

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 237**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.09.2008 PCT/EP2008/007465**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2009 WO09036922**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2008 E 08802026 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2198042**

54 Título: **Novedosos marcadores para la detección del cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

17.09.2007 US 960129 P
28.05.2008 US 71971 P
19.06.2008 WO PCT/GB2008/002093

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2017

73 Titular/es:

MDXHEALTH SA (100.0%)
CAP Business Center, Rue d'Abhooz, 31
4040 Herstal, BE

72 Inventor/es:

RENARD, ISABELLE y
VAN CRIEKINGE, WIM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 605 237 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

Novedosos marcadores para la detección del cáncer de vejiga

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y kits para detectar la presencia de células cancerosas, o la presencia de ADN genómico procedente de células cancerosas, que incluye determinar el estado de metilación, o los niveles de expresión, o una combinación de los mismos, de un panel de genes. En particular, la invención se refiere a la detección del cáncer de vejiga. La invención se refiere también a métodos farmacogenéticos para determinar regímenes de tratamiento adecuados para el cáncer y métodos para tratar los pacientes con cáncer.

Antecedentes de la invención

15 Las evidencias moleculares respaldan el concepto de que el cáncer es un proceso gradual de acumulación de anomalías genéticas y epigenéticas que pueden conducir a un silenciamiento anómalo de genes o a la activación anómalas de genes gen y a la disfunción celular. La sinergia entre los procesos genéticos y epigenéticos impulsa la progresión del tumor y la neoplasia maligna.

20 La epigenética se puede describir como una alteración estable en la expresión potencial del gen que tiene lugar durante el desarrollo y la proliferación celular, mediada por mecanismos diferentes a alteraciones en la secuencia de nucleótidos primaria de un gen. Tres mecanismos relacionados que producen alteración epigenética en la expresión génica son la metilación del ADN, cambios en la codificación de las histonas e interferencia del RNA.

25 La metilación del ADN es la principal modificación epigenética en seres humanos. Es una modificación química del ADN llevada a cabo por enzimas denominadas metiltransferasas, donde un grupo metilo (m) se añade a restos citosina (c) específicos del ADN. En mamíferos, la metilación se produce solo en restos citosina adyacentes a un resto guanosina, es decir, en la secuencia CG o en el dinucleótido CpG. En mamíferos, la metilación se produce predominantemente en regiones del ADN que tienen pocas repeticiones de bases CG, mientras que las islas de CpG, las regiones del ADN que tienen repeticiones largas de bases CG, permanecen sin metilar. Las regiones promotoras de genes que controlan la expresión de proteínas son a menudo regiones ricas en islas de CpG. La metilación anómala de estas islas de CPG normalmente no metiladas en la región promotora da lugar a la inactivación de la transcripción de determinados genes funcionales en cánceres humanos (Jones 2002).

35 Se han descrito marcadores diagnósticos para la detección del cáncer. Se puede distinguir entre marcadores inmunológicos y marcadores genéticos. Los marcadores genéticos se basan en la detección de la mutación en genes distintos, en particular en genes supresores de tumores. De forma más reciente, se han evaluado marcadores de metilación del ADN como potenciales marcadores genéticos para la detección del cáncer ya que ofrecen a menudo determinadas ventajas cuando se comparan con marcadores de mutaciones. Una de las características más importantes es que se producen en las etapas iniciales del desarrollo del cáncer y en muchos casos son específicos de tipos de tejidos y de tipos de tumores (Estelle et al. 2001). Una ventaja adicional es que el perfil de metilación se preserva en ADN purificado aislado y los cambios en la metilación parecen preceder a una neoplasia maligna evidente en muchos casos. Además, los marcadores de la metilación pueden servir a fines predictivos ya que a menudo reflejan la sensibilidad al tratamiento o la duración de la supervivencia del paciente. Todas estas características encuentran su aplicación en la detección y el tratamiento mejorados del cáncer.

50 Un diagnóstico temprano es crítico para el tratamiento satisfactorio de muchos tipos de cánceres. Los métodos de diagnóstico tradicionales (tales como citología, histopatología, inmunohistoquímica, serología, y así sucesivamente) son útiles, pero los marcadores moleculares pueden subclasificar además los tumores e identificar la predisposición al cáncer. Si están disponibles perfiles de metilación exactos de los tumores y se pueden obtener fármacos que se dirigen a los genes específicos, entonces el tratamiento del cáncer podría ser más centrado y lógico. Por tanto, la detección y la cartografía de novedosos marcadores de metilación es una etapa esencial hacia la mejora de la prevención, selección y tratamiento del cáncer.

55 Cada año, en EE.UU. y en la UE se diagnostican > 160.000 hombres con cáncer de vejiga y hay como resultado > 48.000 muertes. Aunque la tasa de supervivencia a cinco años para el cáncer de vejiga en su etapa inicial es elevada, alrededor de un 25% presentan enfermedad avanzada y aproximadamente un 70% experimenta incidencia o progresión tras el tratamiento. La citología urinaria y la cistoscopia son el patrón actual de cuidados para la detección y la supervivencia en el cáncer de vejiga. La cistoscopia es muy sensible, pero es invasiva, cara y produce un malestar significativo al paciente. La citología urinaria es el método más ampliamente utilizado para la detección no invasiva con hasta un 100% de especificidad. Desafortunadamente, este método está limitado por su sensibilidad, lo que es especialmente malo para tumores de vejiga de grado bajo.

65 Se han notificado algunos métodos para la detección de células tumorales en orina evacuada. Sin embargo, ninguna de estas pruebas urinarias puede sustituir la cistoscopia debido a su mala especificidad. Combinar diferentes métodos de detección de cáncer de vejiga ha mostrado mejorar la sensibilidad, pero desafortunadamente a

expensas de la especificidad (Lotan Y et al., 2003).

Se han notificado mutaciones activadoras en el gen del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) en > 50% de los tumores de vejiga primarios (van Rhijn BWG et al., 2003). La mayoría de las mutaciones somáticas que se encuentran en el cáncer de vejiga son idénticas a las mutaciones de la línea germinal responsables de trastornos esqueléticos tales como la displasia tanatofórica y la acondroplasia (van Rhijn BWG et al., 2002). Se ha notificado que las mutaciones FGFR3 son muy frecuentes en los tumores de vejiga de estadio y grado bajos, indicando que se producen con mucha más frecuencia en el cáncer de vejiga superficial (Billerey C et al., 2001). Recientemente, van Oers et al., han descrito el desarrollo de un nuevo método para el análisis de la mutación FGFR3 basado en la detección de cambios de nucleótidos únicos. Con este método, se pueden detectar simultáneamente las nueve mutaciones más comunes en un solo ensayo.

Ulazzi et al (Molecular Cancer 2007, 6:17) describen la metilación de genes nidógenos en líneas de células de cáncer de colon y de cáncer gástrico.

Maruyama, R. et al. (CANCER RESEARCH, vol. 61, n.º 24, 15 de diciembre de 2001, páginas 8659-8663), Dulaimi et al. (CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, 15 de marzo de 2004, páginas 1887-1893) y Hoque, M.O. et al. (JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE 19 de julio de 2006, vol. 98, n.º 14, 19 de julio de 2006, páginas 996-1004) describen cambios en el estado de metilación de los genes en relación con la presencia de cáncer.

Documento WO 2005/042713 A (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; SUKUMAR SARASWATI [US]; FACKLER MARY JO [US]) 12 de mayo de 2005) describen la hipermetilación de TWIST1 en muestras de cáncer de mama.

Zhang et al. (HUMAN PATHOLOGY, SAUNDERS, FILADELFA, PA, US, vol. 38, n.º 4, 14 de marzo de 2007, páginas 598-606) describe una expresión de TWIST aumentada en muestras relacionadas con cáncer de vejiga.

Breve descripción de la invención

La invención, como se define en las reivindicaciones, se basa en el descubrimiento de genes y paneles de genes específicos cuyo estado de metilación está vinculado a la predisposición, o a la incidencia, del cáncer de vejiga. El uso de estos genes para detectar el cáncer de vejiga, en particular en el contexto de muestras de tejido u orina adecuadas, ha mostrado producir una sensibilidad y unos resultados específicos muy altos.

De acuerdo con ello, la invención proporciona un método para detectar una predisposición, o la incidencia, de un cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar un cambio epigenético en al menos TWIST1 y opcionalmente también al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOPXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR donde la detección del cambio epigenético es indicador de una predisposición, o la incidencia, del cáncer de vejiga.

El cambio epigenético más preferido en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOPXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, que se detecta comprende, consiste esencialmente de o consiste en la metilación. En particular, se detecta la metilación anómala, que puede denominarse hipermetilación, del gen o genes.

De esta manera, la invención proporciona preferentemente un método para detectar una predisposición, o incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar el silenciamiento epigenético en al menos TWIST1 y opcionalmente también al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOPXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde el silenciamiento epigenético del al menos un gen se detecta mediante la determinación del estado de metilación del gen y donde la metilación del gen es indicadora de una predisposición, o incidencia, de cáncer de vejiga.

Los cambios de metilación que se desarrollan de forma temprana en el proceso de la carcinogénesis no son solo ideales para la selección, sino que son también interesantes para la realizar un seguimiento del a estadificación. De acuerdo con ello, se describe también un método para determinar el estadio histopatológico del cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético es indicadora del estadio histopatológico del cáncer de vejiga.

La pérdida epigenética de la función génica puede recuperarse mediante el uso de agentes desmetilantes del ADN y/o inhibidores de la metiltransferasa del ADN y/o el inhibidor HDAC. Se describe también un método para prever la probabilidad de un tratamiento satisfactorio del cáncer de vejiga con un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor HDAC, que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético es indicadora de que la probabilidad de tratamiento satisfactorio es mayor que si no se detectara la modificación epigenética.

En un escenario opuesto, se describe también un método para prever la probabilidad de resistencia al tratamiento del cáncer de vejiga con un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa y/o un inhibidor de HDAC que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético es indicadora de que la probabilidad de tratamiento satisfactorio es menor que si no se detectara la modificación epigenética.

El cáncer de vejiga se define para incluir el carcinoma de células de transición o el carcinoma escamocelular. La pérdida epigenética de la función génica puede identificar la necesidad de tratamiento, que puede diferir de acuerdo con el tipo de carcinoma. Por tanto, se describe también en el presente documento un método de selección de un régimen de tratamiento adecuado para el cáncer de vejiga que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético da como resultado la selección de un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor de HDAC para el tratamiento y donde si no se detecta el cambio epigenético, no se selecciona un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor de HDAC para el tratamiento.

En un aspecto relacionado, se describe también en el presente documento un método para prever el tratamiento adecuado de un carcinoma de células de transición o un carcinoma escamocelular que comprende (en una muestra obtenida de un sujeto), determinar el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, en un tumor de células de transición o en un carcinoma escamocelular, donde si se metila al menos un gen, en particular, si se hipermetila, se identifica la necesidad de resección del carcinoma de células de transición o el carcinoma escamocelular.

En un escenario opuesto, se describe también en el presente documento un método para prever el tratamiento adecuado de un carcinoma de células de transición o carcinoma escamocelular que comprende (en una muestra obtenida de un sujeto), determinar el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR en un tumor de células de transición o carcinoma de células escamosas, donde si al menos un gen está sin metilar o metilado en un grado menor, se decide que no hay necesidad de resección del tumor de células de transición o del tumor escamocelular.

En un aspecto adicional relacionado, se describe un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende la administración de un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN donde el sujeto se ha seleccionado para el tratamiento sobre la base de un método como se describe en el presente documento.

Se describe también un kit para detectar una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende:

- (a) medios para detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR
- (b) medios para procesar una muestra de orina.

Se describe también un kit para detectar una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende al menos una pareja de cebadores para determinar el estado de metilación de cada uno de NID2, TWIST1 y RUNX3.

Se describen también cebadores y/o sondas para llevar a cabo los métodos de la invención como se describen en el presente documento, incluyendo las variantes de los mismos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que las citosinas de los dinucleótidos CpG en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se metilan y se desmetilan en muestras de cáncer/orina de tejido humano de forma diferente a muestras de tejido humano/orina normales, más en concreto, en tejido de vejiga y/o muestras de orina.

Se describe un método para detectar una predisposición, o la incidencia, de un cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR donde la detección del cambio epigenético es indicador de una predisposición, o la incidencia, del cáncer de vejiga. Un marcador particular que puede utilizarse en aislamiento o como parte de un panel de genes es TWIST1. Se ha demostrado por primera vez en el presente documento que este gen permite la detección del cáncer de vejiga con

altos niveles de especificidad y sensibilidad.

Preferentemente, la invención implica detectar un cambio epigenético en un panel de genes que comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco de los genes de NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección de un cambio epigenético en al menos uno de los genes en el panel es indicadora de una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga. Preferentemente, se detecta un cambio epigenético en al menos dos, tres, cuatro o cinco genes de NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. El panel de genes comprende preferentemente TWIST1. El panel de genes puede comprender adicional o alternativamente NID2 y/o BMP7. El panel de genes puede comprender TWIST1 y/o NID2 y/o BMP7 y/o RUNX3.

En determinadas realizaciones, el panel de genes comprende, consiste esencialmente o consiste en NID2, TWIST1 y RUNX3. Se ha demostrado por primera vez en el presente documento que estos tres paneles de genes permiten la detección del cáncer de vejiga con elevados niveles de especificidad y sensibilidad. De forma específica, la detección de la metilación de al menos uno de los tres genes proporciona un indicador fiable del cáncer de vejiga en muestras que contienen un ADN genómico adecuado, tales como muestras de orina. El panel de genes puede comprender, consiste esencialmente o consiste en NID2 y BMP7, NID2, TJP2 y BMP7, NID2, TNFRSF25 and BMP7 o NID2, BMP7, TWIST1, CCNA1 y RUNX3. La detección de un cambio epigenético en cada uno de los paneles de genes puede llevarse a cabo en una única reacción.

"NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR" es la nomenclatura normalizada para el gen 2 "NID2" (Número de registro: AB009799 and ENSG0000008703), "TJP2" proteína 2 de unión estrecha (Número de registro: NM_0004817), "TWIST1" homólogo 1 de twist (Número de registro: NM_000474), "TNFRSF25" superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 25 (Número de registro: NM_148972), "BMP7" proteína 7 morfogenética ósea (Número de registro: ENSG00000101144), "RUNX3" factor 3 de transcripción relacionado con runt (Número de registro: ENST00000308873), "CCNA1" ciclina A1 (Número de registro: NM_003914), "APC" poliposis adenomatosa coli (Número de registro: NM_000038), "LOXL1" lisil oxidasa de tipo 1 (Número de registro: ENST00000261921), "TUBB4" tubulina beta 4 (Número de registro: NM_006087), "NTRK2" receptor de tipo de 2 de la tirosina quinasa receptora (Número de registro: NM_001007097), "ARFGAP3" factor de ribosilación del ADP de la proteína 3 activadora de la GTPasa (Número de registro: AK002083 y ENSG00000100262), "PDLIM4" PDZ y dominio 4 de LIM (Número de registro: ENST00000379038 NM_001719), "RASSF1A" familia 1 del dominio de asociación a Ras (RalGDS/AF-6) (Número de registro: AC002481), y "OSMR" receptor M de la oncostatina (Número de registro: NM_003999), según se ha homologado por la Organización del Genoma Humano. FGFR3 es la nomenclatura homologada para el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (localizado en el cromosoma 4p16. Número de registro M64347).

Por "gen" se entiende cualquier gen que se toma de la familia a la cual pertenece el "gen" nombrado e incluye, de acuerdo con todos los aspectos de la invención, no solo las secuencias concretas que se encuentran en las entradas de las bases de datos públicamente disponibles, sino que también abarca las variantes de transcritos y nucleótidos de estas secuencias, con la condición de que la metilación u otra modificación epigenética del gen esté vinculada al cáncer de vejiga.

Los métodos de la invención son preferentemente métodos ex vivo o in vitro llevados a cabo en una muestra de ensayo. Los métodos no son invasivos. Se pueden usar los métodos para identificar cualquier tipo de cáncer, en particular cáncer de vejiga.

La "muestra de ensayo" para detectar el silenciamiento epigenético de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR puede ser de cualquier muestra de tejido, fluido corporal, precipitado de fluido corporal o muestra de lavado. Preferentemente, la muestra de ensayo se obtiene de un sujeto humano. Las muestras de ensayo para usos médicos de diagnóstico, pronóstico, o personalizados se pueden obtener, por ejemplo, de muestras quirúrgicas, tales como biopsias o aspirados con aguja fina, de tejidos incluidos en parafina, de muestras de tejido tumoral congeladas, de muestras de tejido tumoral recientes, de fluido corporal reciente o congelado. Los ejemplos no limitantes incluyen, sangre completa, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido linfático, suero, plasma, orina, quilo, heces, eyaculado, esputo, aspirado de pezón, saliva, muestras de hisopos, lavados o fluidos de lavado y/o muestras de cepillo.

Preferentemente, la muestra de ensayo se toma de un sujeto humano y contiene células de vejiga (de transición) o ácido nucleico de células de vejiga (de transición). Alternativamente, la muestra de ensayo contiene células de vejiga de carcinoma escamocelular o ácido nucleico de carcinomas escamocelulares. Se obtiene preferentemente de un tejido de vejiga. Más preferentemente, la muestra de ensayo se deriva de orina. La muestra puede contener ácido nucleico de células de vejiga de transición o de células de vejiga de carcinoma escamocelular. La muestra de ensayo puede derivarse de orina líquida, un precipitado de la misma, o un precipitado en la orina. Los tejidos y fluidos corporales pueden recogerse utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos en la materia. El "ácido nucleico" en los métodos de acuerdo con la invención es preferentemente ácido desoxirribonucleico (ADN), en

particular ADN genómico.

En las realizaciones donde se emplean muestras de orina, pueden procesarse de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado. En determinadas realizaciones, los métodos de la invención comprenden adicionalmente estabilizar la muestra de orina. Se muestra en el presente documento que estabilizar la muestra de orina, añadiendo un tampón estabilizante adecuado a la orina, puede evitar la necesidad de centrifugación de la muestra de orina poco tiempo después de obtener la muestra. Normalmente, la centrifugación se realiza en las 4 horas de obtener la muestra de orina a fin de mantener la integridad del ADN (en particular en la fracción de sedimento). Las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente durante un máximo de 48 o 72 horas o más tras la adición de un tampón estabilizante, sin el requerimiento de la centrifugación. Esto permite, de forma ventajosa, la recogida domiciliaria de muestras de orina y elimina también la necesidad de equipo de centrifugación en cada sitio de recogida. De esta manera, los métodos de la invención pueden incorporar métodos para almacenar convenientemente muestras de orina durante un periodo de hasta 72 (o 48) horas o más a temperatura ambiente, tal como al menos 4, 12, 24, 36 o 48 horas hasta 72 horas o más, que comprende añadir un tampón estabilizante a la muestra de orina, con la condición de que la muestra de orina no se centrifugue o fraccione de otra forma antes o durante el periodo de almacenamiento y almacenar la orina durante este periodo. La muestra de orina puede almacenarse de acuerdo con estos métodos durante periodos más largos de 72 horas, con la condición de que se mantenga la integridad del ADN en la muestra (permitiendo de esta manera que se lleven a cabo los métodos de la invención). Tras el periodo de almacenamiento, la muestra puede centrifugarse a continuación como parte de los métodos de la invención. La muestra centrifugada de esta manera puede almacenarse en las condiciones adecuadas, como se describe en el presente documento, tal como a 4°C o a -20°C. En el presente documento, se describen tampones estabilizantes adecuados para uso en estos métodos. Se puede emplear cualquier tampón estabilizante adecuado.

Aunque la estabilización se puede conseguir por medios adecuados, en las realizaciones preferidas, la estabilización se produce mediante la adición de un tampón estabilizante. El tampón estabilizante incorpora componentes adecuados para mantener la integridad del ADN en la muestra de orina y/o mantener la calidad de la muestra de orina como un completo. De esta manera, los métodos y kits de la invención pueden emplear una solución tampón estabilizante para almacenar muestras de orina que comprenden EDTA y/o DMSO y/o un antibacteriano y/o un comprimido STABILUR™. En realizaciones específicas, el tampón estabilizante comprende EDTA, un antibacteriano y opcionalmente un comprimido STABILUR™. Esta solución se puede usar para almacenar una muestra de orina a una temperatura de alrededor de 4°C o a otras temperaturas, tales como temperatura ambiente. En un aspecto relacionado, los métodos y kits de la invención pueden emplear un tampón estabilizante para almacenar muestras de orina que comprenden EDTA, DMSO y un antibacteriano. La solución puede utilizarse para almacenar una muestra de orina en condiciones de congelación o a otras temperaturas, tales como temperatura ambiente. Estas soluciones tampón son útiles para almacenar muestras de orina completas. Son útiles para almacenar el componente de ADN exento de células de una muestra de orina y/o la fracción de aglomerado producida normalmente por centrifugación (velocidad baja). Normalmente, el tampón estabilizante se añade a la muestra de orina poco después de la recogida de la muestra. Esta se puede almacenar a continuación de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, durante hasta 72 horas o más después de la centrifugación. La muestra puede a continuación centrifugarse antes del procesamiento adicional de acuerdo con los métodos de la invención. Tras la centrifugación, las muestras -tales como el sedimento y/o la parte de aglomerado de la muestra- pueden almacenarse a continuación durante largos periodos de tiempo, por ejemplo, a una temperatura tal como -20°C durante hasta 6 meses o más.

