

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 460**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/US2012/070745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101611**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12806869 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2798079**

54 Título: **Materiales y métodos para el diagnóstico del cáncer de vejiga y el control de la recurrencia del mismo**

30 Prioridad:

**30.12.2011 US 201161581797 P**

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

**15.02.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**GIAFIS, NICK;  
SOKOLOVA, IRINA;  
SONG, MINGHAO;  
POLICHT, FRANK y  
SITAILO, SVETLANA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 601 460 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

**Materiales y métodos para el diagnóstico del cáncer de vejiga y el control de la recurrencia del mismo**

5 La presente descripción se refiere al diagnóstico del cáncer de vejiga y al control de la recurrencia del mismo, a la determinación de anomalías cromosómicas, y a la hibridación *in situ*, así como a un conjunto de sondas y a un kit útil para el diagnóstico del cáncer de vejiga.

**Antecedentes**

10 El cáncer de vejiga a menudo se desarrolla en personas de cincuenta años o más. Los hombres desarrollan cáncer de vejiga a una tasa de 2 a 3 veces mayor que las mujeres. Asimismo, los fumadores tienen aproximadamente cuatro veces más probabilidades de desarrollar cáncer de vejiga que los no fumadores.

15 El cáncer de vejiga se clasifica groseramente en dos tipos, es decir, el cáncer superficial de vejiga y el cáncer de vejiga infiltrante. El cáncer de vejiga superficial se caracteriza por tumores papilares superficiales que sobresalen hacia fuera de la superficie interna de la vejiga y por una malignidad relativamente baja. El cáncer de vejiga superficial se puede tratar por vía endoscópica, aunque es recurrente en las vejigas de la mitad de los pacientes o más. Por el contrario, el cáncer de vejiga infiltrante se caracteriza por una infiltración profunda, tal como la pared de  
20 la vejiga, y la metástasis a otras partes del organismo. El cáncer de vejiga infiltrante puede ser tratado por medio de extirpación de la vejiga, quimioterapia y radioterapia.

El signo más común de cáncer de vejiga es la hematuria indolora; sin embargo, los síntomas pueden ser similares a los de la cistitis, por ejemplo, aumento de la frecuencia urinaria, dolor durante la micción, o sensación de vaciado  
25 incompleto de la vejiga. El diagnóstico de cáncer de vejiga se lleva a cabo por análisis de orina (diagnóstico citológico), imágenes de rayos x, o endoscopia.

Debido a la falta de marcadores tumorales específicos y altamente sensibles para el diagnóstico precoz, tal como el análisis de orina o de sangre, el cáncer de vejiga se detecta a menudo después de que el cáncer haya progresado.  
30 En consecuencia, se desea una aplicación práctica de un método de detección simple con el uso de marcadores tumorales específicos y altamente sensibles para el cáncer urotelial, y particularmente para el cáncer de vejiga.

Se ha propuesto una variedad de marcadores y métodos para el diagnóstico del cáncer de vejiga. Los ejemplos incluyen la detección de cambios en los niveles de expresión de genes, tales como nucleofosmina/B23 (Publicación de Patente JP (kokai) Núm. 2004-337120 (A)), HURP (Publicación de Patente JP (kokai) Núm. 2004-248508 (A)), Y CYP4B1 o CYP4B2 (Publicación de Patente JP (kokai) Núm. 2002-238599 (A)), la detección de cambios en el nivel de una proteína dada en la orina (Publicaciones de Patente JP (kokai) Núm. 2004-61288 (A) y H7-309895 (1995)(A)), y la detección de cambios en el nivel de Fas soluble en sangre u orina (Publicación de Patente JP (kokai) Núm. 2000-131321 (A); y Patente de los Estados Unidos Núm. 7.759.077). Más recientemente, se ha propuesto la  
40 detección de un aumento en el nivel de proteína CXCL1 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.910.316), la detección de un aumento en el nivel de proteína 184P1E2 (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 7.879.570 y 7.135.549), la detección de la presencia de antígeno carcinoembrionario (CEA; véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.862.997), la detección de un aumento en el nivel de proteína 58P1D12 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.842.458), la detección de la presencia de survivina (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 7.794.926 y 7.776.518), la detección de un aumento en el nivel de 213P1F11 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.563.444), el análisis de la actividad de  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núm. 7.374.902 y 7.374.897), la detección de un aumento en el nivel de 36P6D5 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.223.542), la ausencia de metiltioadenosina fosforilasa (MTAP; véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.192.711), la detección de un aumento en el nivel de SIX1 (Patente de los Estados Unidos Núm. 7.153.700), la detección de un aumento en el nivel de la nucleofosmina/B23 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.011.950), la detección de aumentos en los niveles de sindecán-1 e inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos de tipo 2 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.998.232), la detección de un aumento de antígeno de células madre de la próstata (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.960.443), la detección de la presencia de BLCA-6 (véase la Patente de los Estados Unidos  
55 Núm. 6.951.926), la detección de la presencia de auto-anticuerpos anti-Csk (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.759.204), la detección de un cambio en el número de cromosomas 1, 7, 8, 9, 10, 11, Y y/o X (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.573.042), la detección del nivel de neurotrofina-3, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico derivado de la línea de células de la glía, y/o la triptasa en la orina (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.008.003), y la detección y cuantificación de la expresión de ANXA10, C14orf78, CTSE, CRH, IGF2, KLF9, KRT20, MAGEA3, POSTN, PPP1R14D, SLC1A6, TERT, ASAM y MCM10 (véase la publicación de la solicitud de la Patente Europea. Núm. EP 2138848). Se ha propuesto que la detección de células aneusómicas utilizando un conjunto de sondas compuesta por sondas centroméricas de los cromosomas 3, 7 y 17 y la sonda específica del locus 9p21 es útil para el seguimiento de la recurrencia y la necesidad de continuar el tratamiento (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 7.232.655), Song et al., Cancer Genetics and Cytogenetics, 198, vol.

2, págs. 114-150, 2010, describen un método FISH utilizando sondas para CEP3, CEP7, CEP17 y 9p21 para el diagnóstico del cáncer de vejiga.

La presente descripción tiene por objeto proporcionar un conjunto de marcadores, así como los métodos de utilización y un kit, para la detección de cáncer de vejiga, en particular en pacientes que tienen síntomas de cáncer de vejiga o que tienen cáncer de vejiga recurrente, y el control de la recurrencia de cáncer de vejiga. Este y otros objetos y ventajas, así como características de la invención, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

## Compendio

Se proporciona un método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un paciente. El método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable en condiciones de hibridación. El conjunto de sondas marcadas de forma detectable comprende una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El método también comprende la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas marcadas de forma detectable indica que el paciente tiene cáncer de vejiga.

