

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 032**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013 PCT/US2013/037334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO2013158972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13718488 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2839028**

54 Título: **Métodos de detección del cáncer de vejiga**

30 Prioridad:

20.04.2012 US 201261636194 P
28.02.2013 US 201361770803 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2017

73 Titular/es:

CEPHEID (100.0%)
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089, US

72 Inventor/es:

HIGUCHI, RUSSELL;
WALLACE, STACEY ELLEN y
LAI, EDWIN WEI-LUNG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 619 032 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).

Métodos de detección del cáncer de vejiga**Descripción****5 1. CAMPO DE LA INVENCION**

Se proporcionan composiciones y métodos para detectar el cáncer de vejiga. En particular, se proporcionan marcadores y paneles de marcadores del cáncer de vejiga útiles en la detección del cáncer de vejiga.

10 2. ANTECEDENTES

15 Cada año se diagnostican 386.000 casos de cáncer de vejiga a nivel mundial, incluyendo 70.500 casos anuales en Estados Unidos. La incidencia del cáncer de vejiga es tres veces mayor en los hombres que en las mujeres. La mayor incidencia y prevalencia se encuentran en la Unión Europea, América del Norte, África del Norte y Oriente Medio.

20 El tabaquismo es el mayor factor de riesgo para el cáncer de vejiga. Entre otros factores de riesgo se incluyen la exposición a sustancias químicas, la quimioterapia (tal como Cytoxan), la radioterapia y la infección crónica de la vejiga.

Los tumores de vejiga incluyen tumores papilares, que son carcinomas uroteliales que producen proyecciones estrechas similares a un dedo: y tumores no papilares (sésiles), tales como el carcinoma in situ, que son menos frecuentes, pero que tienen un alto riesgo de convertirse en invasivos.

25 Entre los síntomas del cáncer de vejiga se pueden incluir dolor abdominal, sangre en la orina, dolor o sensibilidad ósea, fatiga, dolor al orinar, micción frecuente, urgencia urinaria, incontinencia y pérdida de peso. El diagnóstico se basa generalmente en la formación de imágenes, el análisis de orina, y/o la biopsia.

30 El pronóstico del cáncer de vejiga depende de la etapa del cáncer en el momento del diagnóstico. El pronóstico de los tumores tempranos es favorable, mientras que el pronóstico de los tumores avanzados es malo. Se recomienda el seguimiento a largo plazo para detectar la recurrencia del cáncer, que se produce en hasta el 70 % de los cánceres de vejiga. Durante los dos primeros años, se recomienda realizar cistoscopia y citología de orina cada 3 a 4 meses y, después, a intervalos más largos en los años siguientes, a menudo durante toda la vida del paciente. Estos métodos son invasivos y costosos, lo que hace del cáncer de vejiga uno de los cánceres más caros para tratar desde el diagnóstico hasta la muerte.

35 Entre las pruebas de diagnóstico no invasivas existentes se incluyen ImmunoCyt™ (Scimedx, Denville, NJ) y UroVysion® (Abbott Molecular, Abbott Park, IL). ImmunoCyt™ es un ensayo de citología que utiliza un cóctel de tres anticuerpos monoclonales marcados con marcadores fluorescentes para detectar determinados marcadores celulares de cáncer de vejiga en células exfoliadas aisladas a partir de muestras de orina. ImmunoCyt™ se utiliza junto con la citología de orina estándar para mejorar la sensibilidad de la citología en la detección de células tumorales. UroVysion® es también un ensayo basado en la citología, que detecta aneuploidía en ciertos cromosomas mediante hibridación fluorescente in situ (FISH). La determinación de los resultados se lleva a cabo mediante la enumeración de señales a través de un examen microscópico del núcleo de las células en la orina.

45 Se necesitan mejores métodos para la detección precoz del cáncer de vejiga. En particular, una prueba de diagnóstico precisa basada en la orina que no se basa en la citología podría reducir la necesidad de una cistoscopia costosa e invasiva y que requiere mucha mano de obra y ensayos de citología potencialmente subjetivos.

50 En el documento EP2138848 se divulgan métodos para detectar cáncer de vejiga basados en firmas de genes marcadores.

3. SUMARIO

55 Se proporcionan composiciones y métodos para detectar el cáncer de vejiga. En particular, se proporcionan marcadores y paneles de marcadores del cáncer de vejiga útiles en la detección del cáncer de vejiga. Específicamente, la invención proporciona un método para detectar la presencia de cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende la detección de los niveles de cada marcador de un conjunto de marcadores de cáncer de vejiga en una muestra del sujeto, en el que el conjunto de marcadores de cáncer de vejiga consiste en ARNm de hormona liberadora de corticotropina (CRH), ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), ARNm de queratina 20 (KRT20) y ARNm de anexina 10 (ANXA10), en el que el nivel de cada uno de los marcadores se compara con un nivel normal o de control del marcador, en el que un nivel normal o de control se determina como un nivel promedio o intervalo que es característico de las células uroteliales normales o de otros materiales de referencia, y en el que la detección de un nivel elevado de al menos un marcador indica la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto. Los niveles de cada uno de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 se miden, por ejemplo, mediante RT-PCR cuantitativa, y los resultados se utilizan para determinar si un sujeto tiene cáncer de vejiga o no. En algunas

realizaciones, los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20, y ANXA10 se normalizan con respecto a un control endógeno. En algunas realizaciones, el control endógeno es ARNm de ABL. En algunas realizaciones, se selecciona un control endógeno que se espera que se exprese a niveles similares en las células uroteliales de la vejiga de sujetos con y sin cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de orina. En algunas realizaciones, los presentes métodos se utilizan para controlar a los sujetos con antecedentes de cáncer de vejiga para la recurrencia del tumor. En algunas realizaciones, el sujeto se ha tratado con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) en los últimos tres meses. En algunas realizaciones, los presentes métodos se usan para detectar el cáncer de vejiga en sujetos sin antecedentes de cáncer de vejiga. En algunas de tales realizaciones, los sujetos tienen síntomas de cáncer de vejiga. Entre los ejemplos no limitantes de síntomas de cáncer de vejiga se incluyen dolor abdominal, sangre en la orina, dolor o sensibilidad ósea, fatiga, dolor al orinar, micción frecuente, urgencia urinaria, incontinencia y pérdida de peso.