El tampón estabilizante para uso en los métodos de la invención puede comprender, consistir esencialmente o consistir en al menos un componente seleccionado entre EDTA, un antibacteriano, DMSO y comprimidos STABILUR™. Los comprimidos STABILUR están disponibles de Cargille Labs y contienen mezclas adecuadas de ingredientes tamponantes e ingredientes de ajuste de la osmolaridad. Equivalentes adecuados de este producto pueden utilizarse según sea adecuado, tales como tubos conservantes disponibles de CellSave (CellSave Preservative Tubes).

Se pretende que el término "antibacteriano" abarque cualquier compuesto, molécula u otra cosa que tenga un efecto inhibitorio sobre el crecimiento o la viabilidad de una o más bacterias. Se pretende que las moléculas biológicas y no biológicas queden incluidas en la definición. Se pretende que las moléculas biológicas y no biológicas comprendan, consistan esencialmente o consistan en un antibiótico. Son bien conocidos en la técnica muchos antibióticos y están comercialmente disponibles. Se pueden utilizar mezclas de antibióticos según sea adecuado como la mezcla de antibióticos Antibiotic-Antimycotic A5955-100 ml disponible de Sigma-Aldrich.

Los antibacterianos adecuados pueden incluir citoquinas tales como interferones e interleuquinas y derivados y miméticos de los mismos, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2006/123164 (cuya referencia se incorpora al presente documento en su totalidad) y "pequeñas moléculas". Una molécula pequeña se define como una entidad molecular con un peso molecular de menos de 1500 daltons, preferentemente menos de 1000 daltons. La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica, inorgánica u organometálica, que puede estar también en la forma de una sal adecuada, tal como una sal soluble en agua; y puede ser también un complejo, quelato y/o una entidad molecular similar, siempre que su peso molecular (global) esté comprendido en el intervalo

indicado anteriormente.

En realizaciones específicas, el EDTA está presente a una concentración final de alrededor de aproximadamente 10 mM y/o el DMSO está presente en aproximadamente un 10% del volumen final de tampón estabilizante.

5 Las muestras (a las cuales se ha añadido un tampón estabilizante) pueden almacenarse a cualquier temperatura adecuada, incluyendo la temperatura ambiente. Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento puede ser una cualquiera entre aproximadamente -50°C y aproximadamente 37°C, preferentemente aproximadamente -10°C a -30°C, tal como aproximadamente -20°C o aproximadamente 1°C a 10°C, tal como aproximadamente 4°C. por "congelación" se entiende una temperatura a o por debajo de 0°C preferentemente aproximadamente -20°C.

15 Los métodos presentes pueden incluir también la etapa de obtener la muestra de ensayo. La muestra de tejido o la muestra de líquido que comprende el ácido nucleico puede lisarse o necesita concentrarse para crear una mezcla de compuestos biológicos que comprende ácidos nucleicos y otros componentes. De forma alternativa, el ácido nucleico puede necesitar aclararse de proteínas u otros contaminantes, por ejemplo, mediante tratamiento con proteinasa K. Se conocen procedimientos para lisar o concentrar muestras por la persona experta en la materia y pueden ser químicos, enzimáticos o físicos en la naturaleza. También, puede ser aplicable una combinación de estos procedimientos. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la lisis utilizando ultrasonidos, alta presión, fuerzas de cizalladura, álcali, detergentes o soluciones salinas caótropas, o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis para obtener ácidos nucleicos, o concentrar ácidos nucleicos procedentes de las muestras, se puede hacer referencia a Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, (2001) 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York Ausubel, F.M., et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987), J. Wiley and Sons, Nueva York. En determinadas realizaciones, se extraen ácidos nucleicos de la muestra de ensayo utilizando un kit de purificación comercialmente disponible, tal como el kit de purificación del ADN PUREGENE®. En realizaciones específicas, la muestra puede centrifugarse y purificarse el ácido nucleico a partir del sedimento o la fracción aglomerada, en particular, utilizando dicho kit de purificación. Los kits de purificación adecuados están comercialmente disponibles y son bien conocidos de los expertos en la materia.

30 La muestra de ensayo se obtiene generalmente a partir de un sujeto (humano) sospechoso de ser tumorigénico. De forma alternativa, la muestra de ensayo se obtiene de un sujeto que se somete a un examen rutinario y no tiene necesariamente que ser sospechoso de tener una enfermedad. De esta manera, pueden identificarse los pacientes con riesgo antes de que la enfermedad tenga la oportunidad de manifestarse por sí misma en términos de síntomas identificables en el paciente. De forma alternativa, la muestra se obtiene de un sujeto que recibe tratamiento, o de pacientes que están siendo vigilados debido a la recidiva de la enfermedad.

35 "Detectar" una enfermedad o predisposición a enfermedad se define en el presente documento para incluir la detección por medio de una exploración rutinaria, cribado de la enfermedad o preestadio de una enfermedad, vigilando y/o clasificando el estado y/o progresión de la enfermedad, vigilando la recidiva de la enfermedad después del tratamiento y vigilando el éxito de un tratamiento concreto. La detección puede tener también valor pronóstico, y el valor pronóstico de los ensayos se puede usar como un marcador de susceptibilidad potencial al cáncer. La detección puede también vincularse a un estadio o grado de cáncer.

40 El "Estadio" se refiere a lo lejos que ha progresado un cáncer anatómicamente, mientras que el "grado" se refiere a la aparición de células (diferenciación) y a la composición del ADN.

45 "Cáncer" se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de células productoras de cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento y proliferación rápidos, y determinados rasgos morfológicos característicos. El tipo de cáncer concreto relevante para la invención es cáncer de vejiga.

50 "Cáncer de vejiga" se define para incluir el carcinoma de células de transición o carcinomas escamocelulares. El cáncer puede referirse a cáncer de vejiga superficial, cáncer de vejiga invasivo, o cáncer de vejiga metastásico. El cáncer superficial es solo en células del revestimiento de la vejiga y tiene un alto grado de recidiva. El tumor superficial puede crecer a través del revestimiento en la pared muscular de la vejiga y convertirse en un cáncer invasivo. El cáncer invasivo puede extenderse a través de la pared de la vejiga y puede crecer en un órgano cercano tal como el útero o la vagina (en mujeres) o la glándula prostática (en hombres). Puede invadir también la pared del abdomen. El cáncer se convierte en metastásico cuando se disemina fuera de la vejiga a los ganglios linfáticos y otros órganos próximos, tales como los pulmones, hígado, o huesos.

60 "Cambio epigenético" se define para incluir en el presente documento alteraciones que dan como resultado una expresión génica potencial disminuida mediada por mecanismos diferentes de alteraciones en la secuencia de nucleótidos primaria de un gen. Tres mecanismos relacionados que producen alteración epigenética en la expresión génica son la metilación del ADN, cambios en la codificación de las histonas e interferencia del RNA. El cambio epigenético es generalmente el silenciamiento epigenético en la presente invención. El silenciamiento epigenético está preferiblemente producido por la metilación del ADN.

65

El cambio epigenético en los genes de la presente invención es generalmente el silenciamiento epigenético producido por la metilación del ADN. De esta manera, se describe también un método para detectar una predisposición, o incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar el silenciamiento epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde el silenciamiento epigenético del al menos un gen se detecta mediante la determinación del estado de metilación del gen y donde la metilación del gen es indicadora de una predisposición, o incidencia, de cáncer de vejiga.

El término "estado de metilación" se refiere a la presencia o ausencia de un resto citosina metilado en uno o más dinucleótidos CpG en un ácido nucleico. En muchos genes, las islas CpG comienzan exactamente en la dirección 5' de un promotor y se extienden en la dirección 3' en la región transcrita. La metilación de una isla CpG en un promotor evita usualmente la expresión del gen. Las islas pueden rodear también la región 5' de la región de codificación del gen, así como la región 3' de la región de codificación. De esta manera, las islas CPG pueden encontrarse en múltiples regiones de una secuencia de ácido nucleico incluyendo en dirección 5' de las secuencias de codificación en una región reguladora incluyendo una región promotora, en las regiones de codificación (por ejemplo, exones), en la dirección 3' de las regiones de codificación en, por ejemplo, regiones potenciadoras, y en intrones. Se pueden evaluar todas estas regiones para determinar su estado de metilación, según sea adecuado.

En una realización preferida, se determina el estado de metilación de la región promotora del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. Un "promotor" es una región que se extiende normalmente entre aproximadamente 1 Kb, 500 pb o 150 a 300 pb en la dirección del sitio de inicio de la transcripción. Preferentemente, la isla CpG que rodea o se sitúa alrededor del sitio de inicio de la transcripción del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, se analiza para determinar su estado de metilación. De manera alternativa, el estado de metilación de las regiones del exón y/o el intrón del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, se puede determinar según sea adecuado.

Se conocen en la materia diversas técnicas para evaluar el estado de la metilación y se pueden usar junto con la presente invención: la secuenciación, la PCR específica de metilación (MS-PCR), la curva de fusión de la PCR específica de metilación (McMSPCR), MLPA con o sin tratamiento con bisulfito, QAMA (Zeschniq et al, 2004), MSRE-PCR (Melnikov et al, 2005), MethyLight (Eads et al., 2000), ConLight-MSP (Rand et al., 2002), PCR específica de metilación específica de la conversión de bisulfito (BS-MSP) (Sasaki et al., 2003), COBRA (que se basa en el uso de enzimas de restricción para revelar las diferencias de secuencias dependientes de metilación en productos de la PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio), conformación de la extensión del cebador de nucleótido único sensible a metilación (MS-SNuPE), análisis de conformación monocatenaria sensible a metilación (MS-SSCA), Análisis de restricción con bisulfito combinado con curva de fusión (McCOBRA)(Akey et al., 2002), PyroMethA, HeavyMethyl (Cottrell et al. 2004), MALDI-TOF, MassARRAY, Análisis cuantitativo de alelos metilados (QAMA), ensayo enzimático de metilación regional (ERMA), QBSUPT, MethyQuant, Secuenciación de la PCR cuantitativa y sistemas de microensayo basados en oligonucleótidos, Pirosecuenciación, Meth-DOP-PCR. Se proporciona una revisión de algunas técnicas útiles para el análisis de metilación del ADN en *Nucleic acids research*, 1998, Vol. 26, No. 10, 2255-2264, *Nature Reviews*, 2003, Vol.3, 253-266; *Oral Oncology*, 2006, Vol. 42, 5-13, cuyas referencias se incorporan en el presente documento en su totalidad.

Las técnicas para evaluar el estado de la metilación se basan en distintos enfoques. Algunos incluyen el uso de endonucleasas. Dichas endonucleasas pueden tanto escindir preferentemente sitios de reconocimiento metilados respecto a sitios de reconocimiento no metilados o escindir preferentemente sitios de reconocimiento no metilados con respecto a sitios de reconocimiento metilados. Algunos ejemplos del primero son Acc III, Ban I, BstN I, Msp I, y Xma I. Los ejemplos del último son Acc II, Ava I, BssH II, BstU I, Hpa II, y Not I. Las diferencias en el modelo de escisión son indicadoras de la presencia o ausencia de un dinucleótido CpG metilado. Los modelos de escisión se pueden detectar directamente, o después de una reacción adicional que crea productos que son fácilmente distinguibles. Se pueden usar medios que detecten el tamaño y/o la carga alterados para detectar productos modificados, incluyendo, pero no de forma limitativa, electroforesis, cromatografía, y espectrometría de masas.

De forma alternativa, la identificación de dinucleótidos CpG metilados puede utilizar la capacidad del dominio de unión a metilo (MBD) de la proteína MeCP2 de unirse selectivamente a las secuencias de ADN metiladas (Cross et al, 1994; Shiraishi et al, 1999). El MBD puede obtenerse también a partir de MBP, MBP2, MBP4, poli-MBD (Jorgensen et al., 2006) o a partir de reactivos tales como anticuerpos de unión a ácido nucleico metilado. El MBD puede inmovilizarse en una matriz sólida y utilizarse para la cromatografía en columna preparativa para aislar secuencias de ADN muy metiladas. Se pueden usar formas variantes tales como las expresadas por el dominio de unión metil-CpG etiquetado con His para unirse selectivamente a secuencias de ADN metiladas. Eventualmente, el ADN genómico digerido con una endonucleasa de restricción se pone en contacto con el dominio de unión metil-CpG etiquetado con His expresado. Otros métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen entre otros el ensayo de recuperación de la isla CpG metilada (MIRA). Otro método, MB-PCR, utiliza un polipéptido de unión metil-CpG bivalente, recombinante inmovilizado sobre las paredes de un recipiente de la PCR para capturar ADN metilado y la

posterior detección del ADN metilado unido mediante la PCR.

Los enfoques adicionales para detectar motivos de dinucleótidos CpG metilados utilizan reactivos químicos que modifican selectivamente la forma metilada o no metilada de los motivos de dinucleótidos CpG. Los reactivos químicos adecuados incluyen hidrazina e iones bisulfito. Los métodos de la invención utilizan preferentemente iones bisulfito. La conversión del bisulfito se basa en el tratamiento de las muestras de ADN con bisulfito sódico que convierte la citosina no metilada en uracilo, manteniéndose a la vez las citosinas metiladas (Furuichi et al., 1970). Esta conversión da como resultado finalmente un cambio en la secuencia del ADN original. Es de conocimiento general que el uracilo resultante tiene el comportamiento de emparejamiento de bases de la timidina que difiere del comportamiento de emparejamiento de bases de la citosina. Esto hace posible la discriminación entre las citosinas metiladas y no metiladas. Las técnicas convencionales útiles de biología molecular y química de ácidos nucleicos para evaluar diferencias de secuencias son bien conocidas en la materia y se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., et al., *Molecular cloning: A laboratory Manual*, (2001) 3ª edición, Cold Spring Harbor, NY; Gait, M.J.(ed.), *Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press (1984); Hames B.D., y Higgins, S.J. (eds.), *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press (1985); y la serie, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc.

Algunas técnicas utilizan cebadores para evaluar el estado de metilación en los dinucleótidos CpG. Son posibles dos enfoques para el diseño de cebadores. En primer lugar, se pueden diseñar cebadores que por sí mismos no cubran ningún sitio potencial de metilación del ADN. Se localizan variaciones de secuencias en sitios de metilación diferencial entre los dos cebadores y la visualización de la variación de la secuencia requiere etapas de ensayo adicionales. Dichos cebadores se usan en la secuenciación genómica con bisulfito, Ms-SnuPE y algunas otras técnicas. En segundo lugar, se pueden diseñar cebadores que se hibridan específicamente tanto con la versión metilada como no metilada de la secuencia inicial tratada. Tras la hibridación, se puede llevar a cabo una reacción de amplificación y evaluarse los productos de amplificación utilizando cualquier sistema conocido en la técnica. La presencia de un producto de amplificación indica una muestra que se ha hibridado con el cebador. La especificidad del cebador indica tanto si el ADN se ha modificado como si no, lo que a su vez indica si el ADN se ha metilado o no. Si existe una región de complementariedad suficiente, por ejemplo, 12, 15, 18, o 20 nucleótidos, con la diana, entonces el cebador puede contener también restos de nucleótidos adicionales que no interfieren con la hibridación pero que pueden ser útiles para otras manipulaciones. Los ejemplos de dichos restos diferentes pueden ser sitios para escisión por una endonucleasa de restricción, para la unión del ligando o para la unión del factor o los enlazadores o las repeticiones. Los cebadores oligonucleótidos pueden ser de tal manera que sean o no sean específicos de los restos metilados modificados.

Una forma adicional para distinguir entre ácido nucleico modificado y no modificado es usar sondas de oligonucleótidos. Dichas sondas pueden hibridarse directamente con el ácido nucleico modificado o con productos adicionales de ácido nucleico modificado, tales como productos obtenidos mediante amplificación. Los ensayos basados en sondas aprovechan la hibridación de oligonucleótidos con secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. Existen también etapas de purificación adicionales antes de que se detecte el producto de amplificación, por ejemplo, una etapa de precipitación. Las sondas de oligonucleótidos pueden marcarse utilizando cualquier sistema de detección conocido en la técnica. Estos incluyen, pero no de forma limitativa restos fluorescentes, restos marcados con radioisótopos, restos bioluminiscentes, restos luminiscentes, restos quimioluminiscentes, enzimas, sustratos, receptores, o ligandos.

En la realización más preferida, el estado de la metilación del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR (o una parte del mismo, especialmente las islas CpG, como se describe en el presente documento) se determina usando la PCR específica de metilación (MSP) o una técnica de amplificación equivalente. En el enfoque MSP, se puede amplificar el ADN utilizando parejas de cebadores diseñadas para distinguir el ADN metilado del ADN no metilado aprovechando las diferencias de secuencia usadas como resultado del tratamiento con bisulfito de sodio (Herman et al., 1996; y el documento WO 97/46705). Por ejemplo, los iones bisulfito modifican bases citosina no metiladas, cambiándolas por bases uracilo. Las bases uracilo se hibridan con bases adenina en condiciones de hibridación. De esta manera, un cebador de oligonucleótido que comprende bases adenina en lugar de bases guanina se hibridaría con el ADN modificado con bisulfito, mientras que un cebador de oligonucleótidos que contiene bases guanina se hibridaría con los restos citosina no modificados (metilados) del ADN. La amplificación utilizando un ADN polimerasa y un segundo cebador da como resultado productos de amplificación que se pueden observar fácilmente, lo que a la vez indica si el ADN se ha metilado o no. Aunque la PCR es un método de amplificación preferido, variantes de esta técnica básica como la PCR anidada y la PCR multiplete están incluidas en el alcance de la invención.

La secuenciación con bisulfito ofrece otra alternativa preferida para determinar el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. Los cebadores se pueden diseñar para su uso en la secuenciación a través de las islas CpG importantes del gen en cuestión. De esta manera, los cebadores pueden diseñarse en orientación de sentido directo y en orientación de sentido contrario para dirigir la secuenciación a través de la región de interés del gen seleccionado.

- Como se ha mencionado anteriormente, una realización preferida para evaluar el estado de metilación del gen relevante requiere la amplificación para dar como resultado productos de amplificación. La presencia de productos de amplificación puede evaluarse directamente utilizando métodos bien conocidos en la materia. Se pueden visualizar simplemente sobre un gel adecuado, tal como un gel de agarosa o un gel de poliacrilamida. La detección puede implicar la unión de colorantes específicos, tales como bromuro de etidio, que se intercalan por ejemplo en el ADN bicatenario y la visualización de las bandas de ADN bajo una lámpara de UV. Otros medios para detectar los productos de la amplificación comprenden la hibridación con sondas de oligonucleótidos. De forma alternativa, la fluorescencia o la transferencia de energía puede medirse para determinar la presencia de ADN metilado.
- Un ejemplo específico de la técnica MSP se diseña para la MSP cuantitativa en tiempo real (QMSP) y permite una cuantificación fiable del ADN metilado en tiempo real o en un punto final. Los métodos en tiempo real se basan generalmente en la vigilancia óptica continua de un procedimiento de amplificación y utilizar reactivos marcados fluorescentemente cuya incorporación en un producto puede cuantificarse y cuya cuantificación es indicadora del número de copias de esta secuencia en el molde. Uno de los mencionados reactivos es un colorante fluorescente denominado SYBR green I que se une preferentemente al ADN bicatenario y cuya fluorescencia está muy potenciada por la unión al ADN bicatenario. De forma alternativa, los cebadores marcados y/o las sondas marcadas se pueden utilizar para la cuantificación. Representan una aplicación específica de las técnicas de amplificación en tiempo real bien conocidas y comercialmente disponibles tales como TAQMAN®, MOLECULAR BEACONS®, AMPLIFLUOR® y SCORPION® DzyNA®, Plexor™ etc.
- De acuerdo con ello, en una realización adicional, el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, se determina mediante la PCR específica de metilación, preferentemente la PCR en tiempo real o la PCR específica de metilación en el punto final. En realizaciones específicas, la PCR en tiempo real o la PCR específica de metilación en el punto final comprende el uso de sondas TAQMAN y/o sondas MOLECULAR BEACONS y/o cebadores AMPLIFLUOR y/o sondas FRET y/o cebadores SCORPION y/o bloqueantes de oligonucleótidos y/o cebadores DzyNA.
- En el sistema de la PCR en tiempo real, es posible vigilar la reacción de la PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de la PCR está correlacionado con la cantidad inicial del molde diana. La tecnología TaqMan utiliza sondas de oligonucleótidos lineales hidrolíticas que contienen un colorante fluorescente y un colorante de inactivación rápida. Cuando se irradian, el colorante fluorescente excitado transfiere energía a la molécula de colorante inactivante cercana en lugar de emitir fluorescencia (principio FRET). Las sondas TaqMan se hibridan con una región interna del producto de la PCR y se escinden debido a la actividad exonucleasa de la polimerasa cuando esta replica un molde.
- Esto detiene la actividad del inactivador, y el colorante indicador comienza a emitir fluorescencia que aumenta en cada ciclo, de forma proporcional a la velocidad de escisión de la sonda.
- Las balizas moleculares contienen también colorantes fluorescentes e inactivadores, pero se diseñan para adoptar una estructura en horquilla cuando están libres en solución para poner ambos colorantes en estrecha proximidad para que se produzca el FRET. Cuando la baliza se hibrida con la diana durante la etapa de hibridación, ambos colorantes (donante y aceptor/inactivador) se separan y el aumento en la fluorescencia se correlaciona con la cantidad de producto de la PCR disponible. Los experimentos descritos en el presente documento muestran que las balizas moleculares son particularmente útiles para vigilar la reacción de amplificación de la PCR durante la fase exponencial. De esta manera, se pueden emplear ventajosamente balizas moleculares en determinadas realizaciones de la invención.
- Con las sondas *scorpion*, el cebado específico de secuencia y la detección del producto de la PCR se consiguen utilizando un único oligonucleótido. La sonda *scorpion* mantiene una configuración de tallo-bucle en el estado no hibridado y se produce FRET. La porción 3' del tallo contiene también una secuencia que es complementaria del producto de extensión del cebador. Esta secuencia está unida al extremo 5' de un cebador específico mediante un monómero no amplificable. Tras la extensión de la sonda *scorpion*, la secuencia específica de la sonda es capaz de unirse a su complemento en el amplicón ampliado, abriendo de esta manera el bucle en horquilla y proporcionando una señal de fluorescencia.
- De manera similar a las Scorpion, la técnica Amplifluor se basa en la incorporación de una sonda de tipo baliza molecular a un cebador. De nuevo, la estructura en horquilla de la sonda forma parte del propio cebador de amplificación. Sin embargo, al contrario que los cebadores de tipo Scorpion, no existe bloqueo en el extremo 5' de la sonda a fin de evitar que se amplifique y forme parte de un producto de amplificación. De acuerdo con ello, el cebador se une a una hebra molde y dirige la síntesis de la hebra complementaria. El cebador por tanto se convierte en parte del producto de la amplificación en el primer ciclo de amplificación. Cuando se sintetiza la hebra complementaria, se produce la amplificación a través de la estructura de horquilla. Esto separa las moléculas de fluoróforo e inactivador, llevando de esta manera a la generación de fluorescencia a medida que continúa la amplificación.