También se proporciona un método para el control de la recurrencia del cáncer de vejiga en un paciente. El método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable en condiciones de hibridación. El conjunto de sondas marcadas de forma detectable comprende una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El método también comprende la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas marcadas de forma detectable indica que el cáncer de vejiga se ha repetido en el paciente.

También se proporciona un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17.

También se proporciona un kit. El kit comprende un conjunto de sondas que permite el diagnóstico del cáncer de vejiga, o un control de la recurrencia del mismo, en un paciente y las instrucciones para el diagnóstico del cáncer de vejiga, o el control de la recurrencia del mismo, en un paciente. El conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. Las instrucciones comprenden la determinación en una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente de la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas indica que el paciente tiene cáncer de vejiga.

## Descripción detallada

La presente descripción proporciona un conjunto de marcadores, así como los métodos para su utilización y un kit, para la detección del cáncer de vejiga, en particular en pacientes que tienen síntomas de cáncer de vejiga o que tienen cáncer de vejiga recurrente, y para el control de la recurrencia del cáncer de vejiga. El método permite la detección del cáncer de vejiga en sus etapas más tempranas.

Los siguientes términos son relevantes para la presente descripción:

"Aproximadamente" se refiere a una variación de aproximadamente +/- 10% del valor declarado. Se debe entender que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en la presente memoria, se haga referencia específica a la misma o no.

"Cáncer de vejiga" es un cáncer que se forma en los tejidos de la vejiga. Cáncer de vejiga se utiliza en la presente memoria para incluir el carcinoma de células transicionales (TCC), que también se conoce como carcinoma de células uroteliales, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma.

"Biomarcador", tal como se define por los Institutos Nacionales de Salud, es "una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos normales biológicos, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica".

"Sonda de enumeración de cromosomas (CEP)" o "sonda centromérica" es cualquier sonda que permita enumerar el número de cromosomas específicos en una célula. Una sonda de enumeración de cromosomas típicamente reconoce y se une a una región cerca de o en el centrómero (en adelante, "peri-centroméricas") de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitiva (por ejemplo, ADN satélite alfa). Por lo general se considera que el centrómero de un cromosoma representa ese cromosoma, ya que se requiere el centrómero para la segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica particular, puede diferenciarse de la pérdida o ganancia de todo el cromosoma

(aneusomía), en la que normalmente se encuentra, mediante la comparación del número de señales que corresponde al locus concreto (número de copias) con respecto al número de señales correspondientes al centrómero. Un método para realizar esta comparación consiste en dividir el número de señales que representan el lugar geométrico por el número de señales que representan el centrómero. Las razones de menos de uno indican la pérdida relativa o la deleción del locus, y las razones mayores que uno indican una ganancia relativa o una amplificación del locus. Del mismo modo, la comparación se puede hacer entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar las ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma. En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que se puede utilizar alternativamente una sonda de brazo cromosómico para aproximarse a una pérdida o ganancia cromosómica total. Sin embargo, tales sondas no son tan precisas al enumerar los cromosomas, ya que la pérdida de las señales de estas sondas no siempre puede indicar una pérdida de todo el cromosoma. Los ejemplos de las sondas de enumeración de cromosomas incluyen sondas CEP® disponibles comercialmente de Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

"Número de copias" es una medida de ADN, ya sea de un solo locus, de uno o más loci, o de un genoma completo. Un "número de copias" de dos es "de tipo salvaje" en un ser humano (a causa de diploidia, a excepción de los cromosomas sexuales). Un "número de copias" distinto de dos en un ser humano (a excepción de los cromosomas sexuales) se desvía del tipo salvaje. Estas desviaciones incluyen amplificaciones, es decir, aumento en el número de copias, y supresiones, es decir, disminución en el número de copias e incluso ausencia de número de copias.

"Marcado", "marcado con un marcador detectable," y "marcado de manera detectable" se utilizan indistintamente en la presente memoria para indicar que una entidad (p. ej., una sonda) puede ser detectada. "Marca" y "marca detectable" significan un radical unido a una entidad para hacer que la entidad detectable, tal como un radical unido a una sonda para hacer detectable la sonda tras la unión a una secuencia diana. El radical, en sí mismo, puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otro radical. Se pretende que el uso del término "marcado de manera detectable" abarque semejante marcaje. La marca detectable se puede seleccionar de tal manera que la marca genere una señal, que puede ser medida y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de entidad unida. Se conoce una amplia variedad de sistemas de marcaje y/o detección de moléculas, tales como ácidos nucleicos, p. ej., sondas. Se pueden preparar ácidos nucleicos marcados mediante la incorporación o la conjugación de una marca que es directamente o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Los marcadores detectables adecuados incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas, micropartículas, partículas magnéticas, partículas densas de electrones, marcadores de masa, marcadores de espín, haptenos, y similares. En la presente memoria se prefieren los fluoróforos y los agentes quimioluminiscentes.

"Sonda específica del locus" se refiere a una sonda que se une selectivamente a un locus específico en una región de un cromosoma, p. ej., un locus que se ha determinado que experimenta ganancia/pérdida en la metástasis. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes, o ambas, incluyendo los exones, intrones, y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.

"Muestra de ácido nucleico" se refiere a una muestra que comprende ácido nucleico en una forma adecuada para la hibridación con una sonda, tal como una muestra que comprende núcleos o ácidos nucleicos aislados o purificados a partir de dichos núcleos. La muestra de ácido nucleico puede comprender ADN genómico total o parcial (p. ej., uno o varios cromosomas en particular), ARNm total o parcial (p. ej., uno o varios cromosomas o uno o varios genes en particular), o una o varias secuencias seleccionadas. Los cromosomas condensados (tales como los que están presentes en la interfase o metafase) son adecuados para su uso como dianas en la hibridación *in situ*, tal como FISH.

"Corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren en general a un valor de corte que se utiliza para evaluar los resultados de diagnóstico/pronóstico/eficacia terapéutica mediante la comparación de los resultados del análisis frente al corte/nivel predeterminados, el corte/nivel predeterminados, donde el corte/nivel predeterminados ya se han relacionado o asociado con varios parámetros clínicos (p. ej., gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etc.).

"Sonda", en el contexto de la presente descripción, es un oligonucleótido o polinucleótido que se puede hibridar selectivamente con al menos una porción de una secuencia diana en condiciones que permiten o promueven la hibridación selectiva. En general, una sonda puede ser complementaria a la hebra de ADN codificante o efectora (+) de ADN o complementaria a la hebra de ADN no codificante o anti-sentido (-) (a veces referida como "complementaria inversa"). Las sondas pueden variar significativamente de longitud. En algunas aplicaciones se puede preferir una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, tal como aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nucleótidos, p. ej., de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, mientras que se puede preferir una longitud de aproximadamente 50-1x10<sup>5</sup> nucleótidos para sondas cromosómicas y se puede preferir una longitud de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 800.000 nucleótidos para las sondas específicas de locus.