Los métodos proporcionados son para detectar la presencia de cáncer de vejiga en un sujeto. El método comprende detectar los niveles de cada marcador de un conjunto de marcadores de cáncer de vejiga en una muestra del sujeto, en el que el conjunto de marcadores de cáncer de vejiga consiste en ARNm de hormona liberadora de corticotropina (CRH), ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), ARNm de queratina 20 (KRT20) y ARNm de anexina 10 (ANXA10), en el que el nivel de cada uno de los marcadores se compara con un nivel normal o de control del marcador, en el que un nivel normal o de control se determina como un nivel promedio o intervalo que es característico de las células uroteliales normales o de otros materiales de referencia, y en el que la detección de un nivel elevado de al menos un marcador indica la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende además la detección de un control endógeno. En algunas realizaciones, el control endógeno se selecciona de ABL, GUSB, GAPDH, TUBB y UPK1. En algunas realizaciones, el control endógeno es ABL. En algunas realizaciones, un método comprende la detección de un control exógeno. En algunas realizaciones, el control exógeno es un ARN. En algunas de estas realizaciones, el control exógeno es un Armored RNA®.

En algunas realizaciones, la detección comprende RT-PCR. En algunas realizaciones, la detección comprende RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un valor de Ct o un valor de ΔCt con un valor de Ct umbral o un valor de ΔCt . En algunas realizaciones, ΔCt es el valor de Ct para el control endógeno menos el valor de Ct para el marcador. En algunas realizaciones, la reacción de RT-PCR dura menos de tres horas o menos de 2 horas a partir de una etapa de desnaturalización inicial a través de un paso de extensión final.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el ARN de la muestra con un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcador del cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para la detección de CRH, un segundo par de cebadores para la detección de IGF2, un tercer par de cebadores para la detección de KRT20 y un cuarto par de cebadores para la detección de ANXA10. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 20, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 36, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el segundo par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 16 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 17, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el segundo par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 32 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 33, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 14, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 30, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 26 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 27, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 38 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 48 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el ARN de la muestra con un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcador del cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para la detección de CRH, un segundo par de cebadores para la detección de IGF2, un tercer par de cebadores para la detección de KRT20 y un cuarto par de cebadores

realizaciones, el par de cebadores de control endógeno comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 41 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 42, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, un método comprende poner en contacto el ARN de la muestra con un par de cebadores de control exógeno. En algunas de estas realizaciones, el par de cebadores de control exógeno es para detectar un ARN exógeno. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control exógeno comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 23 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 24, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores de control exógeno comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 44 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 45, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control exógeno comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 23 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 24, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control exógeno comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 44 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el método comprende la formación de un conjunto de amplicones de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de amplicones de marcadores de cáncer de vejiga consiste en un amplicón de CRH, un amplicón de IGF2, un amplicón de KRT20 y un amplicón de ANXA10, y poner en contacto los amplicones de marcadores de cáncer de vejiga con un conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga consiste en una primera sonda para detectar el amplicón de CRH, una segunda sonda para detectar el amplicón de IGF2, una tercera sonda para detectar el amplicón de KRT20 y una cuarta sonda para detectar el amplicón de ANXA10. En algunas realizaciones, la primera sonda comprende SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 37, en el que la primera sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda comprende la SEQ ID NO: 34 o la SEQ ID NO: 18, en el que la segunda sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la tercera sonda comprende la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 31, en el que la tercera sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la cuarta sonda comprende la SEQ ID NO: 28 o la SEQ ID NO: 40, en el que la cuarta sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la primera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 21 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 37, en el que la primera sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la segunda sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 34 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 18, en el que la segunda sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la tercera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 15 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 31, en el que la tercera sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la cuarta sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 28 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 40, en el que la cuarta sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada sonda marcador de cáncer de vejiga comprende un colorante, y en el que cada colorante se puede detectar de forma diferente de los otros tres marcadores. En algunas realizaciones, cada sonda marcador de cáncer de vejiga comprende un colorante fluorescente y una molécula inactivadora.

En algunas formas de realización, un método comprende la formación de un amplicón de control endógeno y poner

en contacto el amplicón de control endógeno con una sonda de control endógeno. En algunas realizaciones, la sonda de control endógeno comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 43, en el que la sonda de control endógeno tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda de control endógeno comprende un colorante que es detectablemente diferente de los colorantes de las sondas marcadoras de cáncer de vejiga.

En algunas formas de realización, un método comprende la formación de un amplicón de control exógeno y poner en contacto el amplicón de control exógeno con una sonda de control exógeno. En algunas realizaciones, la sonda de control exógeno comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 25 o 46, en el que la sonda de control exógeno tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda de control exógeno comprende un colorante que es detectablemente diferente de los colorantes de las sondas marcadoras de cáncer de vejiga y la sonda de control endógeno.

En algunas realizaciones, el conjunto de marcadores de cáncer de vejiga se detecta en una única reacción multiplex

En algunas realizaciones, la muestra comprende células uroteliales. En algunas realizaciones, la muestra se selecciona de una muestra de orina y una muestra de lavado vesical. En algunas realizaciones, el sujeto tiene antecedentes de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el sujeto está siendo controlado para detectar la recurrencia de cáncer de vejiga.

Se proporcionan composiciones. Específicamente, la invención proporciona una composición que comprende un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcador del cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para la detección de CRH, un segundo par de cebadores para la detección de IGF2, un tercer par de cebadores para la detección de KRT20 y un cuarto par de cebadores para la detección de ANXA10. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 20, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 36, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el segundo par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 16 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 17, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el segundo par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 32 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 33, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 14, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 30, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 26 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 27, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 38 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cuarto par de cebadores comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 48 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, una composición comprende un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcador del cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para la detección de CRH, un segundo par de cebadores para la detección de IGF2, un tercer par de cebadores para la detección de KRT20 y un cuarto par de cebadores para la detección de ANXA10. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 20, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el primer par de cebadores comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 36, en el que cada

ID NO: 31, en el que la tercera sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la cuarta sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 28 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 40, en el que la cuarta sonda tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada sonda marcador de cáncer de vejiga comprende un colorante, y en el que cada colorante se puede detectar de forma diferente de los otros tres marcadores. En algunas realizaciones, cada sonda marcador de cáncer de vejiga comprende un colorante fluorescente y una molécula inactivadora.