En un formato Amplifluor variante, el cebador específico de la secuencia transporta una secuencia "Z" de adición en su extremo 5' y da como resultado un producto de amplificación inicial que contiene el complemento de la secuencia "Z". Se diseña un segundo cebador con una configuración de tallo-bucle para contener la secuencia "Z" y se hibrida al molde que contiene el complemento de "Z". Durante la reacción de polimerización, las moléculas indicadora e inactivadora se incorporan al producto. Este producto sirve como molde para la amplificación adicional. Como la conformación en horquilla del molde se despliega durante la polimerización, se observa una señal de fluorescencia.

En Heavymethyl, el cebado es específico de la metilación, pero los bloqueantes de oligonucleótidos no extensibles proporcionan esta especificidad en vez de los propios cebadores. Los bloqueantes se unen al ADN tratado con bisulfito de una manera específica de la metilación, y sus sitios de unión solapan los sitios de unión del cebador. Cuando el bloqueante está unido, el cebador no se puede unir y por tanto no se genera el amplicón. Se puede usar Heavymethyl en combinación con la detección en tiempo real o en punto final.

Los sistemas Plexor™ qPCR y qRT-PCR pueden aprovechar la interacción específica entre dos nucleótidos modificados para conseguir el análisis de la PCR cuantitativa. Uno de los cebadores de la PCR contiene una marca fluorescente adyacente a un resto iso-dC en el extremo 5'. El segundo cebador de la PCR está sin marcar. La mezcla de reacción incluye desoxinucleótidos y un sitio iso-dGTP modificado con el inactivador dabcyI. DabcyI-iso-dGTP se incorpora preferentemente en la posición complementaria al resto iso-dC. La incorporación del dabcyI-iso-dGTP en esta posición da como resultado la inactivación del colorante fluorescente en la hebra complementaria y una reducción en la fluorescencia, que permite la cuantificación durante la amplificación. Para estas reacciones multiplete, se usa una pareja de cebadores con un fluoróforo diferente para cada secuencia diana.

La PCR en tiempo real detecta la acumulación del amplicón durante la reacción. Sin embargo, no necesitan utilizarse los métodos en tiempo real. Muchas aplicaciones no requieren cuantificación y la PCR en tiempo real se usa solo como herramienta para obtener una presentación y almacenamiento de datos conveniente, y al mismo tiempo para evitar una manipulación posterior a la PCR. De esta manera, se pueden llevar a cabo solo los análisis para confirmar si el ADN diana está presente en la muestra o no. Dicha verificación de punto final se lleva a cabo tras finalizar la reacción de amplificación. Este conocimiento se puede usar en un laboratorio diagnóstico médico para detectar una predisposición, o incidencia, de cáncer en un paciente. Las técnicas de detección de la fluorescencia de la PCR de punto final pueden utilizar los mismos enfoques que se han utilizado ampliamente para la PCR en tiempo real. Por ejemplo, el detector "Gene" permite la medida de la fluorescencia directamente en tubos de la PCR. De acuerdo con ello, en una realización preferida adicional, el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, se determina mediante la amplificación de la PCR específica de metilación y, preferentemente la PCR específica de metilación se vigila en el punto final de la amplificación.

En una realización particular, se proporcionan cebadores útiles en la MSP transportados en el gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. Los cebadores de la invención se diseñan preferentemente para unirse a secuencias genómicas completamente metiladas en las regiones en investigación. Estos cebadores pueden comprender, consistir esencialmente en o consistir en las siguientes secuencias:

S= cebador de sentido directo (5' - 3')

AS= cebador de sentido contrario (5' - 3')

MB= baliza molecular (balizas de modificación: 5' FAM, 3' DABCYL)

RASSF1A_S (SEC ID NO. 1): GCGTTGAAGTCGGGGTTC

RASSF1A_AS (SEC ID NO. 2): CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG

RASSF1A_MB (SEC ID NO. 3): CGTCTGCGTGGTTTCGTTTCGGTTCGCGTTTGTAGGCAGACG

APC(2)_S (SEQ ID NO. 4): TAT TGC GGA GTG CGG GTC

APC(2)_AS (SEQ ID NO. 5): TCG ACG AAC TCC CGA

APC(2)_MB (SEQ ID NO. 6): CGACATGCGTTGTGTAATTCGTTGGATGCGGATTAGGGCGGCATGTCCG

CCNA1_gron_S (SEC ID NO. 7): GTTATGGCGATGCGGTTTC

CCNA1_gron_AS (SEC ID NO. 8): CCAACCTAAAAACGACCGA

CCNA1_gron_MB (SEC ID NO. 9): CGACATGCACGACGCCCCCGAACCTAACGCATGTCCG

TNFRSF25_1_S (SEC ID NO. 10): GTCGTCGAGAAGGGTTCGTTT

TNFRSF25_1_AS (SEC ID NO. 11): GCGTATTCTACTTAACCTATCCGC

TNFRSF25_1_MB (SEC ID NO. 12): CGACATGCACGACCCCGCCTCCCCCGCCGCATGTCCG

TUBB4_2_S (SEC ID NO. 13): TAAATTAGATCGTCGTTTCGGAG

TUBB4_2_AS (SEC ID NO. 14): TACCTCAATTTCTCGATCCGC

TUBB4_2_MB (SEC ID NO. 15): CGACATGCTGGGAGGGTTCGCGGTTATTGTAAGGAGCATGTCCG

NTRK2_1_M_S (SEC ID NO. 16): GTTAGAGCGCGTTCGTTTTCGCGT

NTRK2_1_M_AS (SEC ID NO. 17): CCGCAATACCTAACACTTCCG
 NTRK2_1_MB (SEC ID NO. 18): CGACATGCCCGACACGCTCCGAAACACCAGCATGTCCG

OSMR_1_S (SEC ID NO. 19): GTGTTAAGAGTGCGTAGTAAGACG
 OSMR_1_AS (SEC ID NO. 20): GAAACGAACGTACAAAAACGA
 OSMR_1_MB (SEC ID NO. 21): CGACATGCCGAAACTATAAATCAACTACGAAACAAACGCGCATGTCCG

TWIST1_3_S (SEQ ID NO.22): GTTAGGGTTCGGGGCGTTGTT
 TWIST1_3_AS (SEC ID NO. 23): CCGTCGCCTTCCTCCGACGAA
 TWIST1_3_MB (SEQ ID NO.24): CGACATGCCGCGGGGAAGGAAATCGTTTCGCATGTCCG

LOXL1_29309_S (SEC ID NO. 25): TAGAGTACGTGTCCGGTCGGAT
 LOXL1_29309_AS (SEQ ID NO.26): ACAAAAACAAAAACGACGCCT
 MB_LOXL1_29309b (SEC ID NO. 27): CGACATGCCGGGTGTTGTTGGTCCGCGCGCATGTCCG

TJP2_25301_S (SEC ID NO. 28): GAGATCGCGGGTTTTTATTTTC
 TJP2_25301_AS (SEC ID NO. 29): CCAACTTCCTACGACGCAT
 TJP2_25301_MB (SEC ID NO. 30): CGACATGCCTCCCAACCGCGCGACACAAGCATGTCCG

Runx3_3_M_S (SEC ID NO. 31): CGTAGGGTTGTATTTGAGCGA
 Runx3_3_M_AS (SEC ID NO. 32): TAACTTTTAACGAAATTACCCCG
 RUNX3_3_MB2 (SEC ID NO. 33): CGACATGCCGGTTAGGGGGCGTAAATTTTATTCGTTGCATGTCCG

PDLIM4_4_M_S (SEC ID NO. 34): GGCGTTTAGGTTAATTTTTCGT
 PDLIM4_4_M_AS (SEC ID NO. 35): CGATCCCATATCTAAAACCGA
 PDLIM4_4_MB (SEC ID NO. 36): CGACATGCCTCGCGATCCGCCCGAAACGCATGTCCG

BMP7_17911_S (SEC ID NO. 37): AGCGTAGAGATAGGTTGGTAACG
 BMP7_17911_AS (SEC ID NO. 38): AAAACGATAACCCTTAAACCGA
 MB_BMP7_17911 (SEC ID NO. 39): CGACATGCGCGGAGGGGTTAGCGTGGTTGCATGTCCG

NID2_9091_S (SEC ID NO. 40): GCGGTTTTTAAGGAGTTTTATTTTC
 NID2_9091_AS (SEC ID NO. 41): CTACGAAATTCCTTTACGCT
 MB_NID2_9091 (SEC ID NO. 42): CGACATGGGTTGTAAGGTTTGGGGTAGCGGCCATGTCCG

ARFGAP3_25342_S (SEC ID NO. 43): GCGTTAAGGTACGGGTTTTTTC
 ARFGAP3_25342_A (SEC ID NO. 44): GCCATTTGCGCTAACGAAC
 ARFGAP3_25342_MB (SEC ID NO. 45): CGACATGCACGCGCCCTCCTTCGACACGCATGTCCG

Las características adicionales de estos cebadores se resumen en la parte experimental. Se señala que se pueden utilizar variantes de estas secuencias en la presente invención. En particular, se pueden añadir secuencias flanqueantes adicionales, por ejemplo, para mejorar la especificidad de unión, según se requiera. Las secuencias variantes tienen preferentemente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad en la secuencia de nucleótidos con las secuencias de nucleótidos de los cebadores y/o las sondas que se muestran en el presente documento. Los cebadores y las sondas pueden incorporar análogos de nucleótidos sintéticos según sea adecuado o pueden estar basados por ejemplo en ADN, ARN, o APN, o las mezclas de los mismos. De forma similar, los restos donantes y aceptores fluorescentes alternativos/parejas FRET pueden utilizarse según sea adecuado. Además de marcarse con los restos donante y aceptor fluorescentes, los cebadores y sondas pueden incluir oligonucleótidos modificados y otros grupos y marcas adjuntos con la condición de que la funcionalidad como cebador y/o sonda en los métodos de la invención no esté comprometida.

En las realizaciones en tiempo real, la cuantificación puede ser sobre una base absoluta, o puede ser relativa a un ADN metilado constitutivamente normalizado, o puede ser relativa a un ADN no metilado normalizado. Puede determinarse el estado de la metilación utilizando la relación entre la señal del marcador bajo investigación y la señal de un gen de referencia donde se conoce el estado de la metilación (tal como, por ejemplo, β -actina), o utilizando la relación entre el marcador metilado y la suma del marcador metilado y el marcador no metilado. De forma alternativa, se puede determinar el número absoluto de copias del gen marcador metilado.

Pueden necesitarse controles adecuados para asegurar que el método seleccionado está funcionando correcta y fiablemente. Los controles adecuados pueden incluir evaluar el estado de la metilación de un gen conocido que se va a metilar. Este experimento actúa como control positivo para asegurar que no se obtienen resultados falsos negativos. El gen puede ser uno que se sabe que se va a metilar en la muestra bajo investigación o puede haberse metilado artificialmente, utilizando por ejemplo una enzima metiltransferasa adecuada, tal como Sssl metiltransferasa. En una realización, el gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR puede evaluarse en células

normales, tras el tratamiento con Sssl metiltransferasa, como control positivo.

Adicional, o alternativamente, se pueden emplear controles negativos adecuados con los métodos de la invención. En el presente documento, los controles adecuados pueden incluir evaluar el estado de la metilación de un gen conocido que se va a desmetilar o un gen que se ha desmetilado artificialmente. Este experimento actúa como control negativo para asegurar que no se obtienen resultados falsos positivos. En una realización, el gen seleccionado entre NID2, a TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se puede evaluar en células normales como control negativo ya que se ha mostrado por primera vez en el presente documento que el gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR está desmetilado en tejidos normales.

Aunque la PCR es la técnica de amplificación de ácidos nucleicos preferida, se puede utilizar también para detectar el estado de metilación del gen implicado. Dichas técnicas de amplificación son bien conocidas en la materia e incluyen métodos tales como NASBA (Compton, 1991), 3SR (Fahy et al., 1991) y la amplificación mediada por transcripción (TMA). Otros métodos de amplificación adecuados incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barringer et al, 1990), amplificación selectiva de las secuencias del polinucleótido diana (patente de Estados Unidos N.º 6.410.276), reacción en cadena de la polimerasa cebada con la secuencia consenso (patente de Estados Unidos N.º 4.437.975) reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (documento WO 90/06995), tecnología de invasor, tecnología de desplazamiento de hebra, y amplificación de desplazamiento de muescas (documento 2004/067726). No se pretende que esta lista sea exhaustiva; se puede usar cualquier técnica de amplificación de ácidos nucleicos con la condición de que el producto de ácido nucleico adecuado se amplifique específicamente. De esta manera, estas técnicas de amplificación pueden vincularse, por ejemplo, a las técnicas de secuenciación con MSP y/o bisulfito.

La aplicación de los métodos de la presente invención sobre pequeñas cantidades en exceso de ADN metilado anómalamente, que se liberan en los fluidos recogidos tales como, por ejemplo, suero, orina, muestras de lavados, etc., puede requerir la generación y amplificación de una biblioteca de ADN antes del ensayo para determinar la metilación de cualquier gen específico. Se describen métodos adecuados sobre la amplificación del genoma completo y la generación de bibliotecas para dicha amplificación (por ejemplo, tecnología Methylplex y Enzyplex, Rubicon Genomics) en los documentos US 2003/0143599, WO 2004/081225 y WO 2004/081183. Además, el documento WO 2005/090507 se refiere a métodos de generación/amplificación de bibliotecas que requieren aplicaciones basadas tanto en la conversión del bisulfito o sin bisulfito. El tratamiento con bisulfito puede producirse antes o después de la construcción de bibliotecas y puede requerir el uso de adaptadores resistentes a la conversión del bisulfito. Met-DOP-PCR (Di Vinci et al, 2006), una amplificación mediante la PCR cebada con oligonucleótidos degenerados modificados (DOP-PCR) que está combinada con MSP proporciona otro método adecuado para la detección específica en una cantidad pequeña de ADN. La gestión mejorada de los cuidados al paciente puede requerir estos métodos y técnicas existentes para suplementar los métodos de la invención.

Como el silenciamiento epigenético de un gen se manifiesta por sí mismo más frecuentemente en la expresión disminuida en células tumorales, la invención proporciona un método para detectar el cáncer o la predisposición a cáncer, en concreto, en el cáncer de vejiga, que comprende detectar el silenciamiento epigenético de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde en el silenciamiento epigenético del gen del al menos un gen se determina por la medida de los niveles de expresión del gen y donde la expresión reducida del gen es indicadora del cáncer o la predisposición a cáncer.

Puede observarse en la muestra la pérdida total de expresión de la proteína del gen seleccionado entre los genes NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR a fin de concluir un diagnóstico o predisposición a cáncer de vejiga, o para tomar una decisión del mejor curso de tratamiento de acuerdo con los otros métodos de la invención. Sin embargo, la pérdida parcial de la expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR puede ser también relevante, debido a la metilación del gen relevante.

La disminución en el nivel de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR puede medirse, según sea necesario, para determinar si este es estadísticamente significativo en la muestra. Esto ayuda a proporcionar un test fiable para los métodos de la invención. Se puede utilizar cualquier método para determinar si el nivel de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF-1A y OSMR es significativamente reducido. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica y se emplean de manera rutinaria. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo análisis estadísticos utilizando un análisis del test de la varianza. Los valores p típicos para su uso en dicho método serían valores P de < 0,05 o 0,01 o 0,001 cuando se determina si la expresión o la actividad relativa es estadísticamente significativa. Un cambio en la expresión puede considerarse significativo si, por ejemplo, existe al menos una disminución del 10%. El ensayo puede hacerse más selectivo realizando el cambio al menos un 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% o 50%, por

ejemplo, a fin de considerarse estadísticamente significativo.

En una realización preferida, se determina el estado de metilación de la región promotora del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR con referencia a la muestra del control. Esta muestra del control se toma preferentemente de tejido normal (es decir, no tumorigénico) en el sujeto cuando la expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR es normal. Adicional, o alternativamente, las muestras del control pueden también utilizarse cuando se sabe que tienen una ausencia de expresión del gen involucrado. Se pueden incluir también controles adicionales adecuados para asegurar que el ensayo está funcionando adecuadamente, tal como los niveles de medición de la expresión o la actividad de un gen de referencia adecuado en las muestras de ensayo y de control.

Puede medirse la expresión de un ácido nucleico en una muestra de ensayo para el ARN o la proteína. Se pueden emplear métodos que empleen la hibridación de la sonda de ácido nucleico a los transcrito(s) relevantes(s) de un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR para medir la presencia y el nivel de ARNm. Dichos métodos incluyen el uso de matrices de sondas de ácidos nucleicos (tecnología de micromatrices) y transferencias Northern. Los avances en las tecnologías genómicas permiten ahora el análisis simultáneo de miles de genes, aunque pueden estar basados en el mismo concepto de hibridación de la diana específica de sonda. Los métodos basados en la secuenciación son una alternativa. Estos métodos se inician con el uso de etiquetas de las secuencias expresadas (EST) y ahora incluyen los métodos basados en etiquetas cortas, tales como el análisis en serie de la expresión del gen (SAGE) y la secuenciación de la firma masivamente en paralelo (MPSS). Diferentes técnicas de expresión proporcionan otros medios diferentes de analizar la expresión génica; esta familia de técnicas se basa en la amplificación aleatoria de fragmentos de ADNc generados por la digestión de restricción, y bandas que difieren entre dos tejidos para identificar los ADNc de interés.

En una realización preferida, los niveles de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se determinan usando la reacción en cadena de la polimerasa mediante la transcriptasa inversa (RT-PCR). La RT-PCR es una técnica bien conocida en la materia que se basa en la enzima transcriptasa inversa para transcribir de forma inversa el ARNm para formar ADNc, que se puede amplificar a continuación en una reacción de la PCR convencional. Los protocolos y kits para llevar a cabo la RT-PCR son extremadamente bien conocidos de los expertos en la materia y están comercialmente disponibles.

La RT-PCR se puede llevar a cabo de una manera no cuantitativa. Las medidas de la RT-PCR en punto final cambian los niveles de expresión utilizando tres métodos diferentes: relativo, competitivo y comparativo. Estos métodos tradicionales son bien conocidos en la materia. De forma alternativa, se lleva a cabo la RT-PCR en tiempo real y de manera cuantitativa. La RT-PCR cuantitativa en tiempo real se ha descrito ampliamente en la bibliografía y son posibles una variedad de técnicas. Los ejemplos incluyen el uso de Taqman, balizas moleculares, Scorpion, Plexor y Amplifluor como se ha descrito ya. Todos estos sistemas están comercialmente disponibles y bien caracterizados, y pueden permitir el multiplexado. Como se ha mencionado, la PCR es un método de amplificación preferido, pero se incluyen también variantes de la técnica básica y otras técnicas de amplificación en el alcance de la invención.

Los métodos adecuados para determinar la expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR al nivel de la proteína son también bien conocidos por un experto en la materia. Los ejemplos incluyen transferencias western, tinción inmunohistoquímica e inmunolocalización, inmunofluorescencia, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos de inmunoprecipitación, ensayo de fijación del complemento, reacciones de aglutinación, radioinmunoensayo, citometría de flujo, espectrometría de masas, y diálisis en equilibrio. Estos métodos dependen generalmente de un reactivo específico para identificar el producto génico de un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. El reactivo es preferentemente un anticuerpo y puede comprender anticuerpos monoclonales o policlonales. Pueden utilizarse también fragmentos y anticuerpos derivados, que incluyen sin limitación fragmentos Fab, ScFv, anticuerpos de dominio único, nanoanticuerpos, anticuerpos de cadena pesada, aptámeros, etc..., que retienen la función de unión del producto génico. Puede emplearse cualquier método de detección de acuerdo con la invención. La naturaleza del reactivo no está limitada excepto que debe ser capaz de identificar específicamente el producto génico adecuado.

Por supuesto, en el caso de un diagnóstico positivo de cáncer, habrá niveles reducidos o nulos de las proteínas relevantes codificadas por al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. En una realización esto presentará un resultado negativo. En este caso, el uso de controles adecuados asegura que no se realizarán diagnósticos falsos producidos, por ejemplo, por reactivos degradados o no específicos. De esta manera, se puede ensayar el mismo reactivo sobre muestras donde se sabe que se expresa al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2,

TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. Un resultado positivo en esta muestra del control, combinado con un resultado negativo en la muestra de ensayo, proporciona un diagnóstico de confianza del cáncer y elimina cualquier duda sobre la calidad del reactivo.

