	40743026
1q22-q24	154902972	158452461
5p	1771703	9682916
6q22	109464089	111511071
7	3863510	158689815
11q13	65805698	73155080
12q15	55617597	78745914
13q	25467720	99788952
15	25650963	97412048
16	267091	88643457
17q	26415272	77690512
6q25-q27	160256061	170536116
7q	62015315	158689815
8p	345303	38886999
10q	42335633	135251915
11p	399850	44925329
14q22-qter	72026416	106339461
17p	7436433	21191536
19	9998870	54262315
22	20487250	48028036

Las características de los loci relevantes pueden definirse adicionalmente como sigue:

3p: Una región que tiene varios genes candidatos implicados en numerosas formas de cáncer.

5 4: Una región implicada más en el progreso tumoral que en su inicio. En esta región se han descrito genes supresores de tumores, diana para otras patologías cancerosas.

5p12-p13: Una región implicada en la agresividad tumoral, en particular diseminación metastásica.

6q: Una región implicada en tumores de grado alto, que invaden el músculo. El gen M6P/IGF2R se indica como un indicador genético en el locus 6q26-q27.

10 8p: Una región delecionada frecuentemente en tumores invasivos de grado alto (especialmente 8p21-pter) incluyendo los genes supresores de tumores: EXTL3, WRN y PRLTS.

9p ó 9 completo: Una región que frecuentemente se ve afectada pronto. Los genes p16/MTS1/CDKN2A/INK4A y p15/MTS2/CDKN2B son inhibidores de quinasa fuertes en la progresión del ciclo celular. Frecuentemente afectado

- en pTas, p16 es un anti-oncogén que depende de Rb, como se discutirá más adelante. INK4A puede actuar en los puntos de control de p53 en particular.
- 5 10q ó 10 completo: Una región mínima 10q11-q21 y 10q24-q25: implicada en muchos otros cánceres (linfoma, próstata, colon). Esta área incluye numerosos genes supresores de tumores. La delección 10q podría ser un factor que da lugar a un pronóstico incorrecto.
- 11p: Una región que corresponde con la agresividad tumoral, el primer umbral en la dirección posible de tetraploidía. La delección podría influir en la expresión del gen KAI1 (11p11.2), que es un gen supresor de metástasis. Los genes EXT2, WT1, TSG101 y TSSC5 también están implicados en otros cánceres.
- 10 13q14: Una región que corresponde a RB1 en los grados y estadios avanzados de cáncer, RB coopera con P53. La inactivación de RB facilita la progresión tumoral mediante la regulación del inicio de la fase S. Otros genes podrían estar implicados, fuera del locus q14, lo que explica así las delecciones más extensas detectadas generalmente.
- 14q22-qter: Una región que parece estar asociada con la progresión tumoral. La delección podría estar causada por translocación desequilibrada. Al menos un gen supresor de tumor está presente en este locus.
- 15 16q: Una región asociada con la progresión tumoral. CDH1 codifica cadherina E, de manera que la delección resulta en agresividad clínica y biológica de las células tumorales. Otro gen codifica cadherina H, que normalmente inhibe el crecimiento celular.
- 20 17: Una región delecionada o mutada, que se produce en un estadio tardío, y está asociada con la progresión tumoral más que con el inicio. La delección de p53 en 17p13.1 da lugar a un incremento en el número de alteraciones genéticas debido a una ausencia de control de la proteína P53. El gen HIC1 en 17p13.1 también puede estar implicado.
- 18q12 ó 18 completo: Una región típicamente alterada en tumores que invaden el músculo (T2 o más). Smad4/DPC4 y Smad2/MADR2/hMAD2/JU18-1 actúan en RB y p15 inactivándolos.
- 1q22-q25: Una región amplificada que corresponde a la transición entre Ta y T1. P73 está sobreexpresado frecuentemente, y así potencialmente alterado por duplicación en esta área.
- 25 3q23-q24-q25-q26-qter: Una región ya identificada como tendente a la alteración, aunque no se ha demostrado su implicación.
- Isocromosoma 5p (ganancia de 5p y pérdida asociada de 5q): Una región en tumores que invaden el músculo, alterada por la activación de proto-oncogenes.
- 30 6p22: Una región amplificada que puede estar asociada con una invasión tumoral debido a la posible presencia de proto-oncogenes.
- 7: Una región que incluye el gen ERBB1/EGFR en 7p14-p21, que codifica un receptor de EGF (factor de crecimiento epidérmico), que juega un papel en el crecimiento celular. En 7q31, el gen cmet codifica otro receptor de crecimiento, HGF/SF (factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión). Estas áreas parecen estar implicadas en el crecimiento celular caótico de los tumores.
- 35 8q: Una región frecuentemente implicada en la transición Ta-T1 y la progresión hacia un tumor invasivo y especialmente metastásico, mediante la presencia de oncogenes en la región 8q22-q23.
- 10q22-q23: Una región que raramente está amplificada, y más comúnmente delecionada (véase anteriormente).
- 40 11: Amplificación de al menos la banda 11q13 con el gen CCND1 que controla la entrada en el ciclo celular. CCND1 está activado en muchos cánceres pero parece tener poca correlación con la progresión del cáncer. Esta amplificación conllevaría una relación con los estadios tempranos del crecimiento del cáncer.
- 12q15: Una región que contiene el gen MDM2, que interacciona con p53 en algunos tumores con el fin de suprimir su papel mediante el enmascaramiento de su sitio de activación.
- 13q33-q34: La posible trisomía 13, encontrada ocasionalmente en tumores de vejiga, podría dar lugar a la duplicación de esta región que posiblemente contiene un proto-oncogén.
- 45 17q: Una región comúnmente duplicada que incluye el gen ERBB2 en 17q21. Esta anomalía es más común en los grados y estadios avanzados, o está asociada con recaídas.
- 18q11: Una región reconocida por algunas amplificaciones significativas raras.
- 50 20: Una región común, lo más frecuentemente restringida al locus 20q. Los proto-oncogenes de carcinoma de la forma familiar están presentes en el locus 20q11-q12. En 20q13, STKIS/BTAK codifica una proteína que induce inestabilidad cromosómica.