En algunas realizaciones, una composición comprende adicionalmente un par de cebadores de control endógeno para la detección de un control endógeno. En algunas realizaciones, el control endógeno se selecciona de ABL, GUSB, GAPDH, TUBB y UPk1. En algunas realizaciones, el control endógeno es ABL. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control endógeno comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 8 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 9, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, el tercer par de cebadores de control endógeno comprende un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 41 y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 42, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control endógeno comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 8 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 9, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el par de cebadores de control endógeno comprende un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 41 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, una composición comprende adicionalmente una sonda de control endógeno para la detección de un amplicón de control endógeno. En algunas realizaciones, el control endógeno se selecciona de ABL, GUSB, GAPDH, TUBB y UPk1. En algunas realizaciones, el control endógeno es ABL. En algunas realizaciones, la sonda de control endógeno comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 43, en el que la sonda de control endógeno tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la sonda de control endógeno comprende un colorante que es detectablemente diferente de los colorantes de las sondas marcadoras de cáncer de vejiga.

En algunas realizaciones, una composición es una composición liofilizada. En algunas realizaciones, la composición es una solución. En algunas realizaciones, la composición comprende además células uroteliales. En algunas realizaciones, las células uroteliales son de una muestra de orina.

A continuación se describen otras realizaciones y detalles de las invenciones.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

4.1 Definiciones

Para facilitar la comprensión de la presente invención, a continuación se definen una serie de términos y frases:

Tal como se usa en el presente documento, los términos "detectar", "que detecta" o "detección" pueden describir el acto general de descubrir o discernir o la observación específica de una composición marcada de forma detectable.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "diferente de forma detectable" se refiere a un conjunto de marcadores (tales como, colorantes) que puede usarse y distinguirse simultáneamente.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a un ser humano. Algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar en muestras de animales no humanos.

Tal como se usa en el presente documento, "cáncer de vejiga" es un tumor, tal como un carcinoma de células de transición, que surge del revestimiento de la vejiga e incluye los cánceres de vejiga de grado bajo y de grado alto, así como el cáncer de vejiga metastásico. "Cáncer de vejiga de grado bajo" se refiere a tumores superficiales que se proyectan al interior de la cavidad de la vejiga. Los cánceres de vejiga de grado bajo tienen una tasa de recurrencia

alta. "Cáncer de vejiga de grado alto" se refiere a un tumor invasivo y/o de crecimiento que invade la pared de la vejiga. Los cánceres de vejiga de grado alto tienen el potencial de diseminarse (es decir, metastatizar) a otras zonas del cuerpo. "Cáncer de vejiga metastático" se refiere al cáncer de vejiga invasivo que se ha diseminado a uno o más lugares en el cuerpo más allá de la vejiga.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "oligonucleótido", "polinucleótido", "molécula de ácido nucleico", y similares, se refieren a moléculas que contienen ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitaciones, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN, incluidos, entre otros, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-
10 (carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracil-5-
15 oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster etílico de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido monocatenario que tiene menos de 500 nucleótidos. En algunas realizaciones, un oligonucleótido tiene una longitud de 8 a 200, 8 a 100, 12 a 200, 12 a 100, 12 a 75 o 12 a 50 nucleótidos. También se puede hacer referencia a los oligonucleótidos por su longitud, por ejemplo, un oligonucleótido de 24 residuos puede denominarse un "24-mero."

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "complementario" de un ARN diana (u región diana del mismo) y el porcentaje de "complementariedad" de la secuencia de la sonda con la de la secuencia de ARN diana es el porcentaje de "identidad" con la secuencia de ARN diana o con el complementario inverso de la secuencia del ARN diana. En la determinación del grado de "complementariedad" entre las sondas usadas en las composiciones descritas en el presente documento (o regiones de las mismas) y un ARN diana, tales como las divulgadas en el presente documento, el grado de "complementariedad" se expresa como el porcentaje de identidad entre la
30 secuencia de la sonda (o una región de la misma) y la secuencia del ARN diana o la complementaria inversa de la secuencia del ARN diana que mejor se alinea con la misma. El porcentaje se calcula contando el número de bases alineadas que son idénticas entre las 2 secuencias, dividiendo por el número total de nucleótidos contiguos en la sonda, y multiplicando por 100. Cuando se utiliza el término "complementario", el oligonucleótido sujeto es al menos un 90 % complementaria de la molécula diana, a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, el oligonucleótido sujeto es al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos
35 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % complementaria de la molécula diana.

40 Un "cebador" o "sonda", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que comprende una región que es complementaria de una secuencia de al menos 8 nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico diana, tal como un ARNm o un ADN de transcripción inversa a partir de un ARNm. En algunas realizaciones, un cebador o sonda comprende una región que es complementaria de una secuencia de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, o al menos 30 nucleótidos contiguos de una molécula diana. Cuando un
45 cebador o sonda comprende una región que es "complementaria de al menos x nucleótidos contiguos de una molécula diana", el cebador o sonda es al menos 95 % complementaria de al menos x nucleótidos contiguos de la molécula diana. En algunas realizaciones, el cebador o la sonda es al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % complementaria de la molécula diana.

50 Una "muestra", tal como se usa en el presente documento, incluye muestras de orina (incluyendo muestras derivadas de las muestras de orina), y otros tipos de muestras humanas. Tal como se usa en el presente documento, las muestras de orina incluyen, pero no se limitan a, orina entera, una muestra que comprende células de una muestra de orina, una muestra que comprende el sedimento celular aislado por centrifugación de una muestra de orina, una muestra que comprende células aisladas por filtración de una muestra de orina, y similares.
55 En algunas realizaciones, una muestra de orina comprende un conservante, tal como un conservante que causa daños, tales como lisis, de los glóbulos rojos y/o blancos de la sangre. En algunas realizaciones, una muestra es una muestra humana que no sea una muestra de orina, tal como una muestra de tejido (incluyendo un tejido de la vejiga y/o muestra de tumor de vejiga), una muestra de sangre (incluyendo sangre entera, suero, plasma, etc.), etcétera En algunas realizaciones, una muestra es una muestra de lavado vesical.

60 Como se usa en el presente documento, "hormona liberadora de corticotropina" o "CRH" se refiere a un ARNm que codifica CRH, así como la proteína de CRH. En algunas realizaciones, CRH es CRH humana. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm de CRH humana se encuentran en n.º de acceso en GenBank NM_000756, y en la SEQ ID NO: 1.