"Hibridar de manera selectiva con" (así como "hibridación selectiva", "hibridar específicamente con", e "hibridación específica"), en el contexto de la presente descripción, se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente con una secuencia de nucleótidos particular

en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará preferentemente con su secuencia diana, y en menor medida, o en absoluto, con otras secuencias no diana. Una "hibridación rigurosa" y unas "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (p. ej., en forma de matriz, hibridación de Southern, hibridación Northern, o FISH) son dependientes de la secuencia, y se diferencian en diferentes condiciones. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY (1993) ("Tijssen"). En general, la hibridación y las condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más baja que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la  $T_m$  para una sonda concreta. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios, que tienen más de 100 residuos complementarios, en una matriz o en un filtro en una transferencia Southern o Northern es de 42°C utilizando soluciones de hibridación convencionales (véase, p. ej., Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (2001)).

"Secuencia diana", "región diana" y "diana de ácido nucleico" se refieren a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en una localización cromosómica específica cuya pérdida y/o ganancia, por ejemplo, se está determinando.

La terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no se pretende de otro modo que sean limitantes.

#### *Método de diagnóstico de cáncer de vejiga*

Se proporciona un método de diagnóstico de cáncer de vejiga en un paciente, tal como un paciente con hematuria y/u otros signos y/o síntomas de cáncer de vejiga. El método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprenden o que consisten en, una sonda específica del locus de c-myc (8q24), una sonda específica del locus de Aurora quinasa (AURKA; 20q13, específicamente 20q13.2), una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17 en condiciones de hibridación, y la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas marcadas de forma detectable indica que el paciente tiene cáncer de vejiga. Por lo tanto, en vista de lo anterior, la detección de anomalías cromosómicas que implican a c-myc (8q24) y Aurora quinasa (AURKA; 20q13); c-myc (8q24) y el cromosoma 7; c-myc (8q24) y el cromosoma 17; AURKA (20q13) y el cromosoma 7; AURKA (20q13) y el cromosoma 17; el cromosoma 7 y el cromosoma 17; c-myc (8q24), AURKA (20q13), y el cromosoma 7; c-myc (8q24), AURKA (20q13), y el cromosoma 17; AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17; el cromosoma 7, el cromosoma 17, y c-myc (8q24); o c-myc (8q24), AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que el paciente tiene cáncer de vejiga.

El método puede ser utilizado para detectar o controlar el cáncer de vejiga recurrente. Por lo tanto, también se proporciona un método de control de la recurrencia de cáncer de vejiga en un paciente. El método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable en condiciones de hibridación. El conjunto de sondas marcadas de forma detectable comprende, o consiste en, una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El método también comprende la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas marcadas de forma detectable indica que el cáncer de vejiga se ha repetido en el paciente. Por lo tanto, en vista de lo anterior, la detección de anomalías cromosómicas que implican a c-myc (8q24) y Aurora quinasa (AURKA; 20q13); c-myc (8q24) y el cromosoma 7; c-myc (8q24) y el cromosoma 17; AURKA (20q13) y el cromosoma 7; AURKA (20q13) y el cromosoma 17; el cromosoma 7 y el cromosoma 17; c-myc (8q24), AURKA (20q13), y el cromosoma 7; c-myc (8q24), AURKA (20q13), y el cromosoma 17; AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17; el cromosoma 7, el cromosoma 17, y c-myc (8q24); o c-myc (8q24), AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que el cáncer de vejiga se ha repetido en el paciente. En general, para los análisis en los que se puede realizar una repetición del ensayo (p. ej., el control de la recurrencia de la enfermedad), se obtiene una segunda muestra de ensayo o una muestra de ensayo posterior en un período de tiempo después de haber obtenido la primera muestra de ensayo del sujeto. Específicamente, se puede obtener una segunda muestra de ensayo del sujeto semanas o años después de haber obtenido la primera muestra de ensayo del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de ensayo se puede obtener del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente

22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas 34 semanas, aproximadamente 35 semanas 36 semanas aproximadamente, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años o aproximadamente 10,0 años después de haber obtenido la primera muestra de ensayo del sujeto.

El método anterior se puede llevar a cabo usando cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, el método anterior se lleva a cabo utilizando la hibridación *in situ*, tal como la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Preferiblemente, cada sonda se marca de manera detectable con una marca distinta, tal como un fluoróforo diferente.