Según un aspecto preferido de la invención, el método de detección de cáncer de vejiga *in vitro* implica ensayar para ploidía del ADN de las células urinarias del paciente tomando como base uno, varios, o todos los loci siguientes: 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 18q12, 19 y 22.

5 Según una realización alternativa de la presente invención, dicho método implica ensayar para ploidía del ADN en las células urinarias del paciente para uno o varios de los loci siguientes:

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12 y 17p;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p y 11p;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p y 7q;

10 - 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q y 1q22-24;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24 y 11q13;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13 y 8p;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p y 14q22;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22 y 22;

15 - 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22 y 5p;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p y 6q22;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22 y 7;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7 y 12q15;

20 - 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15 y 15;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15, 15 y 6q25-q27;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15, 15, 6q25-q27 y 19;

25 - 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15, 15, 6q25-q27, 19 y 13q;

- 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15, 15, 6q25-q27, 19, 13q y 16;

y

30 - 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 17p, 11p, 7q, 1q22-24, 11q13, 8p, 14q22, 22, 5p, 6q22, 7, 12q15, 15, 6q25-q27, 19, 13q, 16 y 17q.

Un aspecto adicional de la presente invención implica el uso de todos los ADN de referencia tomados de los 25 loci indicados anteriormente con el fin de determinar el grado y agresividad de un tumor.

35 Preferiblemente, el número de diferentes ADN de referencia útiles para la implementación del método se encuentra entre 50 y 500, preferiblemente entre 50 y 400.

A este respecto, la presente invención también se refiere a una micromatriz o chip de ADN, más particularmente útil para la detección urinaria de cáncer de vejiga, caracterizado porque comprende en su superficie varios depósitos de ADN de referencia, distintos entre sí, correspondiendo cada uno de estos depósitos a una secuencia incluida en uno o más de los loci descritos anteriormente. Esta micromatriz o chip de ADN, que, preferiblemente, es un portaobjetos de vidrio, permite implementar el método según la presente invención sobre un área superficial reducida permitiendo así la comparación simultánea del estado haploide o poliploide del ADN del paciente en el estado diploide normal de una ADN sano para uno, varios o todos los loci mencionados anteriormente.

45 Dicha micromatriz de ADN para la detección de cáncer de vejiga según la invención se caracteriza preferiblemente porque comprende en su superficie entre 50 y 1.000 depósitos de ADN de referencia, consistiendo dichos ADN de referencia en secuencias incluidas en cada uno de los loci anteriores de cromosomas humanos: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22.

5 Según el método descrito previamente, la micromatriz de ADN según la invención comprende idealmente entre 5 y 1.000, preferiblemente entre 5 y 400 ADN, y más preferiblemente entre 300 y 400 depósitos de ADN de referencia como se ha definido anteriormente en su superficie. El número de los depósitos se reduce en comparación con micromatrices genómicas para análisis amplio del genoma para disminuir el ruido de fondo. Este número se considera óptimo por los inventores para mejorar la sensibilidad del ensayo respecto a la detección de cáncer de vejiga.

Por chip de ADN se quiere decir un sustrato plano de vidrio, silicio o plástico, en el que se ponen secuencias nucleicas de ADN conocidas, tales como los ADN de referencia según la presente invención.

10 Preferiblemente, según la presente invención, el ADN de referencia que se pone en el chip de ADN comprende las secuencias de ADN incluidas sólo en los loci en los que se han descrito las anomalías cromosómicas relacionadas con el cáncer de vejiga, y preferiblemente en uno, varios o todos los loci descritos en la presente solicitud.

La presente invención también se refiere a un kit que contiene uno o más de los elementos siguientes:

- uno o más ADN de referencia según la presente invención como se ha descrito en lo anterior, unidos a un sustrato de vidrio, preferiblemente en la forma de un chip o micromatriz de ADN;
- 15 - una muestra de control de ADN tomada de un paciente sano;
- un reactivo marcador de ADN total como se ha descrito en lo anterior; y
- un programa de software que permite analizar la comparación entre el estado diploide del ADN del paciente y el estado diploide normal de un ADN control.

20 Dicho kit está envasado preferiblemente en una caja de manera que se acomodan todos los tubos, matraces y reactivos necesarios para implementar el método según la presente invención.

En los ejemplos siguientes no limitativos se proporcionan características y ventajas adicionales de la invención.

EJEMPLOS

I - Preparación del portaobjetos de vidrio

25 Gracias a la disponibilidad de bases de datos públicas (UCSC y NCBI), se seleccionó una serie de clones BAC (partes de ADN del genoma humano) para abarcar los marcadores elegidos listados en la Tabla 1. La posición de estos clones se confirmó mediante secuenciación de los dos extremos del ADN clonado con el fin de verificar la posición exacta de la secuencia de ADN en el genoma. Cada uno de estos clones forma un ADN de referencia como resulta implícito por la presente invención.

30 La totalidad de los clones seleccionados abarca todos los loci cromosómicos elegidos como marcadores, haciendo un total de 341 clones BAC.