- 5 La medición de la expresión de un gen por sí mismo no indica que el silenciamiento sea epigenético y el mecanismo de silenciamiento podría ser genético, por ejemplo, por mutación somática. Puede incluirse un tratamiento adicional con reactivos tales como DAC (5'-desazacitidina), TSA u otro tratamiento que afecta a los mecanismos epigenéticos presentes en las líneas de células a fin de determinar si el silenciamiento del gen es epigenético. Normalmente, la expresión se reactiva o invierte tras el tratamiento con dichos reactivos, indicando que el silenciamiento es epigenético.

10 Tras el diagnóstico, el tratamiento se decide de acuerdo con el estadio del cáncer. El «estadio» del cáncer es un descriptor (usualmente números I a IV) de lo mucho que el cáncer se ha diseminado. El estadio tiene a menudo en cuenta el tamaño del tumor, lo profundo que ha penetrado, si ha invadido órganos adyacentes, sí y cuántos ganglios linfáticos ha metastatizado y si se ha diseminado a órganos diferentes. La estadificación del cáncer es importante ya que el estadio en el diagnóstico es el mejor predictor de supervivencia, y los tratamientos se cambian a menudo basándose en el estadio. Por ejemplo, aproximadamente 70% a 80% de pacientes a los que se les ha diagnosticado cáncer de vejiga presentarán tumores superficiales de vejiga (estadio Ta, Tis, o T1). Los tumores Tis, denominados también CIS (carcinoma in situ), son tumores planos confinados al urotelio pero que, si no se tratan, progresarán hasta una enfermedad invasiva del músculo. Los tumores que son T2 y T3 son indicativos de invasión en el músculo o la grasa de la vejiga. Los tumores en estadio 4 representan aquellos que han invadido la pared pélvica o abdominal o han metastatizado a órganos adyacentes.

25 El estado de metilación y/o el nivel de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, puede estar correlacionado con el estadio del cáncer. La sección experimental proporciona evidencias sobre la metilación de determinados genes seleccionados entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR que se produce en el estadio temprano del cáncer. Los cambios de la metilación que se desarrollan inicialmente en el proceso de la carcinogénesis no son solo ideales a fines de selección, sino que también son dianas interesantes para vigilar la estadificación y la patología y/o vigilar la progresión o el resultado de la enfermedad, comprobando la recidiva de la enfermedad tras el tratamiento. De esta manera, el marcador es particularmente útil en un método de pronóstico del cáncer que comprende detectar el silenciamiento epigenético del al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR donde el silenciamiento epigenético del gen es indicador del desarrollo del cáncer. Relacionado con lo anterior, la invención proporciona también un método para determinar el estadio del cáncer que comprende determinar el silenciamiento epigenético de un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. En una realización, el sujeto está desarrollando o está en riesgo de desarrollar un cáncer AJCC es estadio I, II, III o IV. En este método, se obtiene una muestra de un sujeto que padece o es sospechoso de padecer cáncer. En todas estas realizaciones, el silenciamiento epigenético se detecta por determinación del estado de metilación y/o la medición de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR.

45 Todos los métodos de la presente invención se utilizan preferentemente vinculados al cáncer de vejiga. Para alcanzar altas tasas de detección de tumores, puede ser necesario complementar los métodos de la invención con métodos establecidos para la identificación del cáncer de vejiga. Los métodos no invasivos pueden ser especialmente adecuados para uso junto con los métodos no invasivos de la invención. Los métodos de la presente invención se usan preferentemente junto con uno o más de los siguientes métodos:

- 50
- Análisis de orina
 - Citología de orina (examen microscópico de orina para observar células cancerosas)
 - Cistoscopia (uso de instrumentos provistos de luz para visualizar el interior de la vejiga. El diagnóstico y la estadificación del cáncer de vejiga comienza con una cistoscopia)
 - 55 • Biopsia de vejiga (llevada a cabo usualmente durante la cistoscopia)
 - Pielograma intravenoso- IVP (Se inyectan colorantes en el torrente sanguíneo, lo que permiten una mejor visualización de algunos tumores o anomalías en la vejiga usando rayos X de forma rutinaria).
 - Técnicas de diagnóstico por imágenes: Se puede llevar a cabo el diagnóstico por imágenes de rayos X del tracto urinario superior (incluyendo los uréteres y los riñones) para descartar cualquier implicación de estas estructuras. Se pueden usar ultrasonidos para estudiar los riñones y un barrido CT es a menudo muy bueno para estudiar la longitud completa del tracto urinario.
- 60

De forma más reciente, se están desarrollando ensayos de marcadores basados en orina y proporcionan otro medio más para complementar los métodos de la invención. Estos nuevos ensayos no son invasivos y son fiables para detectar el cáncer de vejiga de grado bajo y, por tanto, son especialmente útiles en la vigilancia de la recidiva. Comprenden:

65

- Ensayos BTA (Polymedco, antes Bard Diagnostics, EE.UU.) detecta hCFHrp, o la proteína relacionada con el factor H del complemento humana, que está presente en la orina de pacientes con cáncer de vejiga. Están disponibles métodos BTA cuantitativos y cualitativos.
- 5 ▪ El Kit de ensayo NMP22 (Matritech Inc., Newton, MA) detecta una proteína del aparato mitótico nuclear (NMA) que es abundante en la matriz nuclear. En las células de tumor de vejiga, NMA es elevada y se libera en niveles detectables. Existen métodos NMP22 cuantitativos y cualitativos.
- 10 ▪ El ensayo Vysis UroVysion (Abbot (Molecular Diagnostics) combina la citología de la orina con tecnología molecular (basada en ADN) para detectar la recidiva del cáncer. Emplea tecnología de hibridación con fluorescencia in situ (FISH), que utiliza sondas de ADN pequeñas marcadas fluorescentes para identificar microscópicamente regiones específicas del ADN.
- 15 ▪ ImmunoCyt (DiagnoCure) es un ensayo de inmunocitoquímica para la detección de mucina y antígenos de CEA expresados por células tumorales en la orina de pacientes a los que se les ha diagnosticado previamente cáncer de vejiga. Este método de inmunofluorescencia se va a combinar con una citología de orina para la detección temprana de la recidiva del cáncer de vejiga. ImmunoCyt es un ensayo cualitativo.

20 El direccionamiento de múltiples alteraciones del ADN puede aumentar la identificación eficaz del cáncer. Por tanto, se pueden usar marcadores genéticos adicionales para suplementar los métodos de la invención. Los marcadores genéticos pueden referirse a marcadores de mutaciones que permiten la detección de mutaciones en genes distintos, o, alternativamente, marcadores epigenéticos que permiten la detección de la metilación del ADN en genes distintos.

25 Como se describe en el presente documento, una combinación de los métodos de la invención con la citología (urinaria) y/o el análisis de la mutación FGFR3 ha mostrado potenciar marcadamente la sensibilidad asociada con la citología y el análisis de la mutación reteniendo a la vez la especificidad. De esta manera, en términos generales, la invención proporciona la potenciación de la detección del cáncer de vejiga mediante una combinación de la determinación del estado de la metilación de los genes relevantes y la citología y/o el análisis de la mutación. Los métodos de la invención pueden utilizarse en combinación con la citología urinaria y/o el análisis de la mutación en determinadas realizaciones. En realizaciones específicas, el análisis de la mutación comprende, consiste esencialmente de o consiste en el análisis de la mutación en el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3). Se han notificado mutaciones FGFR3 muy frecuentes en tumores de vejiga de bajo estadio y grado. Pueden utilizarse de esta manera métodos que incluyen la detección de la mutación en FGFR3 para diagnosticar, prever, etc., el cáncer de vejiga superficial o en estadio temprano en determinadas realizaciones. Se puede emplear cualquier técnica de análisis de mutaciones adecuada. En realizaciones específicas, se lleva a cabo la identificación de una o más mutaciones de nucleótidos únicos en el gen FGFR3. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de ensayos de extensión de cebadores adecuados, tales como los descritos por Van Oers et al (Clinical Cancer Research 2005, 11 (21) 1 de noviembre de 2005) cuya referencia se incorpora en el presente documento en su totalidad. Se muestran como sigue los cebadores para uso en estos métodos:

- SEQ ID NO:49 - 5'-T₄₆CGTCATCTGCCCCACAGAG-3'
- SEQ ID NO:50 - 5'-T₃₆TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'
- SEQ ID NO:51 - 5'-T₂₈TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'
- 45 SEQ ID NO:52 - 5'-T₂₉GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3'
- SEQ ID NO:53 - 5'-T₄₃ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3'
- SEQ ID NO:54 - 5'-T₃₄CCTGTTCATCCTGGTGGTGG-3'
- SEQ ID NO:55 - 5'-T₅₀GCACAACCTCGACTACTACAAG-3'
- 50 SEQ ID NO:56 - 5'-T₂₀CACAACCTCGACTACTACAAGA-3'

De esta manera, se pueden identificar las siguientes mutaciones: R248C, S249C, G372C, Y375C, A393E, K652E/Q, K652M/T, como se muestra en la siguiente tabla. Los métodos pueden emplear la PCR multiplete seguida por la extensión del cebador de nucleótido único utilizando didesoxinucleótidos marcados.

Cebador	Secuencia	Hebra	Extensión del cebador		Concentración (pmol/μl)
			Tipo natural	Mutante	
R248C	5'-T ₄₆ CGTCATCTGCCCCACAGAG-3'	sentido directo	C	T	2,0
S249C	5'-T ₃₆ TCTGCCCCACAGAGCGCT-3'	sentido directo	C	G	1,2
S249C	5'-T ₂₈ TCTGCCCCACAGAGCGCT 3'	sentido directo	C	G	1,2
G372C	5'-T ₂₉ GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3'	sentido directo	G	T	0,4
Y375C	5'-T ₄₃ ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3'	sentido directo	A	G	0,6
A393E	5'-T ₃₄ CCTGTTCATCCTGGTGGTGG- 3'	sentido directo	C	A	2,4
K652E/Q	5'-T ₅₀ GCACAACCTCGACTACTACAAG-3'	sentido directo	A	G/C	1,2
K652M/T	6'-T ₂₀ CACAACCTCGACTACTACAAGA 3'	sentido directo	A	T/C	0,8

Se pueden investigar adicional o alternativamente otros marcadores moleculares, tales como el marcado con Ki-67 (tinción MIB-1).

5 En determinadas realizaciones de los métodos de la invención, el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se analiza en combinación con el menos un gen diferente implicado en el establecimiento del cáncer, en particular, cáncer de vejiga. Están también abarcados, como se describe en el presente documento, los paneles de dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc., hasta todos los genes relacionados. Se prefiere especialmente el uso del panel de tres genes, NID2, TWIST1 y RUNX3 en combinación con una citología
10 urinaria y/o el análisis de la mutación FGFR3.

Preferentemente, el al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se combina con al menos dos genes más implicados en el establecimiento del cáncer (de vejiga). Preferentemente, el al menos un gen seleccionado entre
15 NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR se combina con y al menos tres, cuatro, cinco o seis genes diferentes implicados en el establecimiento del cáncer. Puede utilizarse cualquier gen implicado en el establecimiento del cáncer de vejiga en combinación con el gen seleccionado en el método de la presente invención.

20 El ensayo se puede llevar a cabo diagnósticamente o asociado con un régimen terapéutico. La pérdida de la función epigenética de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR puede rescatarse mediante el uso de agentes desmetilantes del ADN y/o inhibidores de la ADN metiltransferasa. Se puede usar el ensayo para determinar qué régimen, terapéutico o preventivo, debe emplearse en un paciente y utilizarse para vigilar la eficacia de un
25 régimen terapéutico.

De acuerdo con ello, se proporciona también un método para prever la probabilidad de un tratamiento satisfactorio del cáncer de vejiga con un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor HDAC, que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2,
30 TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético es indicadora de que la probabilidad de tratamiento satisfactorio es mayor que si no se detectara la modificación epigenética. De forma alternativa, el método comprende la medición de los niveles de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde un nivel reducido de expresión
35 indica que la probabilidad de un tratamiento satisfactorio es mayor que si el gen se expresa a un nivel mayor.

Se describe también en el presente documento un método para prever la probabilidad de resistencia al tratamiento del cáncer de vejiga con un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa y/o un inhibidor de HDAC que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1,
40 TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM9, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético es indicadora de que la probabilidad de tratamiento satisfactorio es menor que si no se detectara la modificación epigenética. De forma alternativa, el método comprende la medición de los niveles de expresión del gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde un mayor nivel de expresión indica
45 que la probabilidad de resistencia al tratamiento de cáncer es mayor que si el gen se expresa a un nivel reducido.

La pérdida epigenética de la función génica puede identificar la necesidad de tratamiento, que puede diferir de acuerdo con el tipo de carcinoma. Por tanto, el método descrito se refiere también a un método de selección de un régimen de tratamiento adecuado para el cáncer de vejiga que comprende detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4,
50 NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección del cambio epigenético da como resultado la selección de un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor de HDAC para el tratamiento y donde si no se detecta el cambio epigenético, no se selecciona un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN y/o un inhibidor de HDAC para el tratamiento.

55 En determinados aspectos, la pérdida epigenética de la función génica puede identificar la necesidad de tratamiento. De acuerdo con ello, se describe también un método para prever el tratamiento adecuado de un carcinoma de células de transición o un carcinoma escamocelular en una muestra obtenida de un sujeto que comprende, determinar el estado de metilación de al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7,
60 RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, en un tumor de células de transición, donde si al menos un gen está metilado, en particular, si está hipermetilado, se identifica la necesidad de resección del carcinoma de células de transición. En dicho caso, puede recomendarse un tratamiento preventivo e implica la resección del carcinoma de células de transición.

65 Se describe también un método para prever el tratamiento adecuado de un carcinoma de células de transición o carcinoma escamocelular obtenido de un sujeto, determinar el estado de metilación de al menos un gen

seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR en un tumor de células de transición, donde si al menos un gen está sin metilar o metilado en un grado menor, se decide que no hay necesidad de resección del tumor de células de transición.

5 En un aspecto adicional relacionado, la invención proporciona un método de tratamiento del cáncer de vejiga en un sujeto que comprende la administración de un agente desmetilante del ADN y/o un inhibidor de la metiltransferasa del ADN donde el sujeto se ha seleccionado para el tratamiento sobre la base de un método como se describe en el presente documento.

10 La invención se refiere también al uso del cual se puede dar a fin de llevar a cabo los métodos de la invención. Los kits pueden incorporar cualquiera de las características preferidas mencionadas junto con los diversos métodos (y usos) de la invención en el presente documento.

15 De esta manera, se proporciona un kit para detectar una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende al menos una pareja de cebadores (como se define en el presente documento) para determinar el estado de metilación de cada uno de NID2, TWIST1 y RUNX3. Como se describe en el presente documento, este panel de genes ha mostrado ser útil para prever o diagnosticar el cáncer de vejiga, de forma no invasiva, con excelente sensibilidad y especificidad. Las parejas de cebadores adecuados para determinar el estado de metilación de cada uno de NID2, TWIST1 y RUNX3 se describen en el presente documento y pueden comprender las secuencias de nucleótidos que se muestran como la SEQ ID NO 40 y 41 (NID2), 22 y 23 (TWIST1) y 31 y 32 (RUNX3). Los cebadores pueden permitir la determinación directa del estado de metilación del panel de genes, por ejemplo, tras el tratamiento con bisulfito del ADN. De esta manera, pueden ser, por ejemplo, cebadores de secuenciación con MSP o bisulfito. Los kits pueden incluir adicionalmente una o más sondas para la detección en tiempo real o en el punto final. Las sondas adecuadas comprenden las secuencias de nucleótidos que se muestran como SEQ ID NO: 42 (NID2), 24 (TWIST1) y 33 (RUNX3). Las sondas pueden, de forma adicional o alternativa, permitir la determinación directa del estado de metilación del panel de genes, tras, por ejemplo, el tratamiento del ADN con bisulfito. Pueden utilizarse también sondas de bloqueo en determinadas realizaciones, de acuerdo con la técnica Heavymethyl (véase Nucleic Acids Res. 2004; 32(i)10).

30 El kit puede comprender además medios para procesar una muestra, en particular, una muestra que incluye células de vejiga o ADN genómico de células de vejiga tales como un tejido o muestra de orina adecuado, como se describe en el presente documento.

35 Se proporciona también un kit para detectar una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga en una muestra que comprende:

- 40 (a) medios para detectar un cambio epigenético en al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, en particular TWIST1
(b) medios para procesar una muestra.

45 La muestra a procesar comprende, consiste esencialmente, o consiste en una muestra de tejido y/o una muestra de tejido de vejiga y/o una muestra de orina.

50 El kit comprende preferentemente medios para detectar un cambio epigenético en un panel de genes que comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco de los genes de NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR, donde la detección de un cambio epigenético en al menos uno de los genes en el panel es indicadora de una predisposición, o la incidencia, de cáncer de vejiga.

55 Preferentemente, el kit detecta un cambio epigenético en un panel de genes que comprende NID2 y/o BMP7. En determinadas realizaciones, el panel de genes comprende, consiste esencialmente o consiste en NID2 y BMP7, NID2, TJP2 y BMP7, NID2, TNFRSF25 y BMP7 o NID2, BMP7, TWIST1, CCNA1 y RUNX3. Un panel de tres genes más preferido comprende, consiste esencialmente o consiste en NID2, TWIST1 y RUNX3. Preferentemente, el kit permite realizar la detección en una sola reacción. Preferentemente, el cambio epigenético es la metilación.

60 Este kit es preferentemente un kit para uso en MSP e incluso más preferentemente, una versión de detección en tiempo real de MSP. En una realización, el kit permite que se lleve a cabo una versión de detección de punto final de MSP.

65 En determinadas realizaciones, el kit de la invención comprende un reactivo que modifica la citosina no metilada (pero no la citosina metilada) o viceversa. En una realización preferida, el reactivo comprende bisulfito, preferentemente bisulfito de sodio, pero puede comprender, por ejemplo, hidrazina.

ES 2 605 237 T3

El kit puede incluir también cebadores adecuados para determinar si se metila el al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR. Estos cebadores pueden comprender cualquiera de los cebadores descritos en detalle con respecto a los diversos métodos de la invención que se pueden emplear a fin de determinar el estado de metilación del gen relevante (al menos uno), y las variantes del mismo.

El kit puede comprender además sondas para la detección en tiempo real de los productos de amplificación. Las sondas pueden comprender cualquier tipo de sonda adecuado para la detección en tiempo real; los ejemplos no limitantes incluyen el uso de sondas TAQMAN y/o sondas MOLECULAR BEACONS y/o cebadores AMPLIFLUOR y/o sondas FRET y/o cebadores SCORPION y/o bloqueantes de oligonucleótidos. Dichos kits para la detección en tiempo real pueden utilizarse para la detección de punto final.

Los cebadores y/o las sondas pueden permitir la determinación directa del estado de metilación del al menos un gen, por ejemplo, tras el tratamiento con bisulfito del (ADN en la) muestra, como se describe en el presente documento.