65 Como se usa en el presente documento, "factor de crecimiento 2 similar a la insulina" o "IGF2" se refiere a un ARNm

que codifica "IGF2", así como la proteína IGF2. En algunas realizaciones, IGF2 es IGF2 humana. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm de IGF2 humana se muestran en las SEQ ID NO: 2 a 4.

5 Como se usa en el presente documento, "queratina 20" o "KRT20" se refiere a un ARNm que codifica KRT20, así como la proteína de KRT20. En algunas realizaciones, KRT20 es KRT20 humana. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm de KRT20 humana se encuentran en n.º de acceso en GenBank NM_019010 y en la SEQ ID NO: 5.

10 Como se usa en el presente documento, "anexina A10" o "ANXA10" se refiere a un ARNm que codifica ANXA10, así como la proteína de ANXA10. En algunas realizaciones, ANXA10 es ANXA10 humana. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm de ANXA10 humana se encuentran en n.º de acceso en GenBank NM_007193 y en la SEQ ID NO: 6.

15 Un "control endógeno," tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un resto que está naturalmente presente en la muestra que se va a utilizar para la detección y que se puede utilizar para normalizar los niveles de los marcadores de cáncer de vejiga descritos en el presente documento (incluyendo, pero sin limitaciones, CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10). Por lo tanto, un control endógeno es, típicamente, un resto que está presente a niveles similares de célula a célula, y a niveles similares en las células de los sujetos con cáncer de vejiga y las células de sujetos sin cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, un control endógeno es un ARN (tal como un ARNm, ARNt, ARN ribosómico, etc.). Ejemplos de controles endógenos no limitantes incluyen ARNm de ABL, ARNm de GUSB, ARNm de GAPDH, ARNm de TUBB y ARNm de UPK1a. Ejemplos no limitantes de secuencias de ARNm de ABL humana se encuentran en n.º de acceso en GenBank NM_007313y en la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, se selecciona un control endógeno que puede detectarse de la misma manera que se detectan los marcadores de cáncer de vejiga y, en algunas realizaciones, de forma simultánea con los marcadores de cáncer de vejiga.

25 Un "control exógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que se añade a una muestra para su uso para la detección. Un control exógeno se selecciona típicamente que no se espera que esté presente en la muestra que se va a usar para la detección, o está presente a niveles muy bajos en la muestra, de forma tal que la cantidad del resto presente de forma natural en la muestra es indetectable o es detectable a un nivel mucho más bajo que la cantidad añadida a la muestra como un control exógeno. En algunas realizaciones, un control exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que no se espera que esté presente en el tipo de muestra utilizada para la detección de los marcadores de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, un control exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que no se sabe que está presente en la especie de la que se toma la muestra. En algunas realizaciones, un control exógeno comprende una secuencia de nucleótidos de una especie diferente de la del sujeto del que se tomó la muestra. En algunas realizaciones, un control exógeno comprende una secuencia de nucleótidos que no se sabe que está presente en ninguna especie. En algunas realizaciones, se selecciona un control exógeno que puede detectarse de la misma manera que se detectan los marcadores de cáncer de vejiga y, en algunas realizaciones, de forma simultánea con los marcadores de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, un control exógeno es un ARN. En algunas realizaciones, un ARN es un Armored RNA[®], que comprende ARN empaquetado en una capa protectora de bacteriófago. Véase, por ejemplo, WalkerPeach et al., Clin. Chem. 45:12: 2079–2085 (1999).

45 En las secuencias de la presente memoria, "U" y "T" se utilizan indistintamente, de manera que ambas letras indican un uracilo o timina en esa posición. Un experto en la materia entenderá a partir del contexto y/o uso proyectado si un uracilo o timina está destinado y/o debe utilizarse en esa posición en la secuencia. Por ejemplo, un experto en la materia entenderá que las moléculas de ARN nativas incluyen típicamente uracilo, mientras que las moléculas de ADN nativas incluyen típicamente timina. Por tanto, cuando una secuencia de ARN incluye "T", un experto en la materia entenderá que la que la posición en el ARN nativo es, probablemente, un uracilo.

50 En la presente descripción, "una secuencia seleccionada de" abarca tanto "una secuencia seleccionada de" como "una o más secuencias seleccionadas de". Por lo tanto, cuando se utiliza "una secuencia seleccionada de", debe entenderse que se puede elegir una, o más de una, de las secuencias enumeradas.

55 En la presente descripción, un método que comprende la detección de un "un conjunto de marcadores de cáncer de vejiga que consiste en..." implica la detección de solo los marcadores de cáncer de vejiga del conjunto y no cualquier marcador adicional de cáncer de vejiga. El método puede comprender componentes o etapas adicionales, sin embargo, tales como la detección de controles endógenos y/o exógenos. Del mismo modo, un método o una composición que comprende "un conjunto de pares de cebadores marcadores de cáncer de vejiga" y/o "un conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga" puede incluir pares de cebadores y/o sondas para solo los marcadores de cáncer de vejiga del conjunto y no para otros marcadores de cáncer de vejiga. El método o composición puede comprender componentes adicionales, sin embargo, tales como uno o más pares de cebadores de control endógeno y/o uno o más pares de cebadores de control exógeno.

65 4.2 Detección de cáncer de vejiga

Los presentes inventores han desarrollado un ensayo para la detección de cáncer de vejiga que implica la detección

de solo cuatro marcadores, CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 (más uno o dos controles). Los ensayos descritos en el presente documento tienen varias ventajas sobre los diagnósticos existentes y descritos anteriormente para el cáncer de vejiga. Por ejemplo, los presentes ensayos no se basan en la citología, que puede ser costoso y requiere técnicos de citología capacitados para la correcta interpretación de los resultados. En cambio, los presentes ensayos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pueden llevarse a cabo de una manera sustancialmente automática, por ejemplo, utilizando el sistema GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA). Mengual et al., Clin Cancer Res (2010) 16: 2624–2633, describieron recientemente una "firma de expresión génica 12 + 2", que detecta de 12 a 14 genes en un formato de matriz. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que una firma mucho más pequeña, de solo cuatro marcadores (más uno o dos controles), es suficiente para proporcionar una sensibilidad y/o especificidad equivalentes o mejores sobre los ensayos de diagnóstico existentes para el cáncer de vejiga, incluyendo el de Mengual et al. Además, debido a que los presentes ensayos utilizan solo cuatro marcadores (más uno o dos controles), que se pueden llevar a cabo en una sola mezcla de reacción, utilizando de 4 a 6 colorantes detectablemente diferentes, tales como colorantes fluorescentes. Los presentes ensayos se pueden realizar en menos de 3 horas y, en algunas realizaciones, en menos de 2 horas, utilizando un sistema automatizado, por ejemplo, el sistema GeneXpert®. Las pruebas existentes pueden requerir varios días para que un laboratorio las realice y envíe los resultados. Además, el presente ensayo puede llevarse a cabo en volúmenes de orina mucho más pequeños (en algunas realizaciones, 5 ml o menos). Por lo tanto, los presentes ensayos, que se basan en la PCR de solo cuatro marcadores (más uno o dos controles) en lugar de en la citología, permite una reacción rápida de un solo recipiente para el diagnóstico del cáncer de vejiga, que, en muchos casos, se puede llevar a cabo a la punto de atención usando un sistema automatizado tal como GeneXpert®.