35 El ADN se extrajo del BAC y se amplificó usando tecnología repliG (Qiagen, Alemania). Cada ADN se puso de manera que se forman 341 pocillos en una placa de PCR, conteniendo cada uno 10 µg de ADN purificado. Mediante un robot Biorobotic y 4 agujas, el ADN se puso en cantidades muy pequeñas en un portaobjetos de vidrio. El diseño, producido por ArrayGenomics, incorpora dos áreas de hibridación permitiendo, como precaución, llevar a cabo un experimento gemelo. Cada ADN se pone aleatoriamente 5 veces en cada área de hibridación con el fin de obtener 5 medidas independientes.

El ADN se fija químicamente en un portaobjetos de vidrio lo que permite conservarlo durante 3 a 6 meses.

II - Perfil genético de tumores de vejiga

40 Se recogieron tumores congelados. El ADN cromosómico de estos tumores se extrajo usando un kit comercial. Los tumores que se consideran que son de un "grado bajo" están en el estadio pTa/G2. Los tumores que se consideran que son de un "grado alto" están al menos en el estadio pTa/G3, pT1 y pT2. Los tumores se clasifican según los criterios clínicos estándar (Figura 2).

El ADN extraído de los tumores congelados se cuantifica por fluorimetría (sistema QuBit, Invitrogen).

45 El ADN genómico humano usado como una muestra control para la implementación del método de diagnóstico es ADN comercial (Promega, ADN genómico humano).

III - Marcaje del ADN e hibridación con los ADN de referencia

Marcaje de los ADN completos

ES 2 549 455 T3

1. Se fragmentan 2,3 µg de ADN control por sonicación en un tubo eppendorf de 55 µl usando un sonicador (sonicador Elmasonic) durante 12 a 13 segundos.
2. Se evalúan 200-300 ng del ADN preparado de esta manera por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, con el fin de verificar que el ADN está fragmentado correctamente y que la mayor parte de los fragmentos tiene un tamaño mayor de 600 pb.
3. Los fragmentos se purifican en micro-columnas (NucleospinExtract II).
4. Se ponen 25 µl (~1 µg) de alícuotas de ADN purificado y ADN control en tubos de centrifuga para marcaje con los fluoróforos Cy5 y Cy3.
5. Se añaden 20 µl de cebadores de secuencia aleatorios (tubo 1, Kit Enzo) a cada tubo, se agitan con vórtex y se centrifugan.
6. Los tubos se calientan en un baño de agua a 99°C durante 10 minutos.
7. Los tubos se ponen en hielo durante 5 minutos, se centrifugan brevemente y se vuelven a poner en hielo.
8. Se añaden 5 µl de una mezcla de nucleótidos marcados con cianina a cada tubo (tubo 2 ó 3, Kit Enzo).
9. Se añade además 1 µl de fragmentos de enzima Klenow (Tubo 4, Kit Enzo).
10. La mezcla se incuba en un bloque calefactor durante 3 horas y 30 minutos a 37°C.
11. Se añaden 5 µl de Tampón de Parada (tubo 5, Kit Enzo) después de lo cual los tubos se ponen en hielo.
- Lavado del ADN marcado
12. Se añaden a los tubos 200 µl de tampón NT por 100 µl de ADN.
13. Los contenidos de cada tubo se transfieren a una columna, y se centrifuga durante 1 minuto a 11.000g.
14. Se ponen 600 µl de un tampón de lavado NT3 en cada columna, y se centrifuga durante 1 minuto a 11.000g.
15. Las columnas se centrifugan durante 2 minutos a 11.000g.
16. Se ponen 51 µl de agua estéril en la parte superior de la columna durante 1 minuto.
17. La columna se centrifuga durante 1 minuto a 11.000g y el ADN marcado disuelto se recupera en un tubo.
- Preparación del ADN antes de la hibridación
18. Se añaden a cada tubo 50 µl de ADN Cot-1 (Roche).
19. El volumen se ajusta a 200 µl usando 0,3M de acetato de sodio (pH 5-8).
20. Se añaden 300 µl de etanol congelado.
21. La mezcla se agita con vórtex y se incuba en oscuridad a 70°C durante 15 minutos.
22. Los tubos se centrifugan durante 15 minutos a 11.000g entre 4 y 8°C.
23. El sobrenadante se retira usando una bomba de vacío.
- Preparación del BAC en un portaobjetos de vidrio
- Los ADN en la forma de clones BAC se ponen en forma deshidratada en una placa de vidrio y se fijan usando un agente de entrecruzamiento sensible a la luz UV (350 mJ).
- Hibridación del ADN marcado/ADN de referencia (BAC)
24. El residuo recuperado en el punto 23 se añade a 5 µl de ddH₂O.
25. 10 µl para 50 µg/µl de ARNt de levadura (Invitrogen, Cat #15401-011) y la mezcla se agita y se calienta hasta 95°C durante 5 minutos.
26. Se añaden 15 µl de tampón de hibridación (Tampón Ambion Slide Hyb #3) precalentado hasta 70°C.
27. La mezcla se agita vigorosamente durante 30 segundos y se centrifuga a 13.000 rpm durante 30 segundos.
28. La mezcla se calienta hasta 37°C durante 30 minutos.

ES 2 549 455 T3

29. El portaobjetos de vidrio se cubre totalmente con la mezcla.

30. Un cubreobjetos Lifterslip limpio (24 x 32 pulgadas, 61 x 81 cm) (Erie Scientific, Cat #25X60I-2-4789) se pone por encima del portaobjetos de vidrio con el fin de cubrir la micromatriz.

31. Se añaden 20 µl de agua con el fin de humidificar las juntas.

- 5 32. La cámara de hibridación cerrada (Cámara de hibridación, Corning, Cat #2551) se sumerge en un baño de agua a 55°C durante 16 horas.