Quando los métodos anteriores se llevan a cabo por medio de hibridación *in situ*, en la que cada sonda está marcada de forma detectable (y, cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente con la misma muestra, marcadas de manera distinta), tal como mediante FISH, en la que cada sonda está marcada con un fluoróforo, los métodos se llevan a cabo típicamente en una muestra de células uroteliales, que se obtienen a partir de una muestra de orina de micción o, alternativamente, un lavado de la vejiga (p. ej., con agua o solución salina). Si se obtienen las células de una muestra de orina, preferiblemente la muestra de orina se obtiene de la primera orina de la mañana del paciente. Las células contenidas en la orina o el lavado de vejiga se pueden cosechar en cualquier manera adecuada conocida en la técnica. Preferiblemente, las células se recogieron por centrifugación y resuspensión de las células sedimentadas. Típicamente, las células se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Una vez recogidas las células, se pueden preparar para la hibridación *in situ* de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las células pueden ser analizados en un corto período de tiempo después de la cosecha. Alternativamente, las células se pueden fijar (p. ej., en solución de ácido y alcohol, tal como metanol:ácido acético glacial (3:1), solución de ácido y acetona, aldehídos, tales como formaldehído, paraformaldehído, y glutaraldehído, o una solución de formalina tamponada neutra (formaldehído en una solución acuosa de fosfato de sodio)) y analizar en un momento posterior. Si se desea, se pueden tratar (p. ej., con ARNasa y pepsina) células frescas (las células frescas se pueden cultivar durante 1-3 días y se puede añadir un bloqueador, como Colcemid, al cultivo para bloquear las células en metafase, durante la cual los cromosomas están muy condensados y pueden ser visualizados), congeladas, o fijadas (p. ej., fijadas en etanol o formalina e incluidas en parafina) para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico diana (p. ej., ADN) y reducir la unión no específica, y después someterlas a hibridación con una o más sondas, lavando para eliminar cualquier sonda sin unir, y a detección de las sondas hibridadas. Por ejemplo, se puede aplicar una suspensión de células en forma de una única capa sobre un soporte sólido adecuado para el examen por microscopía, tal como un portaobjetos o un cubreobjetos, y se puede medir la densidad celular mediante un microscopio de contraste de la luz o de fase. Se puede depositar una muestra de orina de micción que se recoge y se fija en una solución tal como PreservCyt en un portaobjetos (UroCyt, disponible de Hologic, Marlborough, MA) utilizando un sistema de depósito de células tal como ThinPrep 2000. Los portaobjetos se pueden preparar y empapar en deshidratante al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los portaobjetos se pueden secar en una posición vertical sobre una mesa de laboratorio durante aproximadamente 30 minutos a una hora antes de la hibridación. A continuación el portaobjetos se trata previamente en 2X citrato de sodio salino (SSC) a 72°C durante aproximadamente 2 minutos y se digiere con proteasa (0,1 a 0,5 mg/ml en HCl 10 mM) a 37°C durante aproximadamente 10 minutos. Después de la digestión con la proteasa, el portaobjetos se puede enjuagar en 1X solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente, fijar en solución de formalina tamponada neutra al 1% durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente, aclarar de nuevo en 1X PBS durante aproximadamente cinco minutos a temperatura ambiente, pasar a través de etanol graduado, y secar. Preferiblemente, el portaobjetos se pone en contacto con una o más sondas desnaturalizadas simultáneamente a 73°C durante aproximadamente dos minutos en un ThermoBrite Denaturation/Hybridization (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) y se hibrida a 37°C durante la noche (aproximadamente 16-24 horas). Después de la hibridación, los cubreobjetos se retiran de los portaobjetos y los portaobjetos se sumergen a continuación en un tampón de lavado principal durante aproximadamente cinco minutos a 73°C y luego un tampón de lavado secundario durante aproximadamente un minuto a temperatura ambiente. Los portaobjetos se secan y se montan con una solución I "anti-desvanecimiento" de hidrato de dihidrocloruro de 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) II (Abbott Molecular, Inc.). Preferiblemente, el portaobjetos se analiza con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros de paso de banda individuales (Abbott Molecular, Inc.).

Alternativamente, una sección (aproximadamente 5 µm de espesor) de una muestra (FFPE) fijada con formalina, incluida en parafina de las células uroteliales (p. ej., de un tumor sospechoso) se puede montar en un portaobjetos, tal como un portaobjetos cargado positivamente SuperFrost Plus (disponible de ThermoShandon, Pittsburgh, PA), cocer a 56-60°C durante la noche, des-parafinar utilizando Hemo-de, CtriSolv, o xileno durante cinco minutos, sumergir en 1 x solución salina de citrato de sodio, pH 6,3, a 80°C durante 35 minutos, y lavar en agua durante tres minutos. Después de la digestión con proteasa (1-4 mg de pepsina/mL, tal como 1,5 mg de pepsina/mL, y disuelto en 0,1-0,2 N de HCl) a 37°C durante 15 minutos, la sección se puede enjuagar en agua durante tres minutos, pasar a través de etanol graduado, y secar. Preferiblemente, la hibridación con una o más sondas como las descritas anteriormente se realiza a 37°C durante 16-24 horas en un horno automático de co-desnaturalización (HYBrite o ThermoBrite/Hybridization System, Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (tales métodos típicamente implican la desnaturalización de las sondas y los ácidos nucleicos diana). Después de la hibridación, la sección se coloca preferiblemente en tampón de lavado (2 x solución salina de citrato de sodio/NP40 al 0,3%; disponible de Abbott Molecular, Inc.) a temperatura ambiente durante 2-10 minutos para eliminar el cubreobjetos y después se sumerge en tampón de lavado de 73°C durante dos minutos, se seca, y se monta con solución I "anti-desvanecimiento" de hidrato de dihidrocloruro de 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Abbott Molecular, Inc.). Preferiblemente, el portaobjetos se analiza con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros de paso de banda individuales (Abbott Molecular, Inc.).

Antes de la detección, las células de una muestra pueden ser opcionalmente pre-seleccionados basándose en anomalías citológicas evidentes. La pre-selección identifica las células sospechosas, lo que permite que el escrutinio se centre en esas células. La pre-selección permite el escrutinio rápido y aumenta la probabilidad de que un resultado positivo no se pierda. Durante la pre-selección, las células de una muestra biológica se pueden colocar en un portaobjetos de microscopio y escanear visualmente para detectar las anomalías citológicas comúnmente asociadas con células displásicas y neoplásicas. Tales anomalías incluyen anomalías en el tamaño nuclear, la forma nuclear, y la tinción nuclear, según la evaluación de la contratinción núcleos con colorantes o tintes de ácido nucleico, tales como yoduro de propidio o dicloruro de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), por lo general después de la hibridación de las sondas a sus ADN diana. Típicamente, las células neoplásicas albergan los núcleos que se agrandan, de forma irregular, y/o muestran un patrón de tinción nuclear moteado. El yoduro de propidio, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante específico de ADN rojo fluorescente que se puede observar en un pico de longitud de onda de emisión de 614 nm. DAPI, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, es tinte específico de ADN azul fluorescente que puede ser observado en un pico de longitud de onda de emisión de 452 nm con un filtro DAPI a bajo aumento. En este caso, sólo aquellas células pre-seleccionadas para la detección se someten a recuento de pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Preferiblemente, las células pre-seleccionadas en el orden de al menos 20, y más preferiblemente al menos 30-40, en número son elegidas para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

Alternativamente, una zona que evidencia un cierto nivel de displasia o una lesión sospechosa puede ser localizada utilizando el filtro DAPI a bajo aumento e inspeccionado cuidadosamente para determinar la presencia de núcleos que albergan un número de copias anormales de cualquier sonda. En una célula normal, se detectarán dos copias de una sonda dada. En una célula anormal, se detectarán más o menos copias de una sonda dada. Las zonas con los cambios más significativos en el número de copias se seleccionan preferiblemente para la enumeración. Siempre que sea posible, se seleccionan tres zonas anormales y, dentro de cada zona anormal, se analizan 10 núcleos aleatorios a alta potencia (60 x 100 x objetivo). Preferiblemente, los núcleos no son solapantes y albergan señales suficientemente brillantes.

Alternativamente, las células de detección se pueden elegir independientemente de las características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se solapan en una zona o zonas determinadas en un portaobjetos de microscopio se pueden evaluar para determinar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Como un ejemplo adicional, se pueden elegir las células en el portaobjetos, p. ej., las células que muestran una morfología alterada, del orden de al menos aproximadamente 50, y más preferiblemente al menos aproximadamente 100, en número que aparecen en orden consecutivo en un portaobjetos del microscopio para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

Las copias de c-myc (8q24), AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17 se cuentan y se registran. La presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de c-myc, AURKA, el cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que el paciente tiene cáncer de vejiga.