4.2.1 Métodos generales

Se proporcionan composiciones y métodos para detectar el cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos para detectar el cáncer de vejiga de grado bajo. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos para detectar el cáncer de vejiga de grado alto. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones y métodos para controlar la recurrencia del cáncer de vejiga.

El método de detección de cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en ARNm de CRH, ARNm de IGF2, ARNm de KRT20 y ARNm de ANXA10. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un control endógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un control endógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un control endógeno y al menos un control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, al menos un control endógeno y al menos un control exógeno.

En algunas realizaciones, un método de detección de cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en ARNm de CRH, ARNm de IGF2, ARNm de KRT20 y ARNm de ANXA10. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un ARN de control endógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un ARN de control endógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un ARN de control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un ARN de control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y al menos un ARN de control endógeno y al menos un ARN de control exógeno. En algunas realizaciones, un método para detectar el cáncer de vejiga comprende detectar los niveles de un conjunto de marcadores que consisten en ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, al menos un ARN de control endógeno y al menos un ARN de control exógeno.

En la presente divulgación, la expresión "ARN diana" se utiliza por comodidad para referirse a los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y también a otros ARN diana, tales como ARN de control exógeno y/o endógeno. Por lo tanto, ha de entenderse que cuando se presenta una discusión en términos de un ARN diana, que la discusión está específicamente destinada a abarcar ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 y/u otros ARN diana.

En algunas realizaciones, el nivel de uno o más ARN diana se detecta en una muestra de orina. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más ARN diana se determina en una muestra de orina que se ha conservado de una manera que causa daños, tales como lisis, a los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos de la sangre. En algunas realizaciones, el nivel de uno o más ARN diana se detecta en las células uroteliales aisladas de una muestra de

orina, ya sea con o sin tratamiento conservante. En algunas realizaciones, las células uroteliales se aíslan por filtración.

5 La detección de un nivel elevado de uno o más ARN diana seleccionados de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en una muestra de un sujeto indica la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto. En algunas realizaciones, la detección se realiza cuantitativamente. En algunas realizaciones, la detección se realiza cualitativamente. En algunas realizaciones, la detección de un ARN diana comprende la formación de un complejo que comprende un polinucleótido y un ácido nucleico seleccionado de un ARN diana, un amplicón de ADN de un ARN diana y un complementario de un ARN diana. En algunas realizaciones, la detección de un ARN diana comprende RT-PCR. En algunas realizaciones, la detección de un ARN diana comprende RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, el nivel del ARN diana se compara con un nivel normal o de control del ARN diana.

15 En algunas realizaciones, los niveles de ARN diana, tales como de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, se puede medir en muestras recogidas una o más veces de un paciente para controlar el estado o la progresión del cáncer de vejiga en el paciente. En algunas realizaciones, un paciente con antecedentes de cáncer de vejiga, tal como antecedentes de cáncer de vejiga de grado bajo o antecedentes de cáncer de vejiga de grado alto, se controla mediante la detección de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 a intervalos regulares o semiregulares. En algunas de tales realizaciones, el paciente se controla mediante la detección de los niveles de los ARN diana al menos una vez al mes, al lo menos una vez cada dos meses, al lo menos una vez cada tres meses, al lo menos una vez cada cuatro meses, al menos una vez cada cinco meses, al menos una vez cada seis meses, al menos una vez cada nueve meses, al menos una vez al año o por lo menos una vez cada dos años

25 En algunas realizaciones, una muestra que se va a analizar es una muestra de orina (tal como, una muestra de orina espontánea), o deriva de una muestra de orina. En algunas formas de realización, se añade un conservante a la muestra de orina, por ejemplo, para dañar (por ejemplo, lisar), los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos presentes en la muestra de orina. Por dañar o lisar los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos antes de aislar las células uroteliales, la contaminación por los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos puede reducirse. En algunas realizaciones, la muestra de orina se centrifuga para concentrar las células uroteliales. En algunas realizaciones, la muestra de orina se filtra para aislar las células uroteliales de otros materiales de orina y conservantes. En algunas de tales realizaciones, el filtro es parte de un cartucho de GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA).

35 En algunas realizaciones, se utilizan menos de 5 ml, menos de 4 ml, menos de 3 ml o menos de 2 ml de orina en los presentes métodos. En algunas realizaciones, la muestra de orina se analiza sin una etapa de centrifugación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los presentes métodos se llevan a cabo en ausencia de centrifugación. En algunas realizaciones, se puede usar un mayor volumen de orina y, en algunas de tales realizaciones, se puede usar una etapa de centrifugación para concentrar las células uroteliales antes del análisis.

40 En algunas realizaciones, la muestra que se va a analizar es otro fluido corporal, tal como sangre, esputo, moco, saliva, semen, etc. En algunas realizaciones, una muestra que se va a analizar es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la muestra de sangre es sangre entera. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, la muestra de sangre es plasma. En algunas realizaciones, la muestra de sangre es suero.

45 La muestra clínica que se va a analizar es, en algunas realizaciones, fresca (es decir, nunca se ha congelado). En otras realizaciones, la muestra es un espécimen congelado. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tejido, tal como una muestra embebida fijado con formalina. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de citología líquida.

50 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para la detección precoz del cáncer de vejiga en una muestra de células uroteliales, tales como los obtenidos de la orina miccionada. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para controlar la recurrencia del cáncer de vejiga usando una muestra de células uroteliales, tales como los obtenidos de la orina miccionada.