Lavado post-hibridación

33. La placa de vidrio se incuba en una primera disolución de 0,1% SDS 0,1X SSC, a 50°C.

- 10 La micromatriz se pone sucesivamente en las disoluciones de lavado siguientes (en cada disolución, durante 45 s mientras se agita y durante 45 s sin agitación):

a) 0,1X SSC, 0,1% SDS;

b) 0,1X SSC, 0,1% SDS;

c) 0,1X SSC;

d) 0,1X SSC;

- 15 34. El portaobjetos de vidrio se sumerge a temperatura ambiente en una caja de marcaje llena con una disolución de 0,1X SSC, después en otra caja llena con 100% etanol (CML, Cat# BVITRI-PPL25L).

35. Los portaobjetos de vidrio se ponen en tubos cónicos de 50 ml y se centrifugan durante varios segundos hasta sequedad.

36. Los portaobjetos de vidrio se conservan en oscuridad.

- 20 Los portaobjetos de vidrio se analizan usando un escáner fluorescente (GENEPIX 4000B) con una sensibilidad ajustada según la intensidad de la señal de marcaje.

25 Los resultados se analizan usando el software de análisis de imágenes BacMagic+ (desarrollado por ARRAYGENOMICS) para visualizar gráficamente los perfiles en el modo cambio de agente de tinción. Para cada ADN, se exporta un archivo de texto por BacMagic+ y se formatea de manera que puede usarse por el software seeGH. Las deleciones y ganancias se anotan tomando como base la visualización de la simetría de cambio de agente de tinción en BacMagic+.

30 Usando seeGH, para cada grupo, las anotaciones se compilan con el fin de derivar una imagen global de las anomalías detectadas y su frecuencia. En estas figuras, que son similares a una tabla de cariotipo, las marcas representan anomalías (rojo= pérdida, verde= ganancia) y su localización. Los tamaños de las marcas representan su frecuencia de detección en el conjunto de paciente.

Analizando la Fig. 2, es posible crear un perfil típico de cada grupo de tumor según su grado y estadio, que puede compararse entonces con perfiles típicos de grupos de tumores.

Tabla 2

Ganancias visualizadas después del análisis de las anomalías detectadas

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	pTa G2	pTa G3	T1	T2
1q22-24	4	3		2	2	
3q	6	5	2	1		
5p	7	6	2			
8q22-ter	3	2	1	2	2	1
11q13	7	6		2		
12q21-24	5	4			1	
15	8	6			1	
16	12	10			1	2
17q	11	9			1	
18q	10	8				2
20q11-ter	10	8		1		
20	14	11	1		2	1

Tabla 3

5 Deleciones visualizadas después del análisis de las anomalías detectadas

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	pTa G2	pTa G3	T1	T2
2q35-ter	2	2			1	
4q26-ter	7	6			1	
6q25-27	5	4		1	4	3
8p	14	11		2	2	2
9p	6	5	1	1		
9q	12	10	3	2	2	1
10q	14	11		1		
11p	4	3		1	3	
11q23-25	5	4		1	1	1
13q13	3	2			2	1
13	7	6		1	1	2
14q23-31	3	2				2
17p	5	4			1	
17	16	13		1		1
18q12	3	2	1	1		
18q12-23	11	9			4	
19	4	3			1	1

5 A partir de este resumen, parece que los pTaG2 están mucho menos alterados que los grados superiores. Algunas anomalías parecen ser características de los tumores de grado bajo. Como se describe en la bibliografía, la delección 9 también se encuentra aquí, pareciendo estar más relacionada con el inicio y frecuentemente asociada con pTas. En el presente caso, las ganancias 3q y 5p también parecen ser características de los grados bajos (aquí, no es un iso5p como se describe para grados superiores, ya que no hay ganancia 5q).

Las anomalías de ganancia para los grados altos aparece gradualmente: 8q, 1q, 11q pero también 16 y 18, lo que parece ocurrir más frecuentemente en los estadios T2 o superiores.

Las anomalías por pérdida para los grados altos son 6q, 11p, y 13, pero también 18q, pareciendo que el último evento por lo tanto ocurre con retraso en la progresión del tumor.

10 **IV - CÁLCULO Y DEFINICIÓN DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD**

Sensibilidad: capacidad para detectar pacientes enfermos.

$$\frac{\text{positivo verdadero}}{\text{positivo verdadero} + \text{negativo falso}}$$

Especificidad: capacidad del ensayo para determinar qué sujetos están sanos.

$$\frac{\text{negativo verdadero}}{\text{negativo verdadero} + \text{positivo falso}}$$

15 Gracias al uso de tumores conocidos por los inventores, es posible computar la sensibilidad del ensayo. Esto permitirá la capacidad de la presente técnica de detectar tanto tumores de grado bajo como de grado alto que se evalúan. Ambos grupos estarán separados en los cálculos, porque los tumores de grado bajo son menos difíciles de detectar. Los ensayos rutinarios, tales como citología urinaria, sólo detectan el 50% de estos cánceres en su fase inicial.

20 Los ensayos existentes se caracterizan por su sensibilidad y especificidad según se computa en la bibliografía científica (expresado por un mínimo y un máximo ya que estos valores varían según cada estudio - *Fuentes:* Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer, Lorne I. Budman, MSc, Wassim Kassouf, M.D., y Jordan R. Steinberg, MD de la Division of Urology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec), según se indica en la Tabla 4 siguiente.