En las realizaciones específicas, los cebadores y/o sondas del kit se seleccionan entre los que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en cebadores y/o sondas que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en las siguientes secuencias de nucleótidos para los fines de amplificar el ADN metilado o no metilado (tras el tratamiento con bisulfito):

S= cebador de sentido directo
AS= cebador de sentido contrario
MB= baliza molecular

RASSF1A_S (SEC ID NO. 1): GCGTTGAAGTCGGGGTTC
RASSF1A_AS (SEC ID NO. 2): CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG
RASSF1A_MB (SEC ID NO. 3): 5'-FAM-CGTCTGCGTGGTTTCGTTTCGGTTCGCGTTTGTAGGCAGACG-3'-DABCYL

APC(2)_S (SEQ ID NO. 4): TAT TGC GGA GTG CGG GTC
APC(2)_AS (SEQ ID NO. 5): TCG ACG AAC TCC CGA CGA
APC(2)_MB (SEQ ID NO. 6): 5'-FAM-CGACATGCGTTGTGTAATTCGTTGGATGCGGATTAGGGCGGCATGTGCG3'-DABCYL

CCNA1_gron_S (SEC ID NO. 7): GTTATGGCGATGCGGTTTC
CCNA1_gron_AS (SEC ID NO. 8): CCAACCTAAAAAACGACCGA
CCNA1_gron_MB (SEC ID NO. 9): 5'-FAM-CGACATGCACGACGCCCGAACCTAACGCATGTGCG-3'-DABCYL

TNFRSF25_1_S (SEC ID NO. 10): GTCGTCGAGAAGGGTTTCGTTT
TNFRSF25_1_AS (SEC ID NO. 11): GCGTATTCTACTTAACCTATCCGC
TNFRSF25_1_MB (SEC ID NO. 12): 5'-FAM-CGACATGCACGACCCCGCCTCCCCCGCCGCATGTGCG-3'-DABCYL

TUBB4_2_S (SEC ID NO. 13): TAAATTAGATCGTCGTTTCGGAG
TUBB4_2_AS (SEC ID NO. 14): TACCTCAATTTCTCGATCCGC
TUBB4_2_MB (SEC ID NO. 15): 5'-FAM-CGACATGCTGGGAGGGTTCGCGTTATTGTAAGGAGCATGTGCG-3'-DABCYL

NTRK2_1_M_S (SEC ID NO. 16): GTTAGAGCGCGTTTTTAGCGT
NTRK2_1_M_AS (SEC ID NO. 17): CCGCAATACCTAACACTTCCG
NTRK2_1_MB (SEC ID NO. 18): 5'-FAM-CGACATGCCCGACACGCTCCGAAACACCAGCATGTGCG-3'-DABCYL

OSMR_1_S (SEC ID NO. 19): GTGTTAAGAGTGCGTAGTAAGACG
OSMR_1_AS (SEC ID NO. 20): GAAACGAACGTACAAAAACGA
OSMR_1_MB (SEC ID NO. 21): 5'-FAM-CGACATGCCGAAACTATAAATCAACTACGAAACAAACGCGCATGTGCG-3'-DABCYL

TWIST1_3_S (SEQ ID NO.22): GTTAGGGTTCGGGGCGTGTGTT
TWIST1_3_AS (SEC ID NO. 23): CCGTCGCCTTCTCCGACGAA
TWIST1_3_MB (SEQ ID NO.24): 5'-FAM-CGACATGCCGGCGGGGAAGGAAATCGTTTCGCATGTGCG-3'-DABCYL

LOXL1_29309_S (SEC ID NO. 25): TAGAGTACGTGTCGGTTCGGAT
LOXL1_29309_AS (SEC ID NO.26): ACAAAAACAAAAACGACGCCT
MB_LOXL1_29309b (SEC ID NO. 27): 5'-FAM-CGACATGCCGGGTGTTGTTGGTTCGGCGCGCATGTGCG-3'-DABCYL

DABCYL

TJP2_25301_S (SEC ID NO. 28): GAGATCGCGGGTTTTTATTTTC

TJP2_25301_AS (SEC ID NO. 29): CCAACTTCCTACGACGCAT

5 TJP2_25301_MB (SEC ID NO. 30): 5'-FAM-CGACATGCCTCCCAACCGCGGACACAAGCATGTTCG-3'-DABCYL

Runx3_3_M_S (SEC ID NO. 31): CGTAGGGTTGTATTTGAGCGA

Runx3_3_M_AS (SEC ID NO. 32): TAACTTTTAACGAAATTACCCCG

10 RUNX3_3_MB2 (SEC ID NO. 33): 5'-FAM-CGACATGCCGGGTTAGGGGGGCGTAAAATTTTATTTCGTTGCATGTTCG-3'-DABCYL

PDLIM4_4_M_S (SEC ID NO. 34): GGCCTTTAGGTTAATTTTTTCGT

PDLIM4_4_M_AS (SEC ID NO. 35): CGATCCCATATCTAAAACCGA

15 PDLIM4_4_MB (SEC ID NO. 36): 5'-FAM-CGACATGCCTCGCGATCCGCCCGAAACGCATGTTCG-3'-DABCYL

BMP7_17911_S (SEC ID NO. 37): AGCGTAGAGATAGGTTGGTAACG

BMP7_17911_AS (SEC ID NO. 38): AAAACGATAACCCTTAAACCGA

20 MB_BMP7_17911 (SEC ID NO. 39): 5'-FAM-CGACATGCGCGGAGGGGTTAGCGTGGTTGCATGTTCG-3'-DABCYL

NID2_9091_S (SEC ID NO. 40): GCGGTTTTTAAGGAGTTTTATTTTC

NID2_9091_AS (SEC ID NO. 91): CTACGAAATTCCTTTACGCT

25 MB_NID2_9091 (SEC ID NO. 42): 5'-FAM-CGACATGGGTTCTAAGGTTTGGGGTAGCGGCCATGTTCG-3'-DABCYL

ARFGAP3_25342_S (SEC ID NO. 43): GCGTTAAGGTACGGGTTTTTC

ARFGAP3_25342_A (SEC ID NO. 44): GCCATTTGCGCTAACGAAC

30 ARFGAP3_25342_MB (SEC ID NO. 45): 5'-FAM-CGACATGCACGCGCCCTCCTTCGACACGCATGTTCG-3'-DABCYL

β -Actina_S (SEQ ID NO. 46): TAGGGAGTATATAGGTTGGGGAAGTT

β -Actina_A (SEQ ID NO. 47): AACACACAATAACAAACACAAATTCAC

35 β -Actina_MB (SEQ ID NO. 48): 5'-FAM-CGACTGCGTGTGGGGTGGTGATGGAGGAGGTTTAGGCAGTTCG-3'-DABCYL

40 Las marcas indicadas son opcionales. FAM y DABCYL son ejemplos representativos de marcadores fluorescentes que pueden participar en FRET para proporcionar un indicador de la amplificación fiable, como se describe en el presente documento. Se pueden emplear otros fluoróforos e inactivadores, en particular como parejas de FRET, según desee y aprecie una persona experta.

45 Como se describe, se pueden utilizar controles adecuados para actuar como control de calidad para los métodos e incluirse en el kit. Un ejemplo de un gen de referencia interna adecuado, que generalmente no está metilado, pero que se puede tratar con el fin de metilarse es β -actina. El kit de la invención puede comprender además cebadores para la amplificación de un ácido nucleico del control que puede comprender al menos un gen seleccionado entre NID2, TJP2, TWIST1, TNFRSF25, BMP7, RUNX3, CCNA1, APC, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, PDLIM4, RASSF1A y OSMR en forma no metilada y/o metilada.

50 Los kits pueden incluir adicionalmente tampones adecuados y otros reactivos para llevar a cabo los métodos reivindicados de la invención. En una realización, el kit además comprende, consiste esencialmente en, o consiste en tampones de amplificación de ácido nucleico.

55 El kit puede comprender también adicionalmente, consiste esencialmente en o consiste en enzimas que catalizan la amplificación del ácido nucleico. De esta manera, el kit puede adicionalmente comprender, consistir esencialmente en o consistir en una polimerasa adecuada para la amplificación del ácido nucleico. Los ejemplos incluyen aquellos de las polimerasas de la familia de tipo A y de la familia de tipo B, tales como Taq, Pfu, Vent etc.

60 Como se indica anteriormente en el presente documento, el kit puede comprender medios para procesar una muestra de orina. Dichos medios para procesar una muestra de orina pueden comprender un tampón y/o reactivos estabilizantes para la extracción/aislamiento/concentración/purificación del ADN. El kit puede incorporar también un recipiente precintable para la recogida de una muestra de orina.

Los diversos componentes del kit pueden envasarse por separado en compartimentos separados o pueden, por ejemplo, almacenarse juntos cuando sea adecuado.

65 El kit puede incorporar también instrucciones adecuadas para el uso, que pueden imprimirse en una hoja diferente o incorporarse por ejemplo en el kit de envase.

Los kits pueden incorporar también medios para detectar mutaciones en el gen FGFR3. Como se describe anteriormente, las mutaciones en este gen se vinculan a la incidencia de cáncer de vejiga y de esta manera complementan, de manera sinérgica, los métodos de la invención. Los medios para detectar mutaciones adecuadas pueden comprender cebadores adecuados, tales como aquellos seleccionados a partir de cebadores que comprenden, consisten esencialmente en o consisten de las secuencias de nucleótidos que se muestran como las SEQ ID NO. 49 a 56. Estos kits pueden incorporar también otros componentes tales como didesoxinucleótidos y/o cebadores para amplificar regiones de exones 7, 10 y 15 del gen FGFR3, como se describe en la página 7744 de Van Oers et al.

La presente invención se describirá a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Descripción de las figuras

Figura 1. Árbol de decisiones para la determinación de la relación del conjunto de pruebas de orina 1 (Ejemplo 1).

Figura 2. Comportamiento del ensayo de gen individual (sensibilidad [%] donde el corte analítico se ajustó para dar un 100% de especificidad) utilizando el conjunto de ensayo de tejido que contenía 9 controles (enfermedad no cancerosa) y 38 carcinomas de vejiga para MSP en tiempo real. Para los siguientes genes solo 22 carcinomas de vejiga y 7 controles estuvieron disponibles para el ensayo: NID2, TJP2, TWIST1, BMP7, RUNX3, ARFGAP3 y PDLIM4.

Figura 3. Comportamiento del ensayo de gen individual (% de sensibilidad) usando el conjunto de pruebas consistente en muestras de orina de 143 controles (enfermedad no cancerosa) y 62 pacientes con carcinomas de vejiga para el MSP en tiempo real.

Figura 4. Árbol de decisiones para la clasificación de la muestra (metilada, no metilada, no válida) para el conjunto de pruebas de orina 2 (Ejemplo 2) y 3 (Ejemplo 4).

Figura 5. Se calcularon las características de funcionamiento del receptor (ROC) para TWIST1, RUNX3, NID2 y los tres paneles de genes representando gráficamente la tasa de positivo verdadero (sensibilidad) frente a la tasa de falso positivo (especificidad-100)

- A. Curva ROC para el gen TWIST1 individual (sensibilidad 76,8%, especificidad 96,8%)
- B. Curva ROC para el gen RUNX3 individual (sensibilidad 57,1%, especificidad 98,4%)
- C. Curva ROC para el gen NID2 individual (sensibilidad 75,0%, especificidad 88,9%)
- D. Curva ROC para la combinación de los genes TWIST1, RUNX3 y NID2 (sensibilidad 89,3%, especificidad 92,1%). El área bajo la curva (AUC) es 0,919. El 95% del intervalo CI era 0,870 a 0,995 a una significancia de $P = 0,0001$ para el área=5.

Sección experimental

Ejemplo 1: Un ensayo MSP en tiempo real para la detección temprana de cáncer de vejiga - conjunto de pruebas de orina 1

Materiales y métodos

Identificación del marcador: Se identificaron genes candidatos utilizando los perfiles de reexpresión de las líneas celulares de cáncer de vejiga. Las secuencias promotoras se vincularon con la expresión génica para identificar los genes silenciados epigenéticamente válidos. Se combinó una estrategia de desenmascaramiento farmacológica establecida (5-aza-2'-desoxicitidina [DAC] y tricostatina A [TSA]) para el análisis de reexpresión de los genes dirigidos epigenéticamente con herramientas bioinformáticas avanzadas patentadas para identificar genes propensos a la metilación del promotor.

Selección de marcadores en el tejido de vejiga: Se seleccionaron los marcadores candidatos identificados mediante reexpresión utilizando 74 ensayos de PCR específica de metilación en tiempo real (MSP en tiempo real). Estos ensayos se utilizaron para evaluar el estado de metilación de 59 genes promotores en muestras de tejido incluidas en parafina fijados con formalina (FFPE) recogidas de varias clínicas urológicas. Las muestras incluían 91 carcinomas de diversos estadios y 39 muestras de pacientes sin evidencias de cáncer. Estas muestras se dividieron en conjuntos de ensayos de prueba y conjuntos de ensayos independientes, y se utilizaron para seleccionar los ensayos de metilación de genes más capaces de discriminar entre muestras cancerosas y no cancerosas.

Recogida de muestras de orina: Se utilizaron en el presente estudio muestras de orina prospectivas recogidas aleatoriamente procedentes de múltiples centros en Bélgica, Reino Unido, y Países Bajos. En este ensayo, los pacientes sintomáticos, que acudieron a una clínica urológica y finalmente diagnosticados con cáncer de vejiga u otros trastornos urológicos no malignos, proporcionaron una muestra de orina para uso en análisis MSP en tiempo

real. Se espera que el alistamiento total alcance 400 individuos en 2 años. De este ensayo en curso, 218 muestras de orina estuvieron disponibles para el presente estudio. Estas muestras incluían 150 muestras de pacientes sin evidencias de cáncer y 68 muestras de pacientes que cubrían todos los estadios del cáncer de vejiga, representando el 82% de la enfermedad en la etapa temprana (véase la tabla 3 para los detalles). Se usó una alícuota de estas muestras de orina para el análisis de la citología.

Aislamiento del ADN: Se aisló ADN de tejido y orina utilizando un método de aislamiento del ADN normalizado y equipo normalizado. En resumen, para la preparación del ADN de orina, las muestras de orina recogidas recientemente se centrifugaron a baja velocidad a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 minutos. El sobrenadante se separó de la fracción de sedimento. Ambas fracciones se almacenaron a -20°C hasta procesamiento adicional. Antes del aislamiento del ADN de la fracción aglomerada, la muestra congelada se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 g durante 5 minutos para separar el sobrenadante restante (unos pocos μ l) a partir del aglomerado del desecho celular.

Se extrajo el ADN genómico procedente de la fracción de sedimento utilizando el kit de purificación de ADN PUREGENE® de Gentra. 700 μ l de solución de lisis celular (proporcionada con kit) se añadieron al aglomerado y se procesaron adicionalmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se rehidrató el ADN añadiendo 45 μ l de tampón LoTE y se incubó durante 1 hora agitando a 65°C seguido por agitación durante la noche a 20°C.

Modificación del ADN: 1,5 μ g de ADN (o la totalidad si hay menos de 1,5 μ g) se sometieron a modificación con bisulfito en un formato de 96 pocillos en un robot de pipeteado (Tecan) utilizando el kit de metilación del ADN EZ-96 (Zymo Research), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Básicamente, se mezclaron alícuotas de 45 μ l con 5 μ l de tampón de dilución M y se incubaron a 37°C durante 15 minutos agitando a 1100 rpm. A continuación se añadieron 100 μ l del reactivo de conversión CT diluido y se incubaron las muestras a 70°C durante 3 horas, agitando a 1100 rpm en la oscuridad. Tras la conversión, las muestras se desalaron mediante incubación en hielo durante 10 minutos y adición de 400 μ l de tampón de unión M. Se cargaron las muestras en una columna Zymo-Spin I en un tubo de recogida y se lavaron tras la centrifugación con 200 μ l de tampón de lavado M. Se colocaron 200 μ l de tampón de desulfonación M sobre la columna y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras la centrifugación de las columnas, se lavaron dos veces con 200 μ l de tampón de lavado M. Finalmente, se lavó el ADN de la columna en 50 μ l de Tris-HCl 1 mM pH 8,0 y se almacenó a -80°C, hasta procesamiento adicional.

Amplificación del ADN: Se aplicó MSP en tiempo real sobre un sistema PCR en tiempo real rápido 7900HT (Applied Biosystems). Se añadieron 2,4 μ l del ADN modificado a una mezcla de PCR (volumen total de 12 μ l) que contenía tampón ((NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, Tris 67 mM (pH 8,8), MgCl₂ 6,7 mM, β -mercaptoetanol 10 mM), dNTP (5 mM), cebador directo (6 ng), cebador inverso (18 ng), baliza molecular (0,16 μ M), y ADN Jumpstart de polimerasa Taq (0,4 unidades; Sigma-Aldrich). En la tabla 1 se resumen las secuencias de los cebadores y las secuencias de las balizas moleculares utilizadas para cada uno de los genes. El programa de ciclos utilizado fue como sigue: 5 minutos a 95°C seguido por 45 ciclos de 30 segundos, 95°C, 30 segundos 57°C (51°C para APC) (=recogida de datos en la meseta), y 30 segundos a 72°C. Se incluyó una curva patrón (2x10⁶ - 20 copias) para determinar el número de copias de las muestras desconocidas mediante la interpolación de los valores Ct en la curva patrón. Además de los genes de la prueba de la vejiga, se midió también la referencia independiente del gen de la β -actina (ACTB):

Cebador directo de la β -Actina 5' - TAGGGAGTATATAGGTTGGGGAAGTT - 3'

Cebador inverso de la β -Actina 5' - AACACACAATAACAAACACAAATTCAC - 3' baliza 5'-FAM-CGACTGCGTGTGGGGTGGTGATGGAGGAGTTTAGGCAGTCG-3'-DABCYL

Se calcularon las relaciones entre los genes de las pruebas de las vejigas y ACTB para generar los resultados de la prueba. Se clasificaron las muestras como metiladas, no metiladas, o no válidas basándose en el árbol de decisiones que se muestra en la Figura 1.

Tabla 1: Secuencias de cebadores y balizas (S: sentido directo; AS = sentido contrario; MB: baliza molecular)

Referencia del ensayo	Número de registro	Longitud del amplicón (PB)	ID cebador/baliza	Secuencias (5'-3') cebador/baliza (balizas de modificación: 5' FAM, 3' BABCYL)
RASSF1A	AC002481	76	RASSF1A_S RASSF1A_AS RASSF1A_MB	GGTTGAAGTCGGGGTTC CCCGTACTTCGCTAACCTTTAAACG CGTCTGCGTGGTTTCGTTCCGGTTCGGGTTTGTAGGCAGACG
APC	NM_000038	74	APC (2)_S APC (2)_AS APC (2)_MB	TAT TGC GGA GTG GGG GTC TCG ACG AAC TCC CGA CGA CGACATGCGTTGTGTAATTCGTTGGATGCGGATTAGGGCGGCATGT CG
CCNA1	NM_003914	152	CCNA1_gron_S CCNA1_gron_AS CCNA1_gron_MB	GTTATGGCGATGCGGGTTTC CCAACTAAAAAACGACCCGA
TNFRSF25	NM_148972	137	TNFRSF25_1_S TNFRSF25_1_AS TNFRSF25_1_MB	CGACATGCACGACGCCCCCGAACCTAACGCATGTCCG GTCGTCGAGAAAGGGTTCGTTT GCGTATTCTACTTAACCTATCCGC
TUBB4	NM_006087	123	TUBB4_2_S TUBB4_2_AS TUBB4_2_MB	CGACATGCACGACGCCCTCCCGCCCGCCGCATGTCCG TAAATTAGATCGTCGTTCCGGAG TACCTCAATTTCTCGATCCCG
NTRK2_1	NM_001007097	125	NTRK2_1_M_S NTRK2_1_M_AS NTRK2_1_MB	CGACATGCTGGGAGGTTCCGCGGTTATTGTAAGGAGCATGTCCG GTTAGAGCGCGTTTTAGCGT
OSMR	NM_003999	148	OSMR_1_S OSMR_1_AS OSMR_1_MB	CCGCAATACCCTAACACTTCCG CGACATGCCCGACACGCTCCGAAACACCAGCATGTCCG GTGTTAAGAGTGCAGTAGAAGACG GAAACGAAAGTACAAAAACGA
TWIST1	NM_000474	77	TWIST1_3_S	CGACATGCCGAAACTATAAATCAACTACGAAACAAACCGGCATGTCCG GTTAGGGTTCGGGGCGGTTGTT
LOXL1	ENST00000261921	132	TMIST1_3_AS TWIST1_3_MB LOXL1_29309_S LOXL1_29309_AS	CCGTCGCCCTTCCTCCGACGAA CGCATGCCCGGGGGAAGAAATCGTTTCGCATGTCCG TAGAGTACGTGTCGGTCCGGAT ACAAAAACAACAAACGACGCCT
TJP2	NM_0004817	167	MB_LOXL1_29309_b TJP2_25301_S TJP2_25301_AS TJP2_25301_MB	CGACATGCCCGGGTGTGTTGGTCGGCGGCATGTCCG GAGATCGCGGGTTTTATTTC CCAACTTCCTACGACGCAT CGACATGCCCTCCCAACCGCGACACAAAGCATGTCCG

Referencia del ensayo	Número de registro	Longitud del amplicón (PB)	ID cebador/baliza	Secuencias (5'-3') cebador/baliza (ballizas de modificación: 5' FAM, 3' BABCYL)
RUNX3	ENST00000308 873	127	Runx3_3_M_S Runx3_3_M_AS RUNX3_3_MB2	CGTAGGGTTGATTTGAGCGGA TAACTTTTAACGAAATTTACCCCG CGACATGCCGGGTTAGGGGGCGGTAAAAATTTTATTCGTTGCATGTC G
PDLIM4	ENST00000379 038	95	PDLIM4_4_M_S PDLIM4_4_M_AS	GCGGTTTAGGTTAATTTTTTCGT CGATCCCATATCTAAAACCCGA
BMP7	NM_001719	111	PDLIM4_4_MS BMP7_17911_S BMP7_17911_AS	CGACATGCCCTCGCGATCCGCCCGAAACGCATGTCG AGCGTAGAGATAGGTTGGTAACG AAAAAGATAACCCCTAAACCCGA
NID2	NM_007361	99	MB_BMP7_17911 NID2_9091_S NID2_9091_AS	CGACATGCCGGAGGGGTTAGCGTGGTTGCATGTCG GCGGTTTTAAGGAGTTTTATTTTC CTACGAAATCCCTTTACGCT
ARFGAP3	NM_014570	106	MB_NID2_9091 ARFGAP3_25342_S ARFGAP3_25342_A ARFGAP3_25342_MB	CGACATGGGTTTCGTAAGGTTTGGGGTAGCGGCCCATGTCG GCGTTAAGGTACGGGTTTTTC GCCATTCGCCCTAACGAAC CGACATGCACGCGCCCTCCTTCGACACGCATGTCG

Resultados:

5 Índice de validez del ensayo en tejido y orina: Se procesaron ciento treinta muestras de FFPE y 218 muestras de orina utilizando MSP en tiempo real (Tabla 2). Los índices de validez se basaron en los criterios que se muestran en la Figura 1. Los ensayos de MSP en tiempo real produjeron resultados válidos en el 96% de las muestras de FFPE y en el 94% de las muestras de orina.