Por lo tanto, estos métodos comprenden poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenidas de un paciente, p. ej., una muestra de ácido nucleico, con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica para el locus de c-myc (8q24), una sonda específica para el locus de AURKA (20q13), una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17 en condiciones que permiten (o promueven) que la sonda se una selectivamente con su secuencia de ácido nucleico diana y forme un complejo de hibridación estable. Tales métodos comprenden además la detección de la formación

del complejo de hibridación y el recuento del número de complejos de hibridación. En vista del número de complejos de hibridación que comprenden c-myc (8q24), AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17, el método comprende adicionalmente la determinación del número de copias de c-myc (8q24), AURKA (20q13), el cromosoma 7, y el cromosoma 17. Si se desea, se puede comparar el número de copias con un corte pre-determinado, en donde un número de copias mayor que el corte pre-determinado (es decir, una ganancia) y un número de copias menor que el corte predeterminado (es decir, una pérdida), según sea el caso, indica que el paciente tiene cáncer de vejiga.

Mientras que la desparafinación, el tratamiento previo, la tinción, y el lavado de diapositivas rutinario también se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, el uso de un sistema automatizado, sin embargo, tal como VP 2000 Processor (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL), disminuye la cantidad de tiempo necesaria para preparar los portaobjetos para su evaluación. Los portaobjetos se pueden preparar en grandes lotes (p. ej., 50 portaobjetos), en oposición a lotes pequeños (p. ej., 4 portaobjetos) cuando se utilizan jarras de Coplin convencionales para el lavado post-hibridación. Además, la puntuación de los portaobjetos se puede automatizar completamente utilizando la formación de imágenes automatizada, reduciendo así la cantidad de tiempo invertida para el análisis de la muestra. La automatización completa también permite el uso de un algoritmo de formación de imágenes que captura más células anormales con más frecuencia y de forma constante. También, mientras se puede utilizar que cualquier método adecuado de preparación de los portaobjetos conocido en la técnica, los portaobjetos se preparan preferiblemente usando ThinPrep 2000 (Hologic, Inc., Bedford, MA), que genera monocapas de células más uniformes y consistentes.

Otros métodos ya conocidos en la técnica o actualmente en desarrollo pueden requerir el uso de una muestra de células uroteliales que son distintas de las células fijadas en formalina e incluidas en parafina, p. ej., células frescas o congeladas, células homogeneizadas, células lisadas, o ácidos nucleicos aislados o purificados (p. ej., una "muestra de ácido nucleico", tal como ADN) de las células uroteliales (se pretende que "muestra de células uroteliales" según se utiliza en la presente memoria abarque todas las formas de una muestra de células uroteliales que permiten la determinación del número de copias y la ganancia/pérdida). Los núcleos también pueden ser extraídos de secciones gruesas de los especímenes incluidos en parafina para reducir los artefactos del truncamiento y eliminar el material extraño incluido. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se cosechan y se procesan antes de la hibridación utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tal procesamiento incluye típicamente el tratamiento con proteasa y una fijación adicional en una solución de aldehído, tal como formaldehído.

Los ejemplos de los métodos que pueden ser utilizados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), Q-PCR en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA), barrido densitométrico de productos de PCR, PCR digital, opcionalmente con pre-amplificación del gen o de los genes/lo de la región o las regiones cromosómica para los cuales se debe determinar el número de copias (véanse, p. ej., Vogelstein et al., PNAS USA 96: 9236-9.241 (1999); Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2005/0252773; y Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2009/0069194), La hibridación genómica comparativa (CGH; véase, p. ej., Kallioniemi et al., Science 258: 818-821 (1992); y Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. WO 93/18186), análisis de microsatélites o alelotipos Southern, matrices, micromatrices (Carter, Nature Genetics Supplement 39: S16-S21 (Julio de 2007)), hibridación de sondas amplificables múltiplex (MAPH), amplificación de sondas dependientes de la ligación multiplex (MLPA; véase, p. ej., Schouten et al., Nucleic Acids Res. 30: e 57 (2002)), cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (dHPLC; Kumar et al., J. Biochem. Biophys. Methods 64 (3): 226-234 (2005)), hibridación dinámica específica de alelos (DASH), medición de longitudes de sondas fluorescentes en ADN genómico peinado (Herrick et al., PNAS 97 (1): 222-227 (2000)), pirosecuenciación de secuencias desconocidas de referencia (RQPS; Liu et al., Cold Spring Harb. Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot5491 (2010)), mapeo de extremos de fósmidos en una secuencia de referencia (basado en tecnología capilar), secuenciación microelectroforética y de nanoporos (véase, p. ej., Service, Science 311: 1544-1546 (2006); y Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5:335-344 (2004)), y similares.

La desnaturalización de dianas de ácido nucleico para el análisis mediante hibridación *in situ* y métodos similares normalmente se realiza de tal manera que se conserve la morfología celular. Por ejemplo, el ADN cromosómico puede ser desnaturalizado mediante pH elevado, calor (p. ej. temperaturas de aproximadamente 70-95°C), disolventes orgánicos (p. ej., formamida), y combinaciones de los mismos. Las sondas, por otra parte, se pueden desnaturalizar por calor en cuestión de minutos.

Después de la desnaturalización, se lleva a cabo la hibridación. Las condiciones para hibridar específicamente las sondas a sus dianas de ácido nucleico generalmente incluyen combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un procedimiento de hibridación dado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones pueden ser fácilmente determinadas por un experto normal en la técnica. Tales condiciones suelen incluir temperatura controlada, fase líquida, y contacto entre una sonda y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores, incluyendo la concentración de sonda, la longitud de la diana, el contenido de G-C de la diana y la sonda, la composición del disolvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente, la sonda y la diana se

pueden someter a condiciones de desnaturalización mientras están en contacto entre sí, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede lograr con la posterior incubación de la sonda/muestra, por ejemplo, en una fase líquida de una mezcla con una relación en volumen de aproximadamente 50:50 de 2 a 4 x SSC y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55°C durante un tiempo que se encuentra ilustrativamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 42°C durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente de bloqueo, tal como un ácido nucleico de bloqueo sin marcar, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.756.696 (cuyo contenido se incorpora a la presente memoria como referencia en su totalidad, y en concreto para la descripción de la utilización del ácido nucleico de bloqueo). Se pueden emplear fácilmente otras condiciones para la hibridación específica de las sondas a sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como será evidente para un experto en la técnica. Los protocolos de hibridación se describen, por ejemplo, en Pinket et al., PNAS USA 85: 9138- 9142 (1988); In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994); y Kallioniemi et al., PNAS USA 89: 5321-5325 (1992).