25 **Tabla 4**

Sensibilidad y especificidad para los ensayos existentes:

Ensayo	Sensibilidad	Especificidad
BTA Stat (Polymedco)	52.5%-78.0%	69.0%-87.1%
BTA Trak (Polymedco)	51%-100%	73%-92.5%
Citología	12.1%-84.6%	78.0%-100%
Tira reactiva hematuria	47.0%-92.6%	51.0%-84.0%
Ensayo de Cáncer de Vejiga NMP22 (Matritech)	34.6%-100%	60.0%-95.0%
NMP22 BladderChek (Matritech)	49.5%-65.0%	40.0%-89.8%
InmunoCyt/uCyt+ (DiagnoCure)	63.3%-84.9%	62.0%-78.1%
InmunoCyt/uCyt+ y citología	81.0%-89.3%	61.0%-77.7%
UroVysion (Abbott Molecular)	68.6%-100%	65.0%-96.0%

La sensibilidad se determina para un número dado de marcadores. Para cada uno de éstos, puede computarse un valor de sensibilidad. Obviamente, no es posible para un único marcador genético dar lugar a una solución fiable. Sin embargo, la combinación de 25 marcadores parece ser considerablemente más juiciosa, como se muestra por las evaluaciones resumidas en las Tablas 5 y 6.

5 **Tabla 5**

Evaluación resumida basada en los 25 marcadores

Ganancias			Grado bajo	Pérdidas		
Locus	Número de tumores anormales	%		Locus	Número de tumores anormales	%
1p	1	10%		5p12p13	1	10%
3q	2	20%		9p	3	30%
8q22-qter	4	20%	Sensibilidad total 80%	9q	1	10%
11q13	4	29%		18q12	2	20%
19	2	14%				
20	2	20%				

Tabla 6

Evaluación resumida basada en los 25 marcadores

Ganancias			Grado alto	Pérdidas		
Locus	Número de tumores anormales	%		Locus	Número de tumores anormales	%
1q22-24	4	29%		6q25-27	2	14%
3q	3	21%		7q	4	29%
5p	2	14%	Sensibilidad total 86%	8p	3	21%
6q22	1	14%		9p	1	7%
7	2	14%		9q	3	21%
8q22qter	3	21%		10q	1	7%
11q15	1	14%		11p	5	36%
13q	2	7%		13q	4	29%
15	2	14%		14q22qter	3	21%
16	1	7%		16	1	7%
17q	1	7%		17p	5	36%
20	1	7%		18q12	4	29%
22	3	21%				

10

Especificidad: 6 ADN negativos (ADN sin anomalías): $6/(6+0)*100= 100\%$

Las 10 anomalías que se han clasificado en el grupo de grado bajo pueden tomarse como modelos para tumores en su fase de inicio, que todavía no se han vuelto invasivos.

Generalmente, cuando el tumor no es invasivo pero es de grado alto, o cuando ya está en el estadio T1 o T2 o superior, se incrementa el número de anomalías detectadas en los marcadores de esta invención

Para los grados altos, el método confirma la importancia de los cromosomas 1, 7, 8, 11, 13, 14, 17, y 18.

- 5 Sin embargo, debe indicarse que la sensibilidad de cada uno de los marcadores considerado separadamente no supera el 36% (como es el caso para la citología o NMP22 en algunos estudios).

Por otra parte, el agrupamiento de todos los marcadores genéticos seleccionados por los inventores para la presente invención proporciona muy buena sensibilidad, incluso para grados estrictamente bajos (el resultado obtenido con la presente invención SOLO es tan satisfactorio como la combinación InmunoCyt/uCyt+ y citología usada en determinados estudios).

- 10 De manera similar, la especificidad (computada para muestras normales o para ADN extraídos de la orina de pacientes con resultados negativos de endoscopia y negativos de seguimiento) alcanza el 100%.

V - Verificación en orina

Se tomaron muestras de orina de pacientes en diagnóstico o en seguimiento.

Se llevó a cabo endoscopia rutinaria. Los pacientes se agruparon como se muestra en la Fig. 2.

- 15 El método se implementó de la misma manera que para los tumores congelados (véase la parte II).

Los resultados se analizan usando el software BacMagic+ para visualizar gráficamente los perfiles en el modo cambio de agente de tinción. Para cada ADN, se exporta un archivo de texto por BacMagic+ y se formatea de manera que puede usarse por el software seeGH. Las deleciones y ganancias se anotan tomando como base la visualización de la simetría de cambio de agente de tinción en BacMagic+.

- 20 Usando seeGH, para cada grupo, las anotaciones se compilan con el fin de derivar una imagen global de las anomalías detectadas y su frecuencia. En estas figuras, que son similares a una tabla de cariotipo, las marcas representan anomalías (rojo= pérdida, verde= ganancia) y su localización. Los tamaños de las marcas representan su frecuencia de detección en el conjunto de pacientes.

- 25 Para tumores del sistema urinario superior, es posible derivar una evaluación resumida de las anomalías detectadas (Tablas 7 y 8).

Tabla 7

Evaluación resumida de las anomalías detectadas (ganancias)

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	Endo positiva	Endo sospechosa
1q	10	8	1	
1q22-24	3	2		1
3	19			1
3q	6	5	1	
3q26-ter	3	2	1	
5p	7	6	1	1
7p	7	6		1
8q21-23	11	9	2	1
11q13	7	6	1	
12	15	12	1	1
12q	7	6	1	
13q	7	5,6	1	1
15	8	6,4	1	
16q	5	4	1	1
17p	5	4		1
17q	10	8	4	1
19	4	3	4	1
20	17	14	1	1

Tabla 8

5 Evaluación resumida de las anomalías detectadas (deleciones)

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	Endo positiva	Endo sospechosa
1p21-22	4	3	1	
4q12-13	6	5	1	
6q25-27	3	2	2	1
8p	14	11	2	1
9p	6	5	5	1
9q	12	10	4	1
10q22	3	2	1	
11p	10	8	1	1
14q23-31	4	3	1	
17p	5	4	1	1
17q	10	8	1	
18q12	3	2		1
18q12-23	11	9	5	
20q	10	8	1	
22q	8	6	1	

Para los pacientes con endoscopia positiva, se reconocen las anomalías características de cánceres de vejiga, con algunas variaciones que se listan aquí.