55 En algunas realizaciones, la muestra que se va a analizar se obtiene de un individuo que tiene uno o más de los siguientes factores de riesgo: antecedentes de tabaquismo, hematuria, antecedentes de cáncer de vejiga o de otros tipos de cáncer y exposición a agentes carcinógenos conocidos, tales como el benceno. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene de un individuo que tiene signos diagnósticos o síntomas clínicos que pueden estar asociados con el cáncer de vejiga, tal como sangre en la orina, micción frecuente, urgencia urinaria, incontinencia, dificultad para orinar, dolor abdominal, pérdida de peso sin explicación y/o pérdida de apetito. En algunas realizaciones, la muestra que se va a analizar se obtiene de un individuo que ha sido previamente diagnosticado con cáncer de vejiga de grado bajo o de grado alto. En algunas realizaciones, el individuo está siendo controlando para detectar la recurrencia del cáncer de vejiga.

65 El cáncer de vejiga se puede dividir en etapas, que indican el patrón de crecimiento del tumor primario. En la tabla A se muestran las etapas del cáncer de vejiga, según el Comité Conjunto sobre el Cáncer (AJCC). Las etapas mostradas solo cubren la parte de "T" del sistema "TNM". La parte de "T" se refiere al tumor primario, mientras que

"N" se refiere a la propagación del cáncer a los ganglios linfáticos y "M" se refiere a si el cáncer ha producido metástasis en sitios distantes.

Tabla A: Estadios del cáncer de vejiga

Estadio	descripción
T0	No hay evidencia de tumor primario
Ta	Carcinoma papilar no invasivo
Tis/CIS	Carcinoma plano no invasivo (carcinoma <i>in situ</i>)
T1	Tumor ha crecido desde el revestimiento de la vejiga hacia el tejido conectivo, pero no ha crecido hasta la capa muscular de la vejiga
T2	El tumor ha crecido hacia la capa muscular
T2a	El tumor ha crecido hacia la mitad interior de la capa muscular
T2b	El tumor ha crecido hacia la mitad exterior de la capa muscular
T3	El tumor ha crecido a través de la capa muscular de la vejiga y hacia el tejido adiposo que lo rodea
T3a	La propagación del tumor hacia el tejido graso solo puede verse con un microscopio
T3b	La propagación del tumor hacia el tejido graso se puede ver en las pruebas de imagen o lo puede ver o sentir el cirujano
T4	El tumor se ha diseminado más allá del tejido graso a órganos o estructuras cercanas
T4a	El tumor se ha diseminado al estroma de la próstata o al útero y/o la vagina
T4b	El tumor se ha diseminado a la pared pélvica o a la pared abdominal

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para el cribado de rutina de individuos sanos sin factores de riesgo. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se utilizan para cribar individuos asintomáticos que tienen uno o más de los factores de riesgo descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar el cáncer de vejiga de grado bajo. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para detectar el cáncer de vejiga de grado alto. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento detectan al menos el 15 %, al menos el 17 %, al menos el 20 %, al menos el 22 %, al menos el 25 %, al menos el 27 %, al menos el 30 %, al menos el 31 %, al menos el 32 %, al menos el 33 %, al menos el 34 % o al menos el 35 % de los cánceres de vejiga de grado bajo. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento detectan al menos el 85 %, al menos el 87 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de los cánceres de vejiga de grado alto.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar para evaluar la eficacia de un tratamiento para el cáncer de vejiga en un paciente. En algunas realizaciones, los niveles de ARN diana, tales como los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, se determinan en varios momentos durante el tratamiento y se comparan con los niveles de ARN diana de una muestra de archivo tomada del paciente antes del comienzo de tratamiento. En algunas realizaciones, los niveles de ARN diana se comparan con los niveles de ARN diana de una muestra normal de archivo tomada del paciente. Idealmente, los niveles de ARN diana en la muestra normal no ponen de manifiesto cambios aberrantes en los niveles de ARN diana.

En algunas realizaciones, se proporciona el uso de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 para el control de la recurrencia del cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, un nivel elevado de uno o más, dos o más, tres o más, o los cuatro ARNm indica que el cáncer de vejiga ha recurrido en el paciente.

En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, los niveles de ARN se pueden detectar de forma concurrente o simultánea en la misma reacción de ensayo o en reacciones de ensayo diferentes. En algunas realizaciones, los niveles de ARN se detectan a diferentes momentos, por ejemplo en reacciones de ensayo en serie.

El método proporcionado comprende detectar el nivel de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en una muestra de un sujeto, en el que la detección de un nivel de uno cualquiera de los cuatro ARNm que es mayor que un nivel normal del ARN indica la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto. En algunas realizaciones, la detección de niveles elevados de dos, tres, o cuatro ARNm marcadores de cáncer de vejiga indica la presencia de cáncer de

vejiga en el sujeto. En algunas realizaciones, la detección de niveles elevados de al menos dos, al menos tres o los cuatro ARNm marcadores de cáncer de vejiga indica un mayor riesgo de cáncer de vejiga de grado alto.

5 También se divulga un método para facilitar el diagnóstico de cáncer de vejiga en un sujeto. Tales métodos comprenden la detección de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en una muestra del sujeto. En algunas realizaciones, la información relativa a los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y/o ANXA10 en la muestra del sujeto se comunica a un médico. Un "médico", como se usa en el presente documento, se refiere a un individuo o entidad que diagnostica y/o trata a los pacientes, tales como un hospital, una clínica, un consultorio médico, un médico, una enfermera, o un agente de cualquiera de las entidades e individuos mencionados anteriormente. En algunas realizaciones, la detección de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 se lleva a cabo en un laboratorio que ha recibido la muestra del sujeto del médico o el agente del médico. El laboratorio lleva a cabo la detección mediante cualquier método, incluyendo los descritos en el presente documento, y luego comunica los resultados al médico. Un resultado se "comunica", tal como se usa en el presente documento, cuando se proporciona por cualquier medio para el médico. En algunas realizaciones, dicha comunicación puede ser oral o escrita, puede ser por teléfono, en persona, por correo electrónico, por correo postal u otro servicio de mensajería, o puede realizarse depositando directamente la información en, por ejemplo, una base de datos accesible por el médico, incluyendo las bases de datos no controladas por el médico. En algunas realizaciones, la información se mantiene en forma electrónica. En algunas realizaciones, la información se puede almacenar en una memoria u otro medio legible por ordenador, tal como RAM, ROM, EEPROM, memoria flash, circuitos de ordenador, discos de vídeo digital (DVD), discos compactos (CD), unidades de disco duro (HDD), cinta magnética, etc.