Al término de un período de incubación adecuado, se puede eliminar la unión no específica de las sondas cromosómicas con una muestra de ADN por medio de una serie de lavados. La temperatura y las concentraciones de sal se eligen convenientemente para una rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y se puede determinar mediante la hibridación de sondas sistemáticamente a muestras de composición genética conocida. En general, los lavados de alta rigurosidad se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 0,2 x a aproximadamente 2 x SSC y de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico, tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de rigurosidad más baja, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura inferior con un aumento de la concentración de sal.

Cuando se utilizan sondas o composiciones de la sonda marcadas con fluoróforo, el método de detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Se puede utilizar cualquier método de formación de imágenes microscópicas adecuado junto con los métodos descritos en la presente memoria para observar múltiples fluoróforos. En el caso en el que se emplea la microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden visualizar bajo luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o varios filtros apropiados. Alternativamente se pueden utilizar sistemas de formación de imágenes digitales automatizados, tales como los sistemas MetaSystems, BioView, Leica, Ikonisys, o Applied Imaging.

Dependiendo del método empleado, se puede utilizar un sistema de análisis de imágenes digital para facilitar la visualización de los resultados y para mejorar la sensibilidad de detección de pequeñas diferencias en la intensidad de fluorescencia. Un sistema ilustrativo es QUIPS (un acrónimo de sistema de procesamiento de imágenes cuantitativo), que es un sistema de análisis de imágenes automatizado basado en un microscopio de fluorescencia convencional equipado con una fase automatizada, control de foco y rueda de filtros (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY). La rueda de filtros está montada en la trayectoria de excitación de fluorescencia del microscopio para la selección de la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en el bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin cambio de registro de las imágenes. El microscopio tiene dos puertos para cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, Calif.) para la visualización de imágenes de vídeo sensible a alta velocidad, que se utiliza para encontrar zonas interesantes sobre un portaobjetos, así como para el enfoque. El otro puerto de cámara tiene una cámara CCD refrigerada (modelo 200 de Photometrics Ltd., Tucson, AZ), que se utiliza para la adquisición de imágenes reales a alta resolución y sensibilidad. La cámara CCD refrigerada está interconectada a una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un bus VME. Toda la adquisición de imágenes multicolores se controla mediante un paquete de soporte lógico de procesamiento de imágenes SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Países Bajos).

En la matriz CGH (aCGH) las sondas se inmovilizan en lugares distintos sobre un sustrato y no están marcadas (véase, p. ej., Publicación de la Solicitud de Patente Internacional Núm. WO 96/17958). En lugar de ello, los ácidos nucleicos de la muestra, que comprenden uno o varios ácidos nucleicos diana, se marcan. Cualquiera de los ácidos nucleicos de la muestra se marca antes de la hibridación o se marcan de manera detectable los complejos de hibridación. En aCGH de color doble o múltiple, la matriz de sondas se hibrida simultáneamente o secuencialmente a dos o más colecciones de ácidos nucleicos diana marcados de forma diferente.

En vista de lo anterior, un procedimiento manual puede implicar la recogida de células de la orina y la fijación de las mismas en el reactivo de Carnoy. Se pueden preparar portaobjetos de doce pocillos que contienen gotas de 3  $\mu$ L, 10  $\mu$ L y 30  $\mu$ L gotas de una muestra de suspensión celular. Los portaobjetos se pueden tratar previamente de forma manual (opcionalmente, pre-tratados utilizando VP2000 (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)), hibridar de forma

manual (opcionalmente, hibridar usando Thermobrite Denaturation/Hybridization System (Abbott Molecular, Inc.)), y lavar manualmente. Utilizando la microscopía, se pueden seleccionar células anormales, y se pueden enumerar las sondas. Preferiblemente, se utiliza un procedimiento automatizado. Un procedimiento automatizado puede incluir la recogida de células de la orina y la fijación de las mismas en PreservCyt (Hologic, Inc., Bedford, MA). Se pueden preparar portaobjetos ThinPrep (Hologic, Inc.), pre-tratados utilizando VP2000 (Abbott Molecular, Inc.), e hibridar empleando Thermobrite Denaturation/Hybridization System (Abbott Molecular, Inc.). Los portaobjetos se pueden lavar y, mediante microscopía, se pueden identificar las células anormales, y se pueden enumerar las sondas. Se pueden escanear previamente las células, clasificarlas y obtener imágenes, lo que permite la enumeración automática de la sonda y el examen a distancia. El uso de ThinPrep da como resultado un fondo más limpio, la reducción de la pérdida de células, una morfología de células más grandes y más planas, y una mejor calidad de la señal.

#### Sondas

También se proporciona un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende, o consiste en, una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17.

Las sondas adecuadas para su utilización como sondas específicas del locus se hibridan a una región específica en un cromosoma que contiene un gen. La sonda específica del locus del gen c-myc (8q24) puede hibridar con la totalidad o una porción del gen c-myc en Q24 en el cromosoma 8 (es decir, 8q24). La sonda específica del locus del gen AURKA (20q13) puede hibridar con la totalidad o una porción del gen AURKA en q13 en el cromosoma 20 (es decir, 20q13, específicamente 20q13.2). Se encuentra disponible un clon de AURKA en M.D. Anderson Cancer Center de la Universidad de Texas. Alternativamente, se puede utilizar una sonda que hibrida con la totalidad o parte de 20q13 y una región adyacente en uno o ambos lados de 20q13. Dicha sonda, por ejemplo, puede hibridar con la totalidad o una porción del gen ZNF217 de 17,5 kb y/o la totalidad o una parte del locus D20S108, que está situado en 20q12.

Las sondas adecuadas para su uso como sondas cromosómicas se hibridan con ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de cromosomas de primates contienen una familia compleja de largas repeticiones en tándem de ADN, que se componen de una longitud del monómero de repetición de aproximadamente 171 pares de bases (pb), que se conoce como ADN satélite  $\alpha$ . Las sondas cromosómicas tienen típicamente aproximadamente  $50\text{-}1 \times 10^5$  nucleótidos de longitud. Las sondas más largas típicamente comprenden fragmentos más pequeños de aproximadamente 100 a 500 nucleótidos de longitud. La sonda para el cromosoma 7 puede hibridar con el ADN satélite alfa situado en el centrómero del cromosoma 7, mientras que la sonda para el cromosoma 17 puede hibridar con el ADN satélite alfa situado en el centrómero del cromosoma 17. Los ejemplos de tales sondas incluyen CEP7 y CEP17.