Además, la tabla de distribución de anomalías se usará en un intento de determinar el grado de estos tumores detectados.

- 5 Para los tumores de vejiga, esto también se lleva a cabo derivando una evaluación resumida de las alteraciones detectadas.

Tabla 9

Evaluación resumida de las anomalías detectadas (ganancias)

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	Endo positiva	Endo sospechosa positiva (seguimiento)
1q22-24	4	2	1	
3p24-ter	4	3		1
3q	6	5		
5p	7	6	2	
8q22-ter	3	2	3	1
10p	4	3		1
11q13	7	6	4	2
12q21-24	5	4		
15	8	6		
16	12	10	1	
17p	5	4		1
17q	11	9	2	1
18q	10	8		2
20q11-ter	10	8	3	1
20	14	11	1	1

Tabla 10

Evaluación resumida de las anomalías detectadas (deleciones)

BANDAS	CLONES TOTALES	MÍNIMO POSITIVO	Endo positiva	Endo sospechosa positiva (seguimiento)
2q35-ter	2	2		
4p	3	2	1	
4q26-ter	7	6		
6q15-24	5	4	1	
6q25-27	5	4	1	1
8p	14	11	2	2
9p	6	5	3	1
9q	12	10	1	1
10q	14	11	1	
11p	4	3	1	1
11q23-25	5	4	1	
13q13	3	2		
13	7	6		
14q23-31	3	2		
17p	5	4		
17	16	13		
18q12	3	2	2	1
18q12-23	11	9		1
19	4	3		

- 5 Los resultados listados en las Tablas 9 y 10 muestran que se detectan muchas anomalías características en pacientes con endoscopia positiva. Sin embargo, las endoscopias sospechosas revelan menos alteraciones. En pacientes para los que el diagnóstico por endoscopia no se determinó completamente, el seguimiento mostró que estos pacientes habían progresado desfavorablemente. Así, parece que una endoscopia sospechosa se hubiera aclarado por el ensayo de los inventores antes de alcanzar el seguimiento de 6 meses.
- 10 También debe indicarse que los pacientes con endoscopia negativa así como aquellos para los que el seguimiento de 12 meses tampoco revelaba nada, no mostraron positividad para las áreas ensayadas. (Sólo unos pocos clones mostraron variaciones, pero éstos no eran áreas que se pretendía ensayar, y correspondieron a variaciones polimórficas de clones distribuidos en el portaobjetos. Estos clones tendrán que suprimirse en las versiones venideras del presente portaobjetos, debido a su naturaleza variada y posición casi centromérica).
- 15 Si el análisis se lleva a cabo en una base caso a caso en cada uno de los ADN extraídos de la orina de la orina de un paciente con endoscopia positiva, puede aplicarse la tabla resumen de la presente invención, que combina un grado bajo o un grado alto.
- Ejemplos específicos:
- ADN 34016: UUTT con endoscopia positiva. Se detectaron las deleciones 9p y 9q, indicativas de grados bajos. El urólogo asociado con los inventores llevó a cabo una biopsia después del ensayo. Se determinó un grado 1 ó 2.
- 20 ADN 33276: UUTT con endoscopia positiva. Se detectan numerosas anomalías (8 en total), entre éstas 9q, 11p, 8p y 1q22-q2, que son características de grados altos. Después de la biopsia, se confirmó un grado G3.
- ADN 32479: Tumor de vejiga con endoscopia sospechosa pero seguimiento positivo a los 6 meses: sólo se detectó una ganancia de 19. Este pequeño número de anomalías y la influencia indeterminada de la ganancia de 19, permite a los inventores asociar este tumor con un grado bajo. La biopsia indicó grado G1/G2.
- 25 Se llevó a cabo una biopsia en la mayor parte de los pacientes cuya orina se ensayó en este estudio, siempre que su endoscopia fuera positiva. En el momento en el que se llevó a cabo el ensayo BCA, los resultados de la biopsia no estaban disponibles.

Este ensayo se llevó a cabo así en modo ciego. Sus resultados pueden resumirse para cáncer de vejiga como se muestra en la Tabla 11 siguiente.

Tabla 11

Tumor de vejiga: endoscopia positiva: 8 muestras de orina

ADN#	MARCADORES POSITIVOS	CONCLUSIÓN BCA	RESULTADO BIOPSIA
Fb48	Ninguno	Grado Bajo G1	No analizable
30869	8q22-qter, 11q13, 17q	Grado Bajo G2	No analizable
32479	19	Grado Bajo G1	G1/G2
32759	9p	Grado Bajo G1	G1/G2
Fb43	19	Grado Bajo G1	G1/G2
30656	6q25-q27	Grado Bajo	No analizable
32671	9p, 6q25-q27	Grado Bajo progresión	G3
31138	Ninguno	Grado Bajo	No analizable
33442	6q27, 8p, 17q	Grado Alto	G3
32924	5p, 8q, 11q13, 17q, 20, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 16, 18q12, 22	Grado muy alto	G3
Fb13	6q25-q27, 9p, 14q22-qter, 11q13, 20, 22	Grado Alto	G3
39373	5p, 8q22-qter, 18q12, 20	Grado Alto	G3