25 Se proporcionan métodos para detectar la presencia de cáncer de vejiga. En algunas formas de realización, se proporcionan métodos de diagnóstico de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el método comprende obtener una muestra de un sujeto y proporcionar la muestra a un laboratorio para la detección de niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en la muestra. En algunas realizaciones, el método comprende además la recepción de una comunicación desde el laboratorio que indica el nivel de al menos un ARN seleccionado de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en la muestra. El cáncer de vejiga está presente si el nivel de uno cualquiera de los cuatro ARNm es mayor que un nivel normal o de control del ARNm. A "laboratorio", tal como se usa en el presente documento, es cualquier instalación que detecta los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 en una muestra mediante cualquier método, incluyendo los métodos descritos en el presente documento, y se comunica el nivel a un médico. En algunas realizaciones, un laboratorio está bajo el control de un médico. En algunas realizaciones, un laboratorio no está bajo el control del médico.

35 Cuando un laboratorio comunica el nivel de al menos un ARN seleccionado de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 a un médico, en algunas realizaciones, el laboratorio se comunica un valor numérico que representa el nivel del ARN en la muestra, proporcionando o sin proporcionar un valor numérico para un nivel normal. En algunas realizaciones, el laboratorio comunica el nivel del ARN, proporcionando un valor cualitativo, tal como "alto", "bajo", "elevada", "disminuido", "positivo" (tal como "positivo para CRH" o "positivo para CRH y KRT20"), etc. En algunas realizaciones, el laboratorio comunica un diagnóstico sugerido, tal como "positivo para cáncer de vejiga" o "positivo para el cáncer", y similares; o simplemente "positivo para cáncer" o "negativo para cáncer".

45 Tal como se usa en el presente documento, cuando un método se refiere a la detección de cáncer de vejiga, la determinación de la presencia de cáncer de vejiga, el seguimiento del cáncer de vejiga y/o el diagnóstico de cáncer de vejiga, el método incluye actividades en las que se llevan a cabo las etapas del método, pero el resultado es negativo para la presencia de cáncer de vejiga. Es decir, la detección, determinación, seguimiento y diagnóstico del cáncer de vejiga incluyen los casos de la realización de los métodos que dan lugar a cualquiera de los resultados positivos o negativos.

50 En algunas realizaciones, más de un ARN se detecta simultáneamente en una sola reacción. En algunas realizaciones, los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 se detectan simultáneamente en una sola reacción. En algunas realizaciones, los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 y al menos un control endógeno y/o al menos un control exógeno se detectan simultáneamente en una sola reacción. En algunas realizaciones, los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y un control endógeno y un control exógeno se detectan simultáneamente en una sola reacción.

55 4.2.2. Controles de ejemplo

60 En algunas realizaciones, un nivel normal (un "control") de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10 se puede determinar como un nivel o intervalo promedio o rango que es característico de las células uroteliales normales u otro material de referencia, contra el que se puede comparar el nivel medido en la muestra. El promedio o intervalo determinado de un ARN diana en sujetos normales se pueden utilizar como punto de referencia para la detección de niveles superiores a lo normal del ARN diana que son indicativos de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, los niveles normales de un ARN diana se pueden determinar a partir de muestras individuales o agrupadas que contienen ARN de uno o más individuos, tales como de células uroteliales normales aisladas de la orina de individuos sanos.

- En algunas realizaciones, la determinación de un nivel normal de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, comprende detectar un complejo que comprende un polinucleótido para detección hibridado con un ácido nucleico seleccionado de un ARN diana, un amplicón de ADN del ARN diana y un complementario del ARN diana. Es decir, en algunas realizaciones, un nivel normal se puede determinar mediante la detección de un amplicón de ADN del ARN diana o un complementario del ARN diana en lugar del ARN diana en sí. En algunas realizaciones, se determina un nivel normal de tal complejo y se utiliza como control. El nivel normal del complejo, en algunas realizaciones, se correlaciona con el nivel normal del ARN diana. Por lo tanto, cuando un nivel normal de una diana se discute en el presente documento, dicho nivel puede, en algunas realizaciones, determinarse mediante la detección de dicho complejo.
- En algunas realizaciones, un nivel normal de un ARN diana se determinado, o se ha determinado, mediante el mismo método que el nivel del ARN diana de una muestra del paciente. En algunas de tales realizaciones, el método es RT-PCR (tal como, RT-PCR en tiempo real, RT-PCR cuantitativa, etc.).
- En algunas realizaciones, un control comprende ARN de las células de un solo individuo, por ejemplo, de células uroteliales normales aisladas de la orina de un individuo sano. En algunas realizaciones, un control comprende ARN de sangre, tal como de sangre entera o suero, de un solo individuo. En algunas realizaciones, un control comprende ARN de un grupo de células de varios individuos. En algunas realizaciones, un control comprende ARN de un grupo de orina de varios individuos. En algunas realizaciones, un control comprende ARN humano comercialmente disponible (véase, por ejemplo, Ambion). En algunas realizaciones, un nivel normal o intervalo normal ya se ha predeterminado antes de analizar una muestra para determinar un nivel elevado.
- En algunas realizaciones, el nivel normal de un ARN diana puede determinarse a partir de una o más líneas celulares continuas, típicamente líneas celulares que previamente se ha demostrado que tienen niveles de ARN que se aproximan a los niveles en las células uroteliales normales.
- En algunas realizaciones, la cuantificación de los niveles de ARN diana requiere realizar suposiciones sobre el ARN total por célula y el grado de pérdida de la muestra durante la preparación de la muestra. Con el fin de corregir las diferencias entre las diferentes muestras o entre las muestras que se preparan en condiciones diferentes, las cantidades de ARN diana en algunas realizaciones se normalizan hasta los niveles de al menos un control endógeno y/o al menos un control exógeno.
- En algunas realizaciones, un ARN de control es un ARN de control endógeno. Un ARN de control endógeno puede ser cualquier ARN adecuado para el propósito, por ejemplo, los ARN que se encuentran presentes a niveles aproximadamente constantes de célula a célula y en las células uroteliales, tanto de pacientes con cáncer de vejiga como de pacientes sin cáncer de vejiga. Entre los ejemplos no limitantes de ARN de control endógeno se incluyen ABL, GUSB, GAPDH, TUBB y UPK1a. En algunas realizaciones, se usa un control endógeno para la normalización. En algunas realizaciones, se usa más de un control endógeno para la normalización.
- En algunas realizaciones, los niveles de ARNm diana, tal como los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 se normalizan con respecto a un ARN de control endógeno. La normalización puede comprender, por ejemplo, la determinación de la diferencia del nivel del ARN diana con respecto al nivel del ARN de control endógeno. En algunas de tales realizaciones, el nivel de los ARN está representado por un valor Ct obtenido de la PCR cuantitativa. En algunas de tales realizaciones, la diferencia se expresa como ΔCt . El ΔCt se puede calcular como $Ct [ARN\ diana] - Ct [control\ endógeno]$ o $Ct[control\ endógeno] - Ct [ARN\ diana]$. En determinadas realizaciones, $\Delta Ct = Ct [control\ endógeno] - Ct [marcador]$. En algunas realizaciones, se establece un valor de ΔCt umbral, por encima o por debajo del cual indica cáncer de vejiga. En algunas de tales realizaciones, el ΔCt umbral se establece como el valor de ΔCt por debajo del cual el 95 % de las muestras normales se caracterizan correctamente. En algunas de tales realizaciones, un valor de ΔCt que es mayor que el valor de ΔCt umbral es indicativo de cáncer de vejiga.
- En algunas realizaciones, se utiliza análisis discriminante lineal (LDA), por ejemplo, para combinar dos o más de los marcadores en una sola escala combinada. En algunas de tales realizaciones, se utiliza un solo valor umbral para los marcadores incluidos en el LDA.
- En algunas realizaciones, un ARN de control es un ARN de control exógeno. En algunas de tales realizaciones, el ARN de control exógeno es un Armored RNA[®], que está protegido por una cubierta de bacteriófago. Un ARN de control exógeno puede utilizarse, en algunas realizaciones, para determinar si la reacción del ensayo de detección ha fallado y, por lo tanto, los resultados no son significativos. Por ejemplo, si un ARN de control exógeno no se amplifica en la reacción de ensayo, es probable que un resultado negativo para los ARN diana no sea significativo porque los niveles reflejan la reacción que falla en lugar de niveles de ARN diana bajos. El fallo de la reacción se puede producir por una serie de razones, incluyendo, pero sin limitaciones, la presencia de un inhibidor de la reacción en la muestra (una "muestra inhibidora"), reactivos comprometidos, la presencia de una ARNasa, etc. Se puede añadir un control de ARN exógeno en cualquier etapa de la recolección y análisis de muestras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARN de control exógeno se añade a la muestra al mismo tiempo que se añade el conservante, se añade a la muestra cuando es recibido por el laboratorio de diagnóstico, se añade a la muestra inmediatamente antes del análisis o se añade a la muestra durante el análisis (como un ejemplo no limitativo,