Tabla 2: Resumen de las muestras evaluadas mediante MSP en tiempo real

Conjuntos de muestras	Tipos de muestras	Número de muestras	Ensayos válidos [%]
Conjunto de pruebas de tejidos	Cáncer	53	53/53 [100]
	Controles	30	25/30 [83]
	Total	83	78/83 [94]
Conjunto de ensayo de tejidos	Cáncer	38	38/38 [100]
	Controles	9	9/9 [100]
	Total	47	47/47 [100]
Conjuntos combinados de tejidos	Cáncer	91	91/91 [100]
	Controles	39	34/39 [87]
	Total	130	125/130 [96]
Conjunto de prueba de urinación	Cáncer	68	62/68 [91]
	Controles	150	143/150 [95]
	Total	218	205/218 [94]

10 Selección de marcadores en el tejido de vejiga: Basándose en la reexpresión, se validaron las 74 secuencias génicas metiladas más diferencialmente de tumores recogidos retrospectivamente procedentes de 53 pacientes con cáncer de vejiga y 30 muestras de tejido histopatológicamente normal utilizando ensayos MSP en tiempo real. Varios marcadores detectaron de forma fiable cáncer de vejiga en dichas muestras de tejidos (no se muestran los datos).
15 Se confirmaron los resultados en un conjunto de prueba independiente que contenía 9 controles de tejidos (enfermedad no cancerosa) y 38 carcinomas. En la Figura 2 se muestra el comportamiento individual de los 15 marcadores de tejido de mejor comportamiento cuando el corte analítico se ajustó para dar una especificidad del 100%. Varias combinaciones de los marcadores ensayados detectaron de forma fiable el cáncer de vejiga con elevada especificidad y sensibilidad (Tabla 3).

20 Tabla 3: El comportamiento de varios paneles de tejidos detectó de forma fiable el cáncer de vejiga utilizando MSP en tiempo real. Estuvieron disponibles 22 carcinomas y 7 controles para el conjunto de ensayo de tejidos para todos los genes.

	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total)	%Especificidad (n.º de positivos / n.º total)
Panel de tejido 1: NID2 TJP2 BMP7	100 (22/22)	100 (0/7)
Panel de tejido 2: NID2 TNFRSF25 BMP7	100 (22/22)	100 (0/7)
Panel de tejido 3: NID2 BMP7	91 (20/22)	100 (0/7)

25 Ensayo de marcadores en muestras de orina: Se evaluaron once de los marcadores de mejor comportamiento en tejidos sobre 218 muestras de orina disponibles procedentes de recogidas multicentro normalizadas. Estas muestras de orina incluían 150 muestras de pacientes sin cáncer y 68 muestras de pacientes que cubrían todos los estadios del cáncer de vejiga. El ensayo proporcionó resultados válidos de 143 controles y 62 casos de cáncer de vejiga. En la Figura 3 se muestra el comportamiento individual (sensibilidad y especificidad) de los ensayos de 11 genes y en la
30 Tabla 4 se muestra el mejor panel. Un urólogo revisó los formularios de informes de caso de todos los pacientes. Los 62 casos de cáncer de vejiga se clasificaron en varios grupos de cáncer (4 papilomas, 17 Ta, 2 Tis, 14 T1, 14 T2, 2 T3 y 9 desconocidos) como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Comportamiento de un panel de marcadores de orina en diferentes grupos de muestras

Grupos de muestras	Panel de orina: NID2, BMP7, TWIST1, CCNA1 y RUNX3
	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]
Papiloma	75 (3/4)
Ta	94 (16/17)
Tis	100 (2/2)
T1	71 (10/14)
T2	100 (14/14)
T3	50 (1/2)
Desconocido	78 (7/9)
Estadios tempranos de cánceres (Papiloma, Ta, Tcis, T1 y T2)	88% de sensibilidad (45/51) [79 - 97]
Todos los estadios de cáncer	85 % de sensibilidad (53/62) [76 - 94]
Controles (pacientes no cancerosos sintomáticos)	93 % de especificidad (10/143) [89 - 97]

Los 143 controles (emparejados por edad) se clasificaron en varios grupos control (57 de prostatitis, 5 de hipertrofia prostática benigna [BPH], 12 de neoplasia intraepitelial prostática de grado elevado [HGPI], 7 de constricción de la uretra, 7 de cálculos [vejiga o riñón] 2 de BOO [obstrucción de salida de la vejiga], 7 de LUTS [síntomas del tracto urinario inferior], 2 de cistitis, 44 de otros). Se compararon los resultados de la metilación y la citología cuando se llevó a cabo el procesamiento sobre las mismas muestras de orina (Tabla 5). En la Tabla 6 se presenta el comportamiento de los ensayos de metilación entre los diferentes sitios de recogida de muestras.

5

Tabla 5: Comparación de los resultados de citología y metilación

		Casos de cáncer	Casos de control	%Sensibilidad (nº de positivos/ nº total)	%Especificidad (nº de positivos / nº total)
Resultados de la citología	Negativo	31	43	38% (19/50)	96% (2/45)
	Positivo/ Atipia	19	2		
Resultados de la metilación	Negativo	9	133	85% (53/62)	93% (10/143)
	Positivo	53	10		

Tabla 6: Comportamiento de los ensayos de metilación entre los diferentes centros de recogida de muestras.

	%Sensibilidad (nº de positivos/ nº total)	%Especificidad (nº de positivos / nº total)
Centro 1	78 % (18/23)	92 % (5/64)
Centro 2	93 % (14/15)	95 % (2/40)
Centro 3	88 % (21/24)	92% (3/39)

Ejemplo 2: Un ensayo MSP en tiempo real para la detección temprana de cáncer de vejiga - conjunto de pruebas de orina 2.

15

Se estudió adicionalmente el panel de 5 marcadores del Ejemplo 1 con un conjunto independiente de muestras, denominado 'conjunto de prueba de orina 2'. Debido a la reducción del número de genes ensayados (5 en vez de 11), estaba disponible una alícuota mayor de muestra de cada muestra ensayada para cada prueba de ensayo, dando como resultado un volumen de elución BT adaptado y un árbol de decisiones diferente (basándose en las copias y no en las relaciones) para analizar los resultados (Figura 4).

20

Materiales y métodos

Identificación del marcador: Se identificaron genes candidatos utilizando los perfiles de reexpresión de las líneas celulares de cáncer de vejiga, como se ha descrito en el Ejemplo 1.

5 Selección de marcadores: Se validaron los genes metilados diferencialmente en tejidos utilizando la PCR específica de metilación en tiempo real (MSP en tiempo real). Se seleccionaron los marcadores de tejido de mejor comportamiento para el ensayo del ADN procedente de muestras de orina, como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 Recogida de muestras de orina: Se utilizaron muestras de orina prospectivas recogidas aleatoriamente procedentes de múltiples centros, como se ha descrito en el Ejemplo 1. Todos los participantes en el estudio recibieron la correspondiente autorización del comité ético relevante. Los pacientes sintomáticos, (que habían proporcionado su consentimiento informado), que acudieron a una clínica urológica y finalmente diagnosticados con cáncer de vejiga u otros trastornos urológicos no malignos, proporcionaron una muestra de orina para uso en análisis MSP en tiempo real y análisis citológico. De este ensayo en curso, se ensayaron 415 muestras de orina. Estas muestras incluían 15 285 muestras de pacientes sin evidencias de cáncer y 130 muestras de pacientes que cubrían todos los estadios del cáncer de vejiga, representando el 88% las enfermedades en la etapa temprana.

20 Preparación de muestras de orina: La muestra de orina recogida se distribuyó en alícuotas de 50 ml para un procesamiento adicional. Cada alícuota de 50 ml se centrifugó e 4 h (de recogida) a 3000 g durante 10 min. Los sedimentos de orina se almacenaron a -20°C hasta 6 meses, como se describe en el Ejemplo 1.

25 Preparación y procesamiento del ADN: Se aisló el ADN procedente de sedimentos de orina utilizando un método normalizado (es decir, Qiagen nº 158908 y Qiagen nº 158912) y se cuantificó utilizando el kit de cuantificación del ADNds Picogreen® (Molecular Probes, nº P7589) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron hasta 1,5 µg de ADN para la modificación con bisulfito utilizando un kit comercialmente disponible (es decir, nº D5002). Esta reacción desamina selectivamente los restos citosina no metilados que dan como resultado la conversión a uracilo mientras que no se modifican los restos de 5-metil citosina. El ADN modificado se eluyó en 20 µl de Tris HCl (1 mM, pH 8,0) y a continuación se almacenó a -80°C hasta 6 meses.

30 MSP en tiempo real: Se llevaron a cabo cuantificaciones de los analitos (TWIST, RUNX3, NID2, y ACTB) mediante ensayos MSP en tiempo real. Estos consistieron en procesos de amplificación/cuantificación paralelos utilizando cebadores y sondas específicos para cada analito y formatos de ensayo Molecular Beacon® en un instrumento ABI Prism® 7900HT (Applied Biosystems). Los analitos definidos en el MSP en tiempo real eran las secuencias de los promotores TWIST, RUNX3, y NID2 que detectan las versiones completamente metiladas. Se utilizó ACTB como un gen de referencia, utilizando cebadores que estaban fuera de las islas CpG. El volumen de reacción de la PCR era de 12,5 µl incluyendo 2,4 µl de ADN del molde modificado. Las muestras se clasificaron como metiladas, no metiladas, o no válidas basándose en el árbol de decisiones que se muestra en la Figura 4.

40 Los tamaños del amplicón fueron los siguientes:

TWIST1: 77 pb
 RUNX3: 127 pb
 NID2: 99 pb
 45 ACTB: 103 pb

Los detalles de las secuencias fueron los siguientes:

50 Cebador directo TWIST1: 5'- GTTAGGGTTCGGGGGCGTTGTT - 3' (SEQ ID NO:22)
 Cebador inverso TWIST1: 5'- CCGTCGCCTTCCTCCGACGAA - 3' (SEQ ID NO:23)
 Cebador directo RUNX3: 5'- CGTAGGGTTGTATTTGAGCGA - 3' (SEQ ID NO:31)
 Cebador inverso RUNX3: 5'- TAACTTTTAACGAAATTACCCCG - 3' (SEQ ID NO:32)
 Cebador directo NID2: 5'- GCGGTTTTTAAGGAGTTTTATTTTC - 3' (SEQ ID NO:40)
 Cebador inverso NID2: 5'- CTACGAAATTCCTTTACGCT - 3' (SEQ ID NO:41)
 55 Cebador directo ACTB: 5'- TAGGGAGTATATAGGTTGGGGAAGTT - 3' (SEQ ID NO:46)
 Cebador inverso ACTB: 5'- AACACACAATAACAAACACAAATTCAC - 3' (SEQ ID NO:47)
 Baliza molecular TWIST1:

60 5' - Fam-CGACATGCCGGCGGGGAAGGAAATCGTTTCGCATGTCG-Dabcyl - 3' (SEQ ID NO:24)

Baliza molecular RUNX3:

65 5' - Fam-CGACATGCCGGGTTAGGGGGCGTAAAATTTTATTCGTTGCATGTCG-Dabcyl - 3' (SEQ ID NO:33)

Baliza molecular NID2:

5'- Fam-CGACATGGGTTTCGTAAGGTTTGGGGTAGCGGCCATGTTCG-Dabcyl - 3' (SEQ ID NO:42)

Baliza molecular ACTB:

5

5' - Fam-CGACTGCGTGTGGGGTGGTGATGGAGGAGGTTTAGGCAGTCG-Dabcyl-3' (SEQ ID NO:48)

Las secuencias se localizan como sigue (basadas todas en la versión 36.3 del genoma humano NCBI):

- 10 TWIST1: cromosoma 7, entre las posiciones 19124120 y 19124043 (RefSeq: NM_000474)
 RUNX3: cromosoma 1, entre las posiciones 25128341 y 25128468 (RefSeq: NM_004350)
 NID2: cromosoma 14, entre las posiciones 51605816 y 51605915 (RefSeq: NM_007361)
 ACTB: cromosoma 7, entre las posiciones 5538428 y 5538326 (RefSeq: NM_001101)

- 15 Perfil térmico: Se usó lo siguiente para todos los genes: 95°C durante 5 min, 95°C durante 30 s, 57°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s durante 45 ciclos. El volumen total de la PCR era 12,5 µl (incluyendo 2,4 µl de ADN del molde) en una placa de la PCR de 384 pocillos.

- 20 Quantificación: Se generaron los resultados usando el software SDS 2.2 (Applied Biosystems), exportados como valores Ct (número de ciclos a los cuales las curvas de amplificación cruzan el valor umbral, que el software muestra automáticamente), y a continuación se utilizaron para calcular el número de copias basado en la regresión lineal de los valores representados gráficamente sobre una curva normalizada de $20 - 2 \times 10^6$ equivalentes de copias de genes, utilizando ADN plásmido que contiene la secuencia de interés modificada con bisulfito. Se incluyeron las líneas celulares en cada ciclo como controles positivos y negativos, y se introdujo el procedimiento en la etapa de extracción del ADN. Se consideró válido un ciclo cuando se cumplieron los siguientes cinco criterios. a) las pendientes de ambas curvas normalizadas por encima de -4 (eficacia de la PCR > 77,8%); b) r^2 de al menos 4 puntos de datos relevantes por encima de 0,990; c) no se amplificó el NTC incluido de forma rutinaria; d) fue detectable un 10% de una reacción de conversión de 1 µg de la línea de células positivas del ensayo control; y e) no se detectó un 10% de una reacción de conversión de 1 µg de la línea de células negativas en la curva normalizada.

30

Resultados:

- 35 Índice de validez del ensayo en tejido y orina: Se procesaron ciento treinta muestras de tejido incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) y 415 muestras de orina utilizando MSP en tiempo real (Tabla 7). Los ensayos de MSP en tiempo real produjeron resultados válidos en el 96% de las muestras de FFPE y en el 93% de las muestras de orina.

Tabla 7: Resumen de las muestras evaluadas mediante MSP en tiempo real

Conjuntos de muestras	Tipos de muestras	Número de muestras	Ensayos válidos [%]
Conjunto de pruebas de tejidos	Cáncer	53	53/53 [100]
	Controles	30	25/30 [83]
	Total	83	78/83 [94]
Conjunto de ensayo de tejidos	Cáncer	38	38/38 [100]
	Controles	9	9/9 [100]
	Total	47	47/47 [100]
Conjuntos combinados de tejidos	Cáncer	91	91/91 [100]
	Controles	39	34/39 [87]
	Total	130	125/130 [96]
Conjunto de pruebas de orina 1	Cáncer	68	62/68 [91]
	Controles	150	143/150 [95]
	Total	218	205/218 [94]
Conjunto de pruebas de orina 2	Cáncer	62	56/62 [90]
	Controles	135	126/135 [93]
	Total	197	182/197 [92]
Conjuntos combinados de orina	Cáncer	130	118/130 [91]
	Controles	285	269/285 [94]
	Total	415	387/415 [93]

- 40 Selección de marcadores en el tejido de vejiga: Se describen los resultados en el Ejemplo 1 con referencia a la figura 2 y a la tabla 3.

- 45 Ensayo de marcadores en muestras de orina: Se evaluaron once de los marcadores de mejor comportamiento en tejidos sobre 218 muestras de orina disponibles procedentes de recogidas multicentro normalizadas (conjunto de pruebas de orina 1). Se describen estos resultados en el Ejemplo 1 y se repiten en la tabla 8 siguiente.

Un urólogo revisó los formularios de informes de casos de 218 pacientes procedentes del primer conjunto de pruebas (Ejemplo 1). Los 62 casos de cáncer de vejiga se clasificaron en varios grupos de cáncer (4 papilomas, 17 Ta, 2 Tis, 14 T1, 14 T2, 2 T3 y 9 desconocidos). Los 143 controles (emparejados por edad) se clasificaron en varios grupos control (60 de prostatitis, 8 de BPH [hipertrofia prostática benigna], 12 de HGPIN [neoplasia intraepitelial prostática de grado elevado] 7 de obstrucción de la uretra, 8 de cálculos [vejiga o riñón] 2 de BOO [obstrucción de la salida de la vejiga], 7 de LUTS [síntomas en el tracto urinario inferior], 3 de cistitis, 6 de incontinencia, 4 de prolapso, 2 de hidronefrosis, 2 de orquitis, 22 de otros).

Se estudió adicionalmente el panel de marcadores con mejor comportamiento en el primer conjunto de pruebas de orina (5 genes, Ejemplo 1) con un conjunto de muestras independiente recogido prospectivamente del ensayo en curso (conjunto 2 de pruebas de orina). La reducción adicional en el número de genes probados, que dieron como resultado menos ensayos por muestra, permitió una alícuota mayor de la muestra en cada ensayo. Las muestras de orina en el segundo conjunto de pruebas incluían 135 muestras de pacientes sin cáncer y 62 muestras de pacientes que cubrían todos los estadios del cáncer de vejiga. El ensayo proporcionó resultados válidos de 126 controles y 56 casos de cáncer de vejiga (Tabla 7). Un urólogo revisó los formularios de informes de casos de aquellos 182 pacientes. Los 56 casos de cáncer de vejiga se clasificaron en varios grupos de cáncer (6 papilomas, 19 Ta, 4 Tis, 12 T1, 12 T2, y 3 desconocidos). Los 126 controles (emparejados por edad) se clasificaron en varios grupos control (19 de prostatitis, 30 de BPH [hiperplasia prostática benigna], 18 de incontinencia, 14 de litiasis, 6 de constricción de la uretra, 2 de BOO [obstrucción de salida de la vejiga] 3 de LUTS [síntomas del tracto urinario inferior], 9 de cistitis, 5 de infección urinaria, 4 de inestabilidad vesical, 5 prolapso, 11 otros). Un panel de 3 marcadores de la metilación basados en orina demostró un 91% de sensibilidad y un 93% de especificidad para identificar pacientes con cáncer de vejiga en estadio temprano (Tabla 8). Se desarrolló también un modelo de regresión logística utilizando los tres marcadores. Se calculó la curva característica del funcionamiento del receptor (ROC) para este modelo de regresión logística para el panel de genes de vejiga representando gráficamente la tasa de positivo verdadero (sensibilidad) frente a la tasa de falso positivo (especificidad-100). El área bajo la curva (AUC) es 0,919. El 95% del intervalo CI fue de 0,870 a 0,995, con una significancia de $P = 0,0001$ para el área=5 (Figura 5). La sensibilidad y especificidad óptimas obtenidas con este modelo fueron similares a las obtenidas con los modelos de interpretación lineal simples (si algún marcador proporciona un número de copias por encima del corte, la muestra se puntúa como positiva) utilizados para las tablas 8 a 10.

Tabla 8: Comportamiento de paneles marcadores de orina con diferentes grupos de muestras. Los cortes de copias usados para el conjunto 2 de pruebas fueron: TWIST1 = 17, RUNX3 = 5 y NID2 = 30.

Grupos de muestras	Conjunto de prueba 1 (Ejemplo 1, tabla 4)	Conjunto de prueba 2
	NID2, BMP7, TWIST1, CCNA1 y RUNX3	TWIST, RUNX3, NID2
	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]
Papiloma	75 (3/4)	100 (6/6)
Ta	94 (16/17)	84 (16/19)
Tis	100 (2/2)	100 (4/4)
T1	71 (10/14)	100 (12/12)
T2	100 (14/14)	83 (10/12)
T3	50 (1/2)	/
Desconocido	78 (7/9)	100 (3/3)
Estadios tempranos de cánceres (Papiloma, Ta, Tcis, T1 y T2)	88% de sensibilidad (45/51) [79 - 97]	91% de sensibilidad (48/53) [80 - 97]
Todos los estadios de cáncer	85% de sensibilidad (53/62) [77 - 94]	91% de sensibilidad (51/56) [80 - 97]
Controles (pacientes no cancerosos sintomáticos)	93% de especificidad (10/143) [89 - 97]	93% de especificidad (9/126) [87 - 97]

Se compararon los resultados de la metilación y la citología (ambos conjuntos de prueba de orina) para las mismas muestras de orina (Tabla 9).

Tabla 9: Comparación de los resultados de citología con metilación actualmente disponibles

Resultados		Casos de cáncer	Casos control	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]	%Especificidad (n.º de positivos / n.º total) [IC del 95%]
Conjunto de prueba 1					
Resultados de la citología	Negativo	39	132	37% (23/62) [25-49]	96% (6/138) [92-99]
	Positivo/Atipia	23	6		
Resultados de la metilación	Negativo	9	133	85% (53/62) [77-94]	93% (10/143) [89-97]
	Positivo	53	10		
Conjunto de prueba 2					
Resultados de la citología	Negativo	32	119	43% (24/56) [30-56]	94% (7/126) [90-98]
	Positivo/Atipia	24	7		
Resultados de la metilación	Negativo	5	117	91% (51/56) [84-99]	93% (9/126) [90-98]
	Positivo	51	9		

La sensibilidad del panel de 3 marcadores de metilación era significativamente mayor que la sensibilidad de la citología (91% frente a 43%) mientras que la especificidad era similar (93% frente 94%).

5 El comportamiento de los ensayos de metilación entre los diferentes centros de recogida de muestras era muy reproducible (Tabla 10).

Tabla 10: Comportamiento de los ensayos de metilación válidos entre los diferentes centros de recogida de muestras.

Centros de recogida de muestras	Conjuntos de muestras	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total)	%Especificidad (n.º de positivos / n.º total)
Centro 1	conjunto de prueba 1	78% (18/23)	92% (5/64)
	conjunto de prueba 2	89% (8/9)	91% (2/21)
Centro 2	conjunto de prueba 1	93% (14/15)	95% (2/40)
	conjunto de prueba 2	93% (28/30)	94% (3/52)
Centro 3	conjunto de prueba 1	88% (21/24)	92% (3/39)
	conjunto de prueba 2	88% (15/17)	93% (4/53)

Ejemplo 3: Enfoque combinado no invasivo

15 Para potenciar adicionalmente la sensibilidad el nuevo ensayo de metilación del ADN basado en orina, los inventores investigaron la factibilidad de combinar su ensayo de metilación con los métodos establecidos para la detección del cáncer de vejiga en estadio temprano en muestras de orina. Se usaron los resultados de la citología urinaria convencional (pauta terapéutica habitual) y del análisis de la mutación FGFR3 (particularmente útil para la detección de la recidiva) para complementar los métodos de la invención.