5

Debe indicarse que para todos los pacientes para los que el resultado de la biopsia fue ambiguo, habría sido posible predecir el grado del tumor. Además, en algunos casos, un análisis más exacto de los marcadores alterados proporciona información acerca del carácter agresivo del tumor, su potencial metastásico y su posible progresión. Además, algunas biopsias que eran demasiado restringidas no pudieron analizarse, mientras la presente invención es capaz de proporcionar un resultado claro respecto al grado de estos tumores.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección *in vitro* de cáncer de vejiga en un paciente, caracterizado porque comprende las etapas de:
 - (i) extraer el ADN contenido en una muestra de orina tomada de dicho paciente;
 - 5 (ii) fragmentar el ADN extraído en la etapa (i);
 - (iii) marcar los fragmentos de ADN obtenidos uniformemente con un agente marcador de manera que se forma un conjunto de ADN marcado;
 - (iv) formar al menos una alícuota del conjunto de ADN marcado y poner en contacto cada alícuota con un conjunto de ADN de referencia, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permiten la hibridación específica de los fragmentos de ADN marcados con dichos ADN de referencia; comprendiendo dichos ADN de referencia las secuencias de ADN incluidas en cada uno de los loci siguientes presentes en los cromosomas humanos: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22;
 - (v) eliminar los fragmentos de ADN marcados que no hibridan específicamente con los ADN de referencia;
 - 15 (vi) determinar la intensidad de la señal producida por los fragmentos marcados hibridados con cada uno de los ADN de referencia seleccionados;
 - (vii) determinar, para cada ADN de referencia, las desviaciones entre las señales obtenidas en comparación con las obtenidas con un ADN control de un paciente sano;
 - 20 (viii) derivar el estadio del cáncer del paciente de dichas desviaciones observadas para los loci 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22.
2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque los ADN de referencia consisten en secuencias de ADN de cromosomas humanos con una longitud entre 1.000 y 200.000 pb (pares de bases), preferiblemente entre 2.000 y 180.000 pb, y aún más preferiblemente entre 5.000 y 160.000 pares de bases.
- 25 3. Un método según la reivindicación 2, caracterizado porque los ADN de referencia consisten en clones BAC del genoma humano.
4. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se usan un primer y un segundo marcador respectivamente para marcar los fragmentos de ADN extraídos de orina y el ADN control de un paciente sano.
- 30 5. Un método según la reivindicación 4, caracterizado porque el primer y segundo marcadores son marcadores fluorescentes que emiten a diferentes longitudes de onda, preferiblemente Cy3 y Cy5.
6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el grado de las células tumorales en la etapa (viii) se determina como una función de las desviaciones observadas respecto a los ADN de referencia.
- 35 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque los ADN de referencia se depositan separadamente en una micromatriz, antes de la hibridación con los fragmentos de ADN marcados.
8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque los fragmentos de ADN tomados del paciente en la etapa (iii) se dividen en dos conjuntos, marcándose uno con un primer marcador y el segundo con un segundo marcador, dividiéndose también el ADN control de la etapa (vii) en dos conjuntos, marcándose uno con el primer marcador y el segundo con el segundo marcador, llevándose a cabo una determinación cruzada de la desviación de la señal en la etapa (vii) entre cada uno de los conjuntos así marcados.
- 40 9. Una micromatriz de ADN para la detección de cáncer de vejiga, caracterizada porque consiste en su superficie en entre 50 y 1.000 depósitos de ADN de referencia, consistiendo dichos ADN de referencia en secuencias incluidas en cada uno de los loci de cromosomas humanos: 1p, 3q, 8q22qter, 20, 5p12-p13, 9p, 9q, 18q12, 1q22-q24, 5p, 6q22, 7, 11q13, 12q15, 13q, 15, 16, 17q, 6q25-q27, 7q, 8p, 10q, 11p, 14q22-qter, 17p, 19 y 22.
- 45 10. Una micromatriz de ADN según la reivindicación 9, caracterizada porque comprende entre 50 y 400, preferiblemente entre 300 y 400 de dichos depósitos de ADN de referencia en su superficie.
11. Uso del chip de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 9-11 para la detección urinaria *in vitro* de cáncer de vejiga.