Las sondas de enumeración del cromosoma (CEP) y las sondas específicas del locus que se dirigen a una región o subregión cromosómica pueden ser obtenidas comercialmente o pueden ser fácilmente preparadas fácilmente por los expertos en la técnica. Tales sondas se pueden obtener comercialmente de Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Las sondas cromosómicas se pueden preparar, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos de proteínas (PNA), ADN humanos clonados tales como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), y cromosomas artificiales de PI (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Se puede obtener una región de interés a través de la amplificación por PCR o la clonación. En otra realización, las sondas cromosómicas pueden ser sondas oligo. Alternativamente, las sondas cromosómicas se pueden preparar sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Cuando se desea el redireccionamiento de un locus de un gen particular, se pueden preferir las sondas que hibridan a lo largo de toda la longitud del gen diana, aunque no es necesario. Se puede diseñar una sonda específica del locus para hibridar con un oncogén o un gen supresor de tumor, cuya aberración genética se correlaciona con la metástasis, p. ej., c-myc.

Las sondas se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica. Las sondas se pueden sintetizar o producir de forma recombinante.

Preferiblemente, las sondas se marcan de forma detectable, y, cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente en la misma muestra, preferiblemente cada sonda está marcada de forma distinta. Preferiblemente, las sondas se marcan de forma detectable con fluoróforos, y, cuando se utilizan dos o más sondas de forma simultánea o secuencial en la muestra, preferiblemente cada sonda está marcada de manera distinta con un fluoróforo. Los ejemplos de los fluoróforos preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácido 7-amino-4-metil-cumarin-3-acético (AMCA), 5-carboxi-X-rodamina, 6-carboxi-X-rodamina, lisamina-rodamina B, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-isotiocianato, tetrametilrodamina-6-isotiocianato, 5-carboxiltetrametil-rodamina, 6-

carboxitetrametil-rodamina, ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico, ácido N-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropionico, eosina-5-isotiocianato, eritrosina-5-isotiocianato, SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.), ROJO TEXAS (Molecular Probes, Inc.), Lucifer amarillo, y acetilacida azul CASCADES (Molecular Probes, Inc.). La marca concreta utilizada no es crítica; deseablemente, sin embargo, la marca concreta no interfiere en la hibridación *in situ* de la sonda y la detección de la marca en cualquier otra sonda. Deseablemente la marca es detectable a un número de copias tan bajo como sea posible para maximizar la sensibilidad del análisis y para ser detectable por encima de cualquier señal de fondo. También deseablemente, la marca proporciona una señal muy localizada, proporcionando así un alto grado de resolución espacial.

La unión de fluoróforos a sondas de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica y se puede lograr por cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido en particular, por ejemplo, y el nucleótido marcado se puede incorporar a la sonda utilizando técnicas convencionales tales como la traslación de muescas, el cebado aleatorio (Rigby et al., J. Mol. Biol. 113:237 (1997)), el marcaje por PCR, el marcaje de los extremos, el marcaje directo mediante modificación química de determinados residuos, tales como los residuos de citosina (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.491.224), y similares. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente a los nucleótidos con brazos conectores activados, que han sido incorporados a la sonda, por ejemplo, a través de un conector a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han sometido a transaminación. Los métodos para marcar sondas se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.491.224 y como describen Morrison et al., en Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications, Capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets", págs. 21-40, Fan, Ed., Humana Press (2002), incorporados ambos a la presente memoria como referencia por sus descripciones de sondas de marcaje.

Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros agentes o colorantes en lugar de fluoróforos como radicales que contienen marcas. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, radicales que contienen marcas radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Los agentes que son detectables con luz visible incluyen colorantes de cianina. Alternativamente, se pueden utilizar radicales de detección que se visualizan por medios indirectos. Por ejemplo, las sondas se pueden marcar con biotina o digoxigenina utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, y luego se pueden procesar adicionalmente para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr a través de la posterior unión de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización caso y la discriminación de las sondas se pueden lograr como se describe a continuación.

Las sondas cromosómicas hibridadas a regiones diana se pueden visualizar alternativamente por medio de reacciones enzimáticas de radicales marcados con sustratos adecuados para la producción de productos coloreados insolubles. Cada sonda se puede discriminar de otras sondas del conjunto por la elección de un radical de marcaje distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar a través de la posterior incubación con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. El 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y el nitroazul de tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que el diaminobenzoato sirve como sustrato para la HRP.

#### *Kit*

También se proporciona un kit. El kit comprende, o consiste en, (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico del cáncer de vejiga, o el control de la recurrencia del mismo, en un paciente y (b) instrucciones para el diagnóstico del cáncer de vejiga, o el control de la recurrencia del mismo, en un paciente. El conjunto de sondas comprende, o consiste en, una sonda específica del locus de c-myc, una sonda específica del locus de AURKA, una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. Las instrucciones comprenden la determinación en una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente de la presencia de anomalías cromosómicas, en donde la presencia de anomalías cromosómicas que implican al menos dos de las sondas indica que el paciente tiene cáncer de vejiga. Tales kits pueden comprender adicionalmente, o consistir en, agentes de bloqueo u otras sondas, diversas marcas o agentes de marcaje para facilitar la detección de las sondas, reactivos para la hibridación (p. ej., tampones), una expansión de la metafase, y similares.

#### **Ejemplo**

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la presente invención. No se pretende que el ejemplo limite el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

#### **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe el análisis de portaobjetos con especímenes utilizando el conjunto de sondas que comprende una sonda específica del locus de c-myc (8q24), una sonda específica del locus de AURKA (20q13, específicamente 20q13.2), una sonda centromérica para el cromosoma 7, y una sonda centromérica para el cromosoma 17.

5 Cada muestra de células uroteliales se colocó en un vial ThinPrep (Hologic, Inc.), y se añadió PreservCyt (Hologic, Inc., Bedford, MA) al vial para asegurar un volumen de 20 mL. Se utilizó un procesador ThinPrep T-2000 (Hologic, Inc.) para la preparación de la muestra. Los portaobjetos se prepararon y se empaparon en deshidratante al 95% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, los portaobjetos se secaron en una posición vertical sobre una mesa de laboratorio durante aproximadamente 30 minutos a una hora antes de la hibridación. Los portaobjetos fueron evaluados bajo microscopio óptico para determinar la celularidad y la morfología nuclear.

10 La sonda específica del locus de c-myc (8q24) se marcó con Red, mientras que la sonda específica del locus de AURKA (20q13) se marcó con Gold, la sonda centromérica para el cromosoma 7 se marcó con Green, y la sonda centromérica para el cromosoma 17 se marcó con Aqua.