Materiales y métodos

20 Recogida de muestras: se utilizaron muestras de orina del conjunto de prueba 1 y del conjunto de prueba 2 como se describe en los Ejemplos 1 y 2 para demostrar la utilidad de combinar el ensayo de metilación con la citología y/o los resultados de la mutación FGFR3.

25 Diferentes ensayos probados:

Ensayo de metilación del ADN basado en orina de la OMS: Se llevaron a cabo cuantificaciones de los analitos (TWIST, RUNX3, NID2, y ACTB) mediante ensayos MSP como se ha detallado anteriormente.

Citología urinaria: Se aplicó el procedimiento general para el examen de la citología (véase McKee G. en: Gray W y McKee GT eds. Diagnostic Cytopathology. 2ª ed. Churchill Livingstone 2003).

Análisis de alto rendimiento de la mutación FGFR3: Se procesaron muestras de orina mediante el ensayo snapshot como se ha descrito anteriormente en van Oers et al. Con este método, se combinó en un ensayo el análisis de 3 regiones del gen FGFR3, localizado en los exones 7, 10 y 15, permitiendo que se cribara una muestra para todas las mutaciones FGFR3 simultáneamente. Estas regiones comprenden mutaciones de 9 codones potenciales: R248C y S249C (exón 7), G372C, Y375C, y A393E (exón 10), y K652E, K652Q, K652M, y K652T (exón 15).

10 **Resultados**

Resultados combinados de metilación y citología:

Se compararon los resultados de la metilación y la citología (procedentes de ambos conjuntos de prueba de orina) sobre las mismas muestras de orina (véase la Tabla 11).

Conjunto de prueba de orina 1:

La sensibilidad del panel de metilación era significativamente mayor que la sensibilidad de la citología (85% frente a 37%) mientras que la especificidad era similar (93% frente a 97%).

La combinación de la metilación y la citología dio como resultado un valor predictivo negativo de >95% basado en una prevalencia del cáncer de vejiga del 31% en esta población de alto riesgo. (Un valor predictivo negativo (NPV) significa el porcentaje de ensayos negativos que son verdaderamente negativos).

Esta combinación dio como resultado una relación de probabilidad negativa (NLR) de 0,11 y una relación de probabilidad positiva (PLR) de 8,1, indicando la utilidad de dicha combinación de ensayos en la evaluación de una población de alto riesgo para el cáncer de vejiga.

Conjunto de prueba de orina 2:

La sensibilidad del panel de metilación (panel de 3 marcadores preferidos) era significativamente mayor que la sensibilidad de la citología (91% frente a 43%) mientras que la especificidad era similar (93% frente a 94%).

La combinación de la metilación y la citología dio como resultado un valor predictivo negativo de >98% basado en una prevalencia del cáncer de vejiga del 31% en esta población de alto riesgo. Esta combinación dio como resultado una NLR de 0,041 y una PLR de 8,1, indicando la utilidad de dicha combinación de ensayos en la evaluación de una población de alto riesgo para el cáncer de vejiga.

NLR es una medida de la fiabilidad de un resultado negativo y se calcula mediante la fórmula (1-Sensibilidad)/Especificidad. Una PLR es una medida de la fiabilidad de un resultado positivo y se calcula mediante la fórmula Sensibilidad/(1-Especificidad). (por ejemplo, una NLR de 0,04 significa que la misma es 25 veces (1/0,04) más probable que sea verdaderamente negativa con un resultado de ensayo negativo y una PLR de 8 significa que la misma es 8 veces más probable que sea completamente positiva con un ensayo positivo)

Tabla 11: Resultados combinados de citología-metilación utilizando el mismo conjunto de muestras

	Conjunto de pruebas de orina 1			Conjunto de pruebas de orina 2		
	Resultados de la metilación	Resultados de la citología	Combinación	Resultados de la metilación	Resultados de la citología	Combinación
Cáncer total	62	62	62	56	56	56
POS	53	23	56	51	24	54
NEG	9	39	6	5	32	2
Sensibilidad	85%	37%	90%	91%	43%	96%
Controles totales	143	138	143	126	126	126
POS	10	6	16	9	7	15
NEG	133	132	127	117	119	111
Especificidad	93%	97%	89%	93%	94%	88%

Resultados combinados de metilación, citología y mutación FGFR3: Se compararon los resultados de la metilación, citología y mutación FGFR3 para las mismas muestras de orina (Tabla 12). En total, se seleccionaron 61 muestras aleatoriamente de ambos conjuntos de prueba de orina (41 casos de cáncer y 20 muestras del control) y se

procesaron mediante 3 métodos diferentes utilizando cebadores y condiciones de reacción como se han indicado anteriormente.

5

Tabla 12: Clasificación del grupo de muestras de las muestras ensayadas mediante metilación, citología y el test de la mutación FGFR3

Grupos de muestras	61 muestras de orina ensayadas
Papiloma	4
Ta	13
Tis	3
T1	8
T2	6
T3	1
Desconocido	6
Controles (pacientes no cancerosos sintomáticos)	20

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 13 siguiente. Un resultado combinado se considera negativo cuando se obtuvo una señal negativa (0, NEG, WT) de los 3 ensayos, de forma alternativa, un resultado combinado se considera positivo cuando al menos un método era positivo (1, ATIPIA o MT)

10

Tabla 13: Resultados combinados de metilación, citología y mutación FGFR3 utilizando el mismo conjunto de muestras

N.º paciente	Resultados de la	Resultados de la citología	Mutación FGFR3	Combinación Metilación/citología	Combinación Metilación/FGFR3	Combinación Citología/FGFR3	Combinación Metilación/Citología/FGFR3
Caso 1	1	ATIPIA	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 2	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 3	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 4	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 5	1	ATIPIA	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 6	1	POS	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 7	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 8	1	POS	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 9	1	POS	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 10	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 11	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Caso 12	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 13	1	POS	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 14	1	POS	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 15	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 16	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 17	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 18	1	POS	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 19	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 20	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 21	0	ATIPIA	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 22	0	NEG	MT	NEG	POS	POS	POS
Caso 23	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS

N.º paciente	Resultados de la	Resultados de la citología	Mutación FGFR3	Combinación Metilación/citología	Combinación Metilación/FGFR3	Combinación Citología/FGFR3	Combinación Metilación/Citología/FGFR3
Caso 24	1	ATIPIA	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 25	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 26	0	ATIPIA	NAT	POS	NEG	POS	POS
Caso 27	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 28	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 29	1	NEG	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 30	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 31	1	POS	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 32	1	POS	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 33	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Caso 34	1	ATIPIA	MT	POS	POS	POS	POS
Caso 35	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 36	1	POS	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 37	1	ATIPIA	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 38	1	POS	NAT	POS	POS	POS	POS
Caso 39	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 40	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Caso 41	1	NEG	NAT	POS	POS	NEG	POS
Total Cánceres Pos	41 36	41 17	41 17	41 38	41 38	41 25	41 39
NEG	5	24	24	3	3	16	2
sensibilidad	88%	42%	42%	93%	93%	61%	95%
Control 1	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 2	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 3	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG

N.º paciente	Resultados de la	Resultados de la citología	Mutación FGFR3	Combinación Metilación/citología	Combinación Metilación/FGFR3	Combinación Citología/FGFR3	Combinación Metilación/Citología/FGFR3
Control 4	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 5	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 6	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 7	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 8	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 9	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 10	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 11	1	ATIPIA	NAT	POS	POS	POS	POS
Control 12	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 13	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 14	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 15	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 16	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 17	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 18	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 19	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Control 20	0	NEG	NAT	NEG	NEG	NEG	NEG
Controles totales	20	20	20	20	20	20	20
Pos	1	1	0	1	1	1	1
NEG	19	19	20	19	19	19	19
especificidad	95%	95%	100%	95%	95%	95%	95%
PLR	4,67	1,69	1,83	7,15	7,15	2,10	10,24
NLR	0,03	0,13	0	0,03	0,03	0,07	0,03

(1 = Metilado, 0 = No metilado, MT = Mutante, NA = natural, POS = Positivo, NEG = Negativo, ATIPIA = Célula sospechosa atípica)

Los resultados muestran claramente que la citología urinaria convencional y el análisis de la mutación FGFR3 se pueden usar para complementar el ensayo de metilación. El resultado combinado de estos 3 ensayos dio como resultado una NLR de 0,03 y una PLR de 10,24, indicando que dicha combinación de ensayos sería muy útil en un escenario clínico para ayudar al urólogo a determinar si un paciente tiene cáncer de vejiga o no.

5 El inconveniente notificado de todos los ensayos actualmente disponibles es la mala especificidad. La combinación de diferentes métodos para la detección del cáncer de vejiga ha mostrado mejorar la sensibilidad pero a costa de su especificidad. El enfoque combinado no invasivo de los inventores dio como resultado una sensibilidad del 95% manteniendo a la vez elevados valores de especificidad (95%) en el ensayo de metilación de los inventores. Estos resultados resaltan el potencial predictivo de combinar la citología urinaria (considerada la pauta terapéutica convencional) con el ensayo de metilación de los inventores. Estos resultados muestran claramente que este enfoque combinado no invasivo ofrece una alternativa valiosa a los ensayos de marcadores basados en orina actualmente disponibles.

15 **Ejemplo 4: Un ensayo MSP en tiempo real para la detección temprana de cáncer de vejiga - conjunto de prueba de orina 3.**

Normalmente, las muestras de orina se centrifugan en las 4 horas desde la recogida para evitar la degradación del ADN. Los inventores han mostrado (véase la solicitud internacional PCT/GB2008/002093) que añadir tampón estabilizante a la muestra de orina evita la necesidad de centrifugación poco tiempo después de la recogida de orina. Las muestras se pueden mantener a temperatura ambiente durante hasta 72 horas tras la adición de un tampón estabilizante, sin necesidad de centrifugación, manteniendo a la vez la integridad del ADN.

25 Se probó el panel de 3 marcadores del Ejemplo 2 con un conjunto independiente de muestras, denominado 'conjunto de prueba de orina 3'. En este conjunto de prueba, se almacenaron muestras de orina recogidas recientemente con tampón estabilizante durante hasta 72 horas a temperatura ambiente antes de la centrifugación.

Materiales y métodos

30 El material y los métodos son idénticos a lo que se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2 excepto para la preparación de la muestra de orina.

35 En vez de centrifugar la muestra de orina en un plazo de 4 h a 3000 g durante 10 min, se añadió estabilizante (comprimidos Stabilur®, Cargille Laboratories, n.º 40050, 5 comprimidos por 50 ml de orina) en el momento de la recogida. A continuación, la muestra de orina se mantuvo a temperatura ambiente hasta 72 h antes de la centrifugación. Los sedimentos de orina se almacenaron a -20°C hasta 6 meses y se procesaron adicionalmente como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Resultados:

40 Índice de validez del ensayo en tejido y orina: Se procesaron ciento treinta muestras de tejido incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) y 495 muestras de orina utilizando MSP en tiempo real (Tabla 14). Los ensayos de MSP en tiempo real produjeron resultados válidos en el 96% de las muestras de FFPE y en el 94% de las muestras de orina.

Tabla 14: Resumen de las muestras evaluadas mediante MSP en tiempo real

Conjuntos de muestras	Tipos de muestras	Número de muestras	Ensayos válidos [%]
Conjunto de pruebas de tejidos	Cáncer	53	53/53 [100]
	Controles	30	25/30 [83]
	Total	83	78/83 [94]
Conjunto de ensayo de tejidos	Cáncer	38	38/38 [100]
	Controles	9	9/9 [100]
	Total	47	47/47 [100]
Conjuntos combinados de tejidos	Cáncer	91	91/91 [100]
	Controles	39	34/39 [87]
	Total	130	125/130 [96]
Conjunto de pruebas de orina 1	Cáncer	68	62/68 [91]
	Controles	150	143/150 [95]
	Total	218	205/218 [94]

Conjuntos de muestras	Tipos de muestras	Número de muestras	Ensayos válidos [%]
Conjunto de pruebas de orina 2	Cáncer	62	56/62 [90]
	Controles	135	126/135 [93]
	Total	197	182/197 [92]
Conjunto de pruebas de orina 3	Cáncer	32	32/32 [100]
	Controles	48	45/48 [94]
	Total	80	77/80 [96]
Conjuntos combinados de orina	Cáncer	162	150/162 [93]
	Controles	333	314/333 [94]
	Total	495	464/495 [94]

Selección de marcadores en el tejido de vejiga: Se describen los resultados en el Ejemplo 1 con referencia a la figura 2 y a la tabla 3.

- 5 Ensayo de marcadores en muestras de orina: Se estudió adicionalmente el panel de marcadores con mejor comportamiento en el primer conjunto de pruebas de orina (5 genes, Ejemplo 1) con un conjunto de muestras independiente recogido prospectivamente del ensayo en curso (conjunto 2 de pruebas de orina). La reducción adicional en el número de genes probados, que dieron como resultado menos ensayos por muestra, permitió una alícuota mayor de la muestra en cada ensayo. Se describen estos resultados en el Ejemplo 2 y se repiten en la tabla 15 siguiente.

15 Las muestras de orina en el tercer conjunto de pruebas incluían 48 muestras de pacientes sin cáncer y 32 muestras de pacientes que cubrían los estadios tempranos del cáncer de vejiga. El ensayo proporcionó resultados válidos de 45 controles y 32 casos de cáncer de vejiga (Tabla 14). Un urólogo revisó los formularios de informes de casos de aquellos 80 pacientes. Los 32 casos de cáncer de vejiga se clasificaron en varios grupos de cáncer (2 papilomas, 13 Ta, 1 Tis, 9 T1, 5 T2, 1 carcinoma epidermoide y 1 desconocido). Los 45 controles (emparejados por edad) se clasificaron en varios grupos control (21 de prostatitis, 3 de BPH [hiperplasia prostática benigna], 2 de hidrocele, 1 de epididimita, 1 de constricción de la uretra, 1 de LUTS [síntomas del tracto urinario inferior], 1 de inestabilidad vesical, 1 de prolapso, 14 desconocidos).

20 Las muestras se clasificaron como metiladas, no metiladas, o no válidas basándose en el árbol de decisiones que se muestra en la Figura 4. En este modelo de interpretación lineal, una muestra se puntuó positiva si algún marcador proporciona un número de copias por encima del corte. Los cortes se adaptaron para ambos conjuntos de prueba para obtener resultados de sensibilidad y especificidad óptimas, y se muestran en la Tabla 15. El corte del gen de referencia ACTB se ajustó a 15 copias.

25 Tabla 15: Comportamiento de un panel de marcadores de orina en diferentes grupos de muestras. Los cortes aplicados se señalan entre corchetes adyacentes al gen marcador.

Grupos de muestras	Conjunto de prueba 2	Conjunto de prueba 3
	TWIST1 (7.5), RUNX3 (5) y NID2 (30)	TWIST1 (7.5), RUNX3 (5) y NID2 (30)
	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]
Papiloma	100 (6/6)	50 (1/2)
Ta	84 (16/19)	85 (11/13)
Tis	100 (4/4)	100 (1/1)
T1	100 (12/12)	100 (9/9)
T2	83 (10/12)	100 (5/5)
Carcinoma epidermoide	/	100 (1/1)
Desconocido	100 (3/3)	100 (1/1)
Todos los estadios de cáncer	91% de sensibilidad (51/56) [80-97]	91% de sensibilidad (29/32) [81-100]
Controles (sintomáticos)	91% de especificidad (11/124) [86-96]	91% de especificidad (4/45) [82-99]

Se obtuvieron resultados comparables para el conjunto de prueba 2 y el conjunto de prueba 3 independientemente de si se centrifugaron las muestras de orina en las 4 h desde la recogida o se estabilizaron tras la recogida y el mantenimiento a temperatura ambiente durante hasta 72 h antes de la centrifugación.

- 5 El tercer estudio, llevado a cabo sobre un conjunto de muestras independiente confirmó que el ensayo de metilación basado en orina (TWIST1, RUNX3 y NID2) identificó correctamente el 91% de todos los cánceres de vejiga ensayados con una tasa de falso positivo de solo el 9% (91% de especificidad).

- 10 En la Tabla 16 se muestra el comportamiento individual del gen TWIST1 en el conjunto de pruebas de orina 2 y 3. Se obtuvo una especificidad del 95% con una sensibilidad correspondiente del 77% y 91% respectivamente.

Tabla 16: El ensayo del comportamiento del gen individual Twist 1 presenta un % de especificidad y un % de sensibilidad para los conjuntos de prueba 2 y 3 (corte aplicado para TWIST1=7.5, en ACTB=15)

Grupos de muestras	Conjunto de prueba 2	Conjunto de prueba 3
	TWIST1 (7,5)	TWIST1 (7,5)
	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]	%Sensibilidad (n.º de positivos/ n.º total) [IC del 95%]
Papiloma	83 (5/6)	50 (1/2)
Ta	74 (14/19)	85 (11/13)
Tis	75 (3/4)	100 (1/1)
T1	75 (9/12)	100 (9/9)
T2	75 (9/12)	100 (5/5)
Carcinoma epidermoide	/	100 (1/1)
Desconocido	100 (3/3)	100 (1/1)
Todos los estadios de cáncer	77% de sensibilidad (43/56) [66-88]	91% de sensibilidad (29/32) [81-100]
Controles (sintomáticos)	95% de especificidad (6/124) [91-99]	95% de especificidad (2/44) [89-102]

15 **Referencias.**

- Akey DT, Akey JM, Zhang K, Jin L. Assaying DNA methylation based on high-throughput melting curve approaches. *Genomics*. 2002 Oct;80(4):376-84.
- 20 Barringer KJ, Orgel L, Wahl G, Gingeras TR. Blunt-end and single-strand ligations by *Escherichia coli* ligase: influence on an in vitro amplification scheme. *Gen* 1990 Apr 30;89(1):117-22.
- Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991 Mar 7;350(6313):91-2.
- 25 Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwoppe I, Tetzner R, Ziebarth H, Berlin K. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 13;32(1):e10
- 30 Di Vinci A, Gelvi I, Banelli B, Casciano I, Allemanni G, Romani M; Meth-DOP-PCR: an assay for the methylation profiling of trace amounts of DNA extracted from bodily fluids; *Lab Invest*. 2006 Mar;86(3):297-303;
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a highthroughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 15 Abr 2000; 28(8):E32.
- 35 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
- Fahy E, Kwoh DY, Gingeras TR. Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl*. 1991 Ago;1(1):25-33.
- 40 Review Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6

- Furuichi Y, Wataya Y, Hayatsu H, Ukita T. Chemical modification of tRNA-Tyr-yeast with bisulphite. A new method to modify isopentenyladenosine residue. *hem Biophys Res Commun*. 1970 Dec 9;41(5):1185-91
- 5 Jones P.A. and Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3 (2002), 415-428.
- Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Leverison Chernokhvostov VV. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jun 8;33(10):e93.
- 10 Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods*. 2002 Jun;27(2):114-20.
- Sasaki M, Anast J, Bassett W, Kawakami T, Sakuragi N, Dahiya R. Bisulphite conversion-specific and methylationspecific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 19;309(2):305-9.
- 15 Zeschnick M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer.L, Lohmann DR. A novel real-time PCR assay for Quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res*. 2004 Sep 7;32(16):e125.
- 20 Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *AmJPathol* 2001;158:1955-9.
- Lotan Y, Roehrborn CG. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and metaanalyses. *Urology* 2003;61(1):109-18.
- 25 van Oers JM, Lurkin I, van Exsel AJ, Nijsen Y, van Rhijn BW, van der Aa MN, Zwarthoff EC. A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin Cancer Res*. 2005 Nov 1;11(21):7743-8.
- 30 van Rhijn BW, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC, Chopin DK, Boevé ER, Jébsis AC, Zwarthoff EC. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2003 Mayo 15;21(10):1912-21).
- 35 van Rhijn BW, van Tilborg AA, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thiery JP, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, Radvanyi F. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. *Eur J Hum Genet*. 2002 Dec;10(12):819-24.
- 40 Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry* 1993, 39, 561-577.
- 45 Straub, J. et al., Abstract: A64-AACR Molecular Diagnostics in Cancer Therapeutic Development (2007): Base5, a versatile, highly integrated high-throughput methylation profiling platform for Methylation-Specific PCR based marker identification applied to CRC
- Renard, I. et al, Abstract: A62-AACR Molecular Diagnostics in Cancer Therapeutic Development (2007): Feasibility of. a urine-based DNA methylation assay for early detection of Bladder Cancer

Listado de secuencias

- 50 <110> OncoMethylome Sciences SA
- <120> Novedosos marcadores para la detección del cáncer de vejiga
- 55 <130> P94688WO00
- <160> 56
- <170> PatentIn versión 3.4
- 60 <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 65 <220>

ES 2 605 237 T3

<223> Cebador
 <400> 1
 5 gcggtgaagt cggggttc 18
 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2
 15 cccgtacttc gctaacttta aacg 24
 <210> 3
 <211> 42
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25 <400> 3
 cgtctcgtg gtttcgtcg gttcgcggtt gtaggcaga cg 42
 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 35 <400> 4
 tattgcggag tgccgggtc 18
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 45 <400> 5
 tcgacgaact cccgacga 18
 <210> 6
 <211> 48
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 55 <400> 6
 60 cgacatcgt tgtgtaattc gttggatgcg gattagggcg gcatgtcg 48
 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 605 237 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 5 gttatggcga tgcggttc 19

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 8
 15 ccaacctaaa aaacgaccga 20