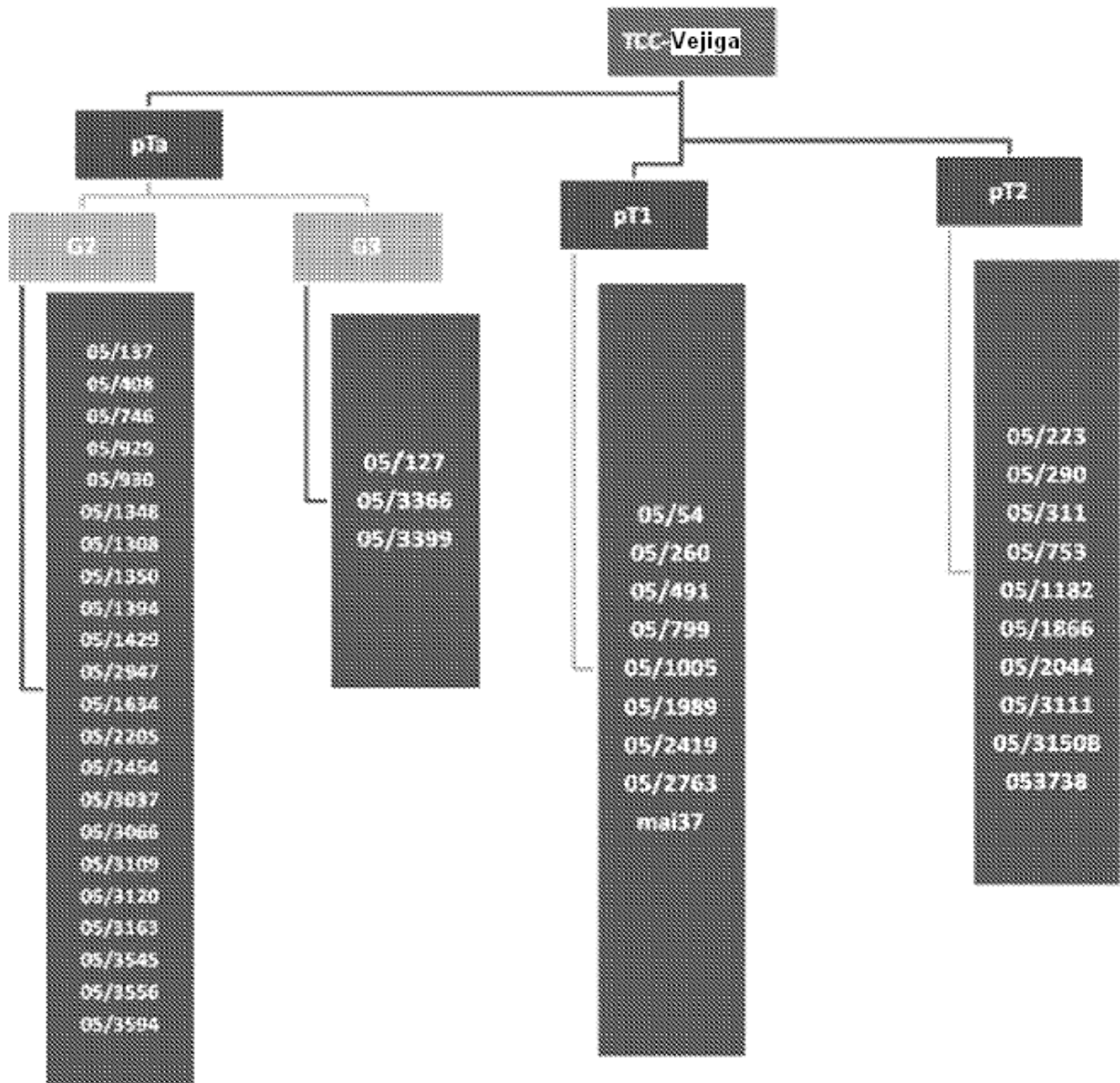


FIGURA 1

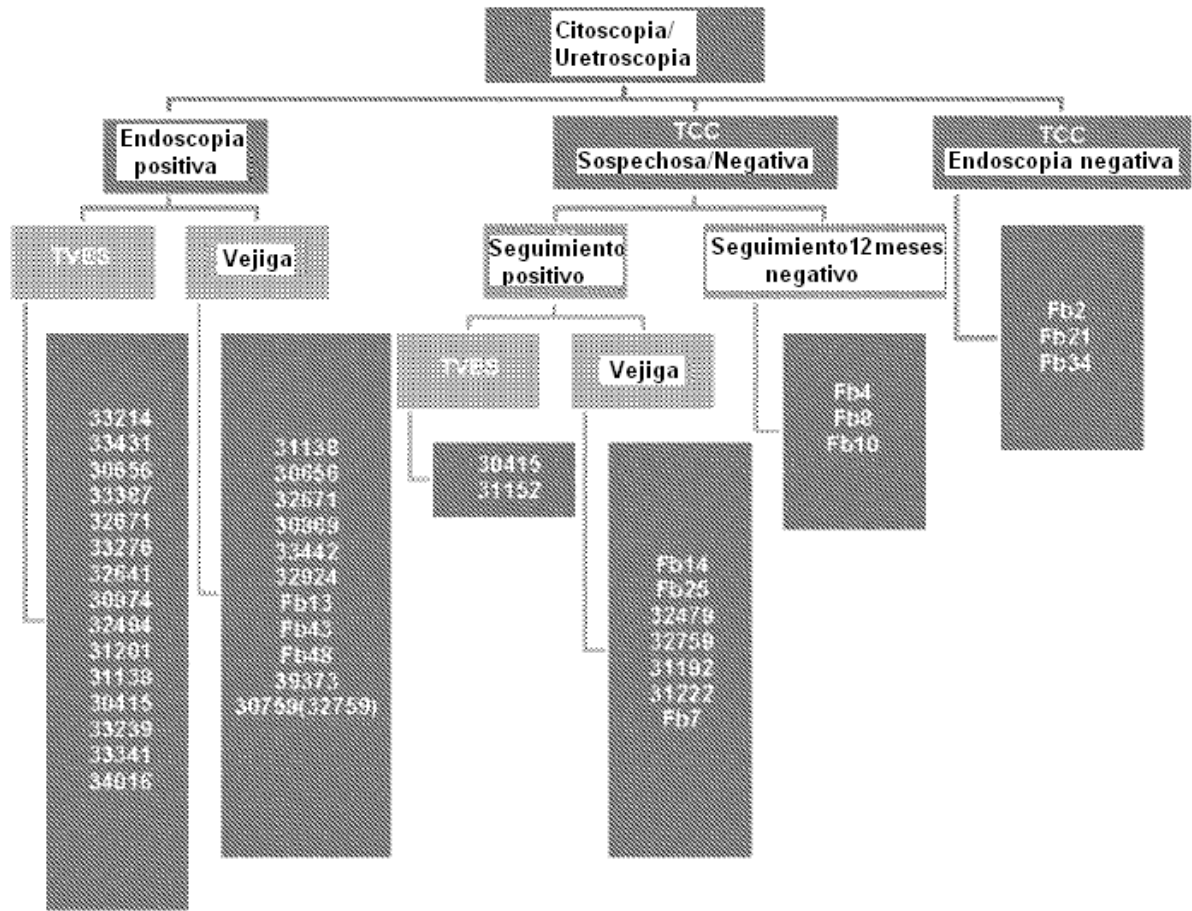


FIGURA 2