15 Se utilizó el siguiente protocolo para la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Los portaobjetos se colocaron en 2 x SSC a 72°C durante 2 minutos, 0,1 a 0,5 mg/ml de pepsina (en HCl 10 mM) a 37°C durante 10 minutos, 1 x PBS (solución salina tamponada con fosfato) a temperatura ambiente durante 5 minutos, NBF al 1% a temperatura ambiente durante 5 minutos, 1 x PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos, etanol del 70% a temperatura ambiente durante 1 minuto, etanol del 85% a temperatura ambiente durante 1 minuto, y etanol del 100% a temperatura ambiente durante 1 minuto, y después se secó al aire. Después de ser secado al aire, cada portaobjetos se puso en contacto con 5 µL de mezcla de sonda y se cubrió con un cubreobjetos de 18 x 18 mm. Los portaobjetos se co-desnaturalizaron a 73°C durante dos minutos en un ThermoBrite Denaturation/Hybridization System (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) y se hibridaron a 37°C durante la noche (16-24 horas). Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron con 0,4 x SSC con NP40 al 0,3% durante dos minutos a 73°C y 2 x SSC con NP40 al 0,1% durante un minuto a temperatura ambiente. A continuación, se añadió DAPI II a los portaobjetos, y los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 30 mm. Se revisaron los portaobjetos mediante microscopía de fluorescencia con filtros Red, Gold, Green, Aqua y DAPI.

25 Los portaobjetos se escanearon utilizando un sistema de escaneo automático Ikonisys (Ikonisys, Inc., New Haven, CT). Los datos se muestran en la Tabla 1.

30

Tabla 1

Diagnóstico	Diagnóstico Rechazado por Panel de Sondas	Diagnóstico confirmado por Panel de Sondas
Alto Grado (Histología-biopsia) <sup>1</sup>	2	18
Bajo Grado (Histología-biopsia) <sup>1</sup>	3	24
Bajo/Alto Grado (Histología-biopsia)	0	1
NPUBPM (Histología-biopsia) <sup>2</sup>	0	4
Negativo (Histología-biopsia)	10	15
Negativo (citología)	3	38
Positivo (citología)	0	16
Total	18	116
<sup>1</sup> Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2004		
<sup>2</sup> Neoplasia papilar urotelial de bajo potencial maligno		

35 La sensibilidad del panel de sondas fue de 76,2% (48/63) (intervalo de confianza de 95%) incluyendo NPUBPM como cáncer, y 76,3% excluyendo NPUBPM como cáncer. La especificidad del panel de sondas fue de 86,8% (46/53) (intervalo de confianza de 95%).

Cincuenta y dos de los 58 especímenes confirmados por biopsia, que consistían en 21 de alto grado, 28 de bajo grado, dos no determinados, y siete NPUBPM, también fueron sometidos a ensayo utilizando el panel de sondas. El diagnóstico fue confirmado para 47/52 muestras y rechazado para 5/52 especímenes.

40 La invención descrita de manera ilustrativa en la presente memoria se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o limitación, que no se describa específicamente en la presente memoria. Así, por ejemplo, cada caso de la presente memoria de cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste

esencialmente en" y "que consiste en" puede sustituirse por cualquiera de los otros dos términos. Del mismo modo, las formas singulares "un", "uno" y "una" y "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo, que se describen en la presente memoria y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción.

5

Los términos y expresiones que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de limitación. En este sentido, cuando ciertos términos se definen en "Definiciones" y se definen, se describen, o se comentan de otro modo en otra parte de la "Descripción detallada", todas estas definiciones, descripciones y comentarios están destinados a ser atribuidos a tales términos. Tampoco hay ninguna intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o de las porciones de las mismas. Además, si bien se utilizan subtítulos, p. ej., "Definiciones", en la "Descripción detallada", tal uso es únicamente para facilitar la referencia y no se pretende limitar ninguna descripción realizada en una sección solamente a esa sección; más bien, se pretende que cualquier descripción realizada bajo un subtítulo constituya una descripción en todos y cada uno de los otros subtítulos.

10

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de diagnóstico del cáncer de vejiga en un paciente, cuyo método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenida del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que consiste en una sonda específica del locus de c-myc, que hibrida con Q24 en el cromosoma humano 8, una sonda específica del locus de AURKA, que hibrida con q 13 en el cromosoma humano 20, una sonda centromérica para el cromosoma humano 7, y una sonda centromérica para el cromosoma humano 17 en condiciones de hibridación, y determinar la presencia de anomalías cromosómicas, en donde la presencia de anomalías cromosómicas de c-myc, AURKA, el cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que el paciente tiene cáncer de vejiga, después de lo cual se diagnostica cáncer de vejiga en el paciente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el paciente tiene hematuria.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el paciente ha sido diagnosticado previamente de cáncer de vejiga.
4. Un procedimiento de control de la recurrencia del cáncer de vejiga en un paciente, cuyo método comprende poner en contacto una muestra de células uroteliales obtenida del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que consiste en una sonda específica del locus de c-myc, que hibrida con Q24 en el cromosoma humano 8, una sonda específica del locus de AURKA, que hibrida con q13 en el cromosoma humano 20, una sonda centromérica para el cromosoma humano 7, y una sonda centromérica para el cromosoma humano 17 en condiciones de hibridación, y determinar la presencia de anomalías cromosómicas, en donde la presencia de anomalías cromosómicas de c-myc, AURKA, el cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que el cáncer de vejiga se ha repetido en el paciente, después de lo cual se controla la recurrencia de cáncer de vejiga en el paciente.
5. Un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que consiste en una sonda específica del locus de c-myc, que hibrida con Q24 en el cromosoma humano 8, una sonda específica del locus de AURKA, que hibrida con q13 en el cromosoma humano 20, una sonda centromérica para el cromosoma humano 7, y una sonda centromérica para el cromosoma humano 17.
6. Un kit que comprende (a) un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que permite el diagnóstico del cáncer de vejiga, o el control de la recurrencia del mismo, en un paciente, en donde el conjunto de sondas consiste en una sonda específica del locus de c-myc, que hibrida con Q24 en el cromosoma humano 8, una sonda específica del locus de AURKA, que hibrida con q13 en el cromosoma humano 20, una sonda centromérica para el cromosoma humano 7, y una sonda centromérica para el cromosoma humano 17 y (b) instrucciones para el diagnóstico del cáncer de vejiga, o el control de la recurrencia del mismo, en un paciente, en donde las instrucciones comprenden la determinación en una muestra de células uroteliales obtenidas del paciente de la presencia de anomalías cromosómicas, en donde la presencia de anomalías cromosómicas de c-myc, AURKA, cromosoma 7, y el cromosoma 17 indica que la paciente tiene cáncer de vejiga.