 <210> 9
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25
 <400> 9
 cgacatgcac gacgccccg aacctaacgc atgtcg 36

 <210> 10
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10
 35 gtcgtcgaga aggttcggt t 21

 <210> 11
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 11
 45 gcgatttcta cttaacctat ccgc 24

 <210> 12
 <211> 37
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)

 <400> 12
 55 cgacatgcac gacccgcct cccccgcg catgtcg 37

 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 65

ES 2 605 237 T3

	<220>	
	<223> Cebador	
5	<400> 13 taaattagat cgctgttctg gag	23
	<210> 14 <211>21 <212> ADN <213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Cebador	
15	<400> 14 tacctcaatt tctcgatccg c	21
	<210> 15 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)	
25	<400> 15 cgacatgctg ggaggggttcg cggttattgt aaggagcatg tcg	43
	<210> 16 <211>21 <212> ADN <213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Cebador	
35		
	<400> 16 gtagagcgc gtttttagcg t	21
40	<210> 17 <211>21 <212> ADN <213> Artificial	
45		
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 17 ccgcaatacc taacactcc g	21
	<210> 18 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)	
60	<400> 18 cgacatgccc gacacgtcc gaaacaccag catgtcg	37
	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
65		

<220>
 <223> Cebador

 <400> 19
 5 gtgtaagag tgcgtagtaa gacg 24

 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 20
 15 gaaacgaacg tacaanaacg a 21

 <210> 21
 <211> 47
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25
 <400> 21
 cgacatgccg aaactataaa tcaactacga aacaaacgcg catgtcg 47

 <210> 22
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 22
 gttagggttc gggggcgttg tt 22

 <210> 23
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 45
 <400> 23
 50 ccgtgcctt cctccgacga a 21

 <210> 24
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)

 <400> 24
 60 cgacatgccg gcggggaagg aaatcgttc gcatgtcg 38

 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 605 237 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 25
 5 tagagtacgt gtcggtcgga t 21

 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 26
 15 acaaaaacaa aaacgacgcc t 21

 <210> 27
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25
 <400> 27
 cgacatgccg ggtgtgttg gtcggcgcgc atgtcg 36

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30

 <220>
 <223> Cebador
 35

 <400> 28
 gagatcgcgg gttttattt c 21
 40
 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 45

 <400> 29
 50 ccaacttct acgacgcat 19

 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)

 <400> 30
 60 cgacatgccg cccaaccgcg cgacacaagc atgtcg 36

 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 605 237 T3

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 31
 cgtaggggtg tatttgagcg a 21

 <210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 15 <400> 32
 taacttttaa cgaattacc ccg 23

 <210> 33
 <211> 47
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25 <400> 33
 cgacatgccg ggtaggggg gcgtaaaatt ttattcgtg catgtcg 47

 <210> 34
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 35 <400> 34
 ggcgtttagg ttaattttc gt 22

 40 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 <400> 35
 50 cgatcccata tctaaaaccg a 21

 <210> 36
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)

 <400> 36
 60 cgacatgcct cgcgatccgc ccgaaacgca tgtcg 35

 <210> 37
 <211> 23
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

	<220> <223> Cebador	
5	<400> 37 agcgtagaga taggtggta acg	23
10	<210> 38 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
15	<400> 38 aaaacgataa cccttaaacc ga	22
20	<210> 39 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)	
25	<400> 39 cgacatgcgc ggaggggta gcgtgggtgc atgtcg	36
30	<210> 40 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
35	<400> 40 gcggtttta aggagttta ttttc	25
40	<210> 41 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador	
50	<400> 41 ctacgaaatt ccctttacgc t	21
55	<210> 42 <211> 39 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)	
60	<400> 42 cgacatgggt tcgtaaggft tgggtagcg gccatgtcg	39
65	<210> 43 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 605 237 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 43
 5 gcgtaaggt acgggtttt c 21

 <210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 44
 15 gccatttcgc ctaacgaac 19

 <210> 45
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)
 25
 <400> 45
 cgacatgcac ggcctcct tcgacacgca tgtcg 35

 <210> 46
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 46
 tagggagtat ataggtggg gaagtt 26

 <210> 47
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 47
 50 aacacacaat aacaacaca aattcac 27

 <210> 48
 <211> 42
 <212> ADN

 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda Molecular Beacon (baliza molecular)

 <400> 48
 60 cgactcgtg tgggtggtg atggaggagg ttaggcagt cg 42

 <210> 49
 <211> 66
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 605 237 T3

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 49
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttcgtc atctgcccc
 acagag 60
 66

10 <210> 50
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 50
 tttttttt tttttttt tttttttt ttttttctg cccccacaga gcgct 55

20 <210> 51
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<400> 51
 tttttttt tttttttt tttttttt tgccccaca gagcgct 47

30 <210> 52
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 52
 tttttttt tttttttt tttttttt gtggaggctg acgaggcg 48

45 <210> 53
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Cebador

<400> 53
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt ttacgaggc gggcagtgtg 60
 t 61

55 <210> 54
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Cebador

<400> 54
 tttttttt tttttttt tttttttt ttttctgtt catcctggg gtgg 54

65 <210> 55
 <211> 72
 <212> ADN

ES 2 605 237 T3

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
5
<400> 55
tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt gcacaacctc 60
gactactaca ag 72
10 <210> 56
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Cebador
<400> 56
20 tttttttt tttttttt cacaacctcg actactacaa ga 42

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la incidencia de un cáncer de vejiga en una muestra que comprende detectar un cambio epigenético en al menos TWIST1 y opcionalmente también al menos un gen seleccionado entre NID2, RUNX3, BMP7, CCNA1, PDLIM4, TNFRSF25, APC, RASSF1A, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, OSMR y TJP2 donde la detección del cambio epigenético es indicadora de la incidencia del cáncer de vejiga y donde el cambio epigenético es metilación.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende detectar un cambio epigenético en un panel de genes que comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco de los genes, donde la detección de un cambio epigenético en al menos uno de los genes del panel es indicadora de la incidencia del cáncer de vejiga.
3. El método de la reivindicación 2, donde el panel de genes comprende TWIST 1 y NID2 o comprende, consiste esencialmente o consiste de NID2, TWIST1 y RUNX3.
4. El método de cualquier reivindicación anterior donde la muestra comprende un tejido de vejiga o una muestra de orina.
5. El método de reivindicación 4, donde se añade un tampón de estabilización a la muestra de orina tras su recogida, permitiendo de esta forma que la muestra se almacene durante un periodo de hasta 72 horas a temperatura ambiente sin necesidad de centrifugar la muestra.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, que se utiliza junto un análisis de citología urinaria y/o de mutaciones.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende detectar la recurrencia del cáncer de vejiga.
8. Uso de un kit para detectar la incidencia del cáncer de vejiga en una muestra para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el kit comprende al menos una primera pareja para determinar el estado de metilación de cada uno de NID2, TWIST1 y RUNX3 o cada uno de TWIST1 y NID2.
9. Uso de un kit para detectar la incidencia de cáncer de vejiga en una muestra para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el kit comprende:
 - (a) medios para detectar un cambio epigenético en al menos un TWIST1 y opcionalmente también al menos un gen seleccionado entre NID2, RUNX3, BMP7, CCNA1, PDLIM4, TNFRSF25, APC, RASSF1 A, LOXL1, TUBB4, NTRK2, ARFGAP3, OSMR y TJP2, donde el cambio epigenético es metilación
 - (b) medios para procesar una muestra de orina, comprendiendo opcionalmente un recipiente precintable para recogida de una muestra de orina y un tampón de estabilización.
10. El uso de la reivindicación 9, donde el kit comprende medios para detectar un cambio epigenético en un panel de genes que comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco de los genes, donde la detección de un cambio epigenético en al menos uno de los genes del panel es indicadora de la predisposición, o la incidencia, del cáncer de vejiga.
11. El uso de la reivindicación 10, donde el panel de genes comprende TWIST 1 y NID2 o NID2, TWIST1 y RUNX3.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 donde el medio para detectar la metilación comprende cebadores de amplificación por PCR específica de metilación.
13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde el kit comprende además uno o más cebadores para detectar mutaciones en el gen FGFR3.
14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde el medio para detectar un cambio epigenético en al menos TWIST1 comprende un cebador o pareja de cebadores para determinar el estado de metilación de TWIST1, donde el cebador o pareja de cebadores comprende la secuencia o secuencias de nucleótidos definidas como SEQ ID NO: 22 y/o 23 o una variante funcional de las mismas.
15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el medio para detectar un cambio epigenético en al menos TWIST1 comprende una sonda para determinar el estado de metilación de TWIST1, donde el cebador o pareja de cebadores comprende la secuencia de nucleótidos definida como SEQ ID NO: 24 o una variante funcional de la misma.

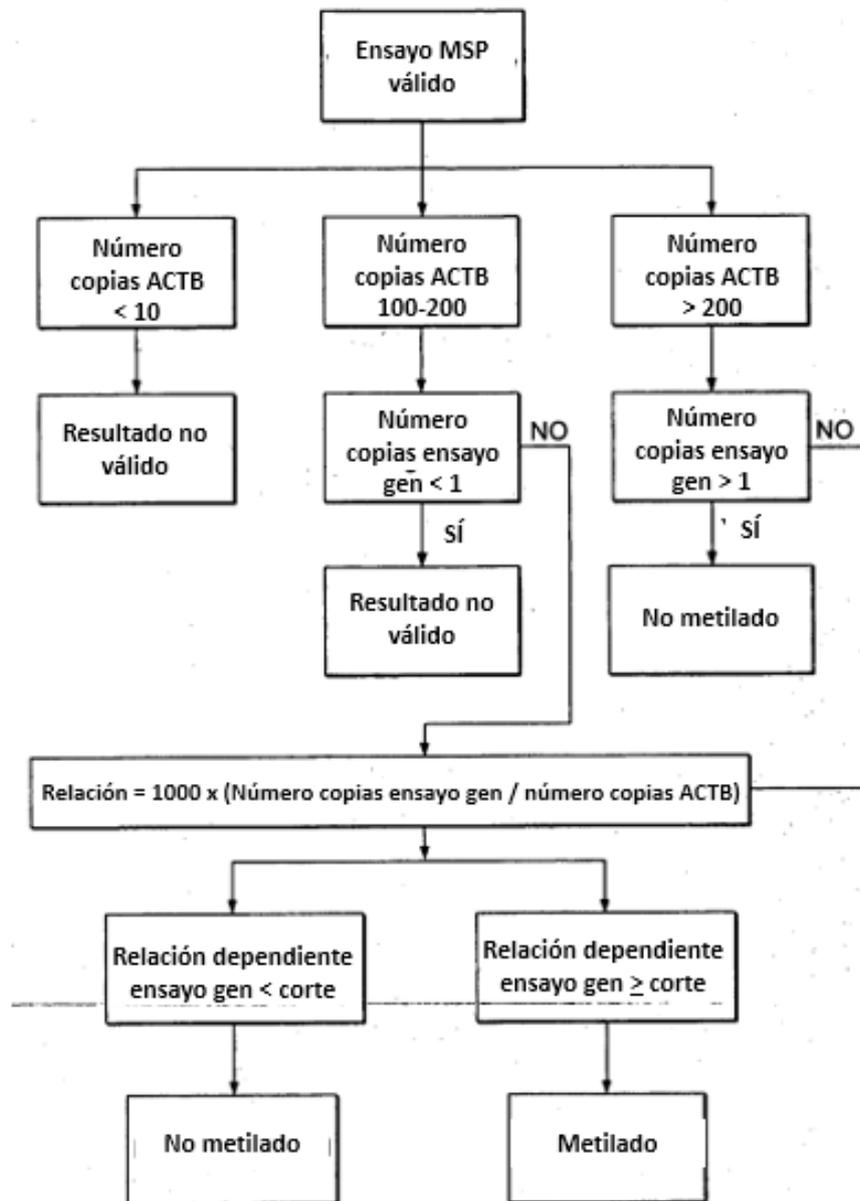


FIG. 1

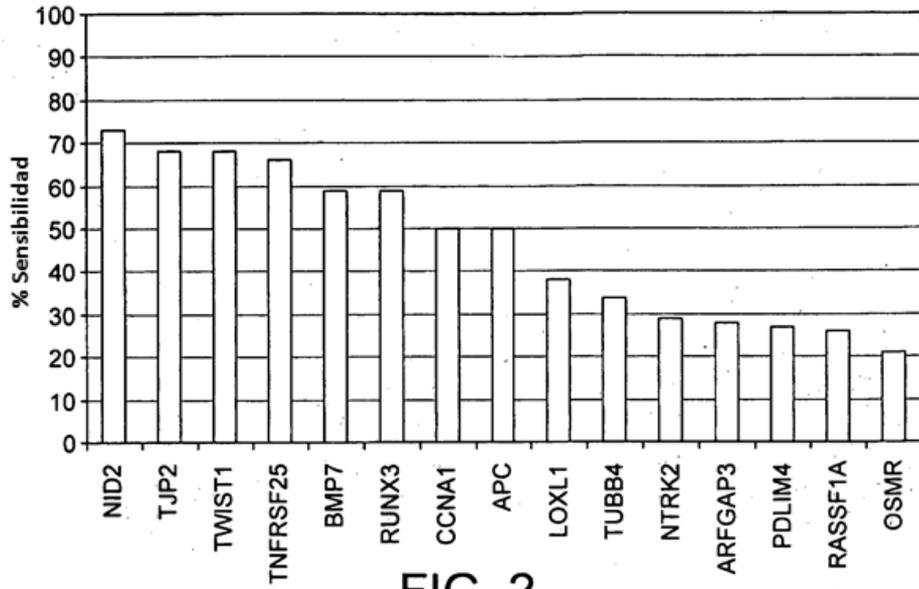


FIG. 2

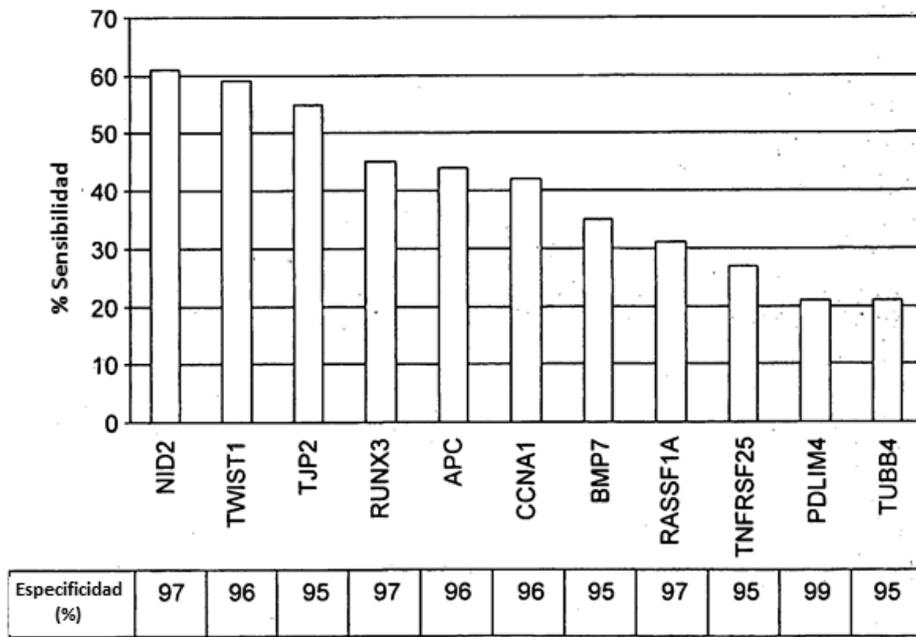


FIG. 3

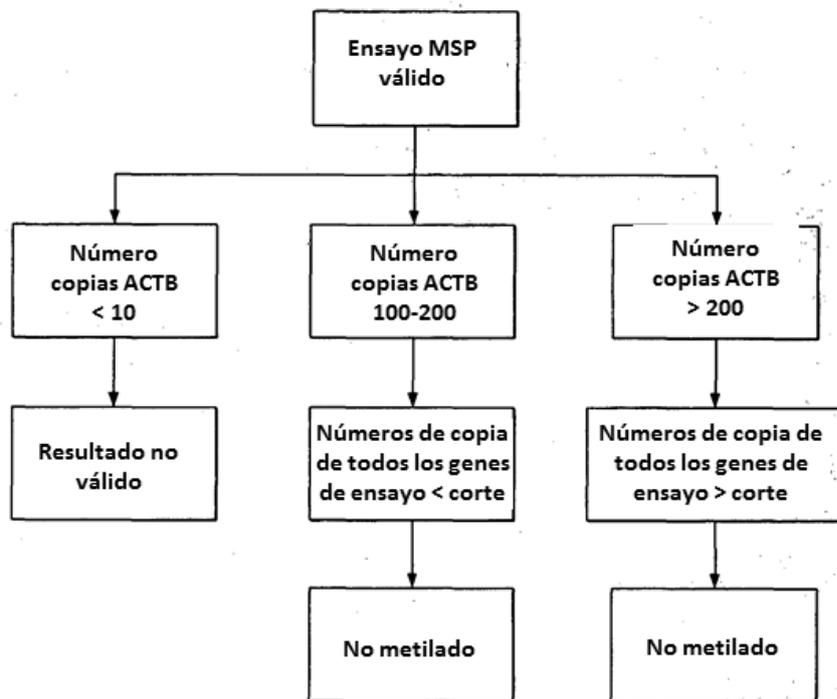


FIG. 4

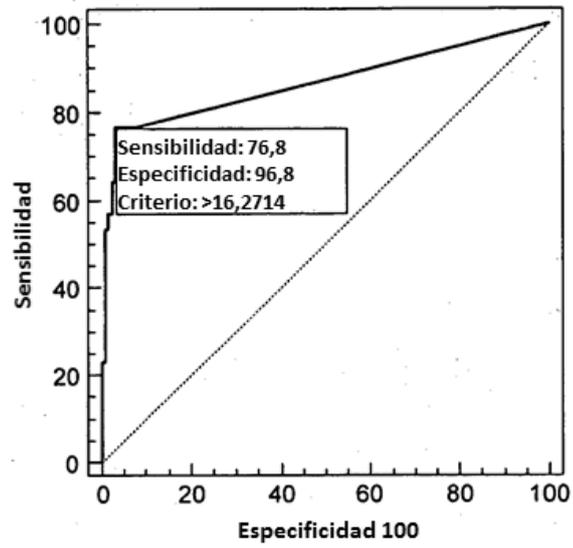


FIG. 5A

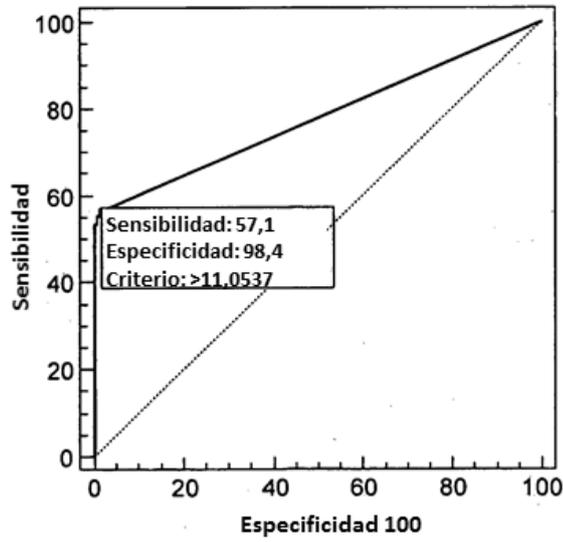


FIG. 5B

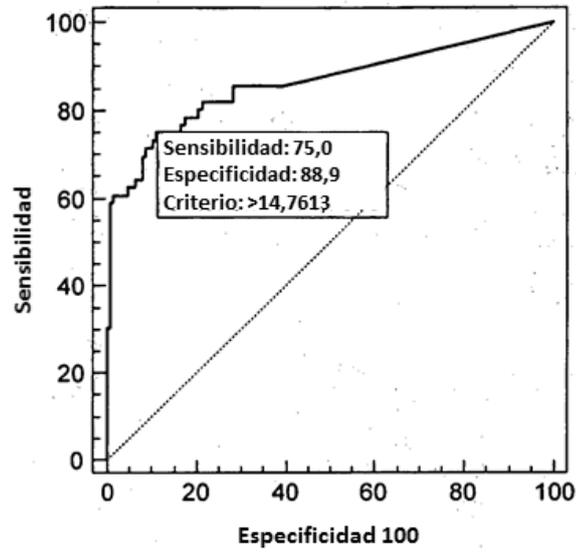


FIG. 5C

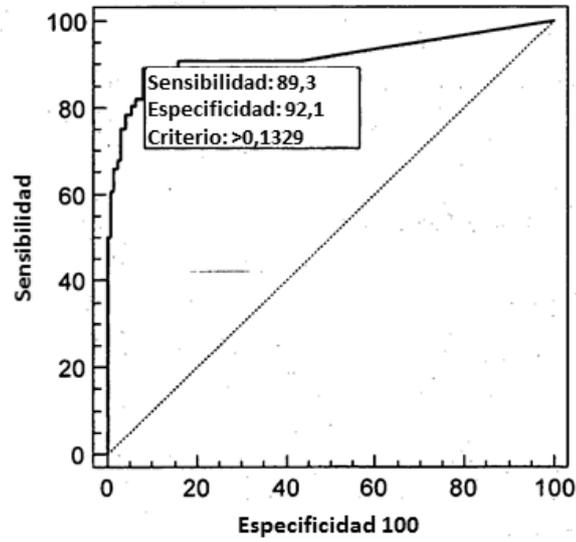


FIG. 5D