durante o después de la lisis de las células uroteliales, pero antes de la adición de los reactivos de amplificación).

5 En algunas realizaciones, el nivel de un ARN diana, tal como, por ejemplo, ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, se compara con un nivel de referencia, por ejemplo, de un cáncer de vejiga confirmado. En algunas de tales realizaciones, un nivel similar de un ARN diana en relación con la muestra de referencia indica cáncer de vejiga.

10 En algunas realizaciones, un nivel de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, que es al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % mayor que un nivel normal del ARN diana respectivo indica la presencia de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, un nivel de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, que es al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces o al menos aproximadamente 10 veces mayor que un nivel normal del ARN diana respectivo indica la presencia de cáncer de vejiga.

15 En algunas realizaciones, un nivel control de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, se determina simultáneamente, tal como en el mismo ensayo o lote de ensayos, como el nivel del ARN diana en una muestra. En algunas realizaciones, un nivel control de un ARN diana no se determina simultáneamente como el nivel del ARN diana en una muestra. En algunas de tales realizaciones, el nivel control se ha determinado previamente.

20 En algunas realizaciones, el nivel de un control endógeno y/o un control exógeno se determina simultáneamente, tal como en el mismo ensayo o lote de ensayos, como el nivel del ARN diana en una muestra. En algunas realizaciones, un ensayo comprende los reactivos para la determinación de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y un control endógeno simultáneamente en la misma reacción de ensayo. En algunas realizaciones, un ensayo comprende los reactivos para la determinación de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y un control exógeno simultáneamente en la misma reacción de ensayo. En algunas realizaciones, un ensayo comprende los reactivos para la determinación de los niveles de ARNm de CRH, IGF2, KRT20, ANXA10, un control endógeno y un control exógeno simultáneamente en la misma reacción de ensayo. En algunas de tales realizaciones, por ejemplo, una reacción de ensayo comprende conjuntos de cebadores para amplificar cada uno de los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, un conjunto de cebadores para amplificar un control endógeno y/o un conjunto de cebadores para amplificar un control exógeno, y sondas marcadas diferentes de forma detectable para detectar los productos de amplificación (tales como, por ejemplo, sondas TaqMan® con colorantes diferentes de forma detectable para cada amplicón que se va a detectar).

35 En algunas realizaciones, el nivel de un ARN diana no se compara con un nivel control, por ejemplo, cuando se sabe que el ARN diana está presente a niveles muy bajos, o nada en absoluto, en las células normales. En tales realizaciones, la detección de un nivel alto del ARN diana en una muestra es indicativa de cáncer de vejiga.

4.2.3. Preparación de muestras de ejemplo

4.2.3.1. Conservantes de orina de ejemplo

45 En algunas realizaciones, se añade un conservante para la muestra de orina. En algunas realizaciones, el conservante se añade en un plazo de una hora, dos horas, tres horas o seis horas desde el momento en que se recogió la muestra de orina (por ejemplo, miccionada). En algunas realizaciones, se añade un conservante a la muestra de orina en un plazo de una hora, dos horas, tres horas o seis horas antes de analizar la muestra mediante los métodos descritos en el presente documento.

50 En algunas realizaciones, un conservante causa daños, tales como lisis, de los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos, pero no daña las células uroteliales. Los glóbulos rojos y/o los glóbulos blancos pueden estar presentes en la orina como resultado de un tumor y/o infección. En algunas de tales realizaciones, la adición del conservante permite mejorar el enriquecimiento de las células uroteliales, por ejemplo mediante filtración. En algunas realizaciones, un conservante disminuye el pH de la muestra de orina y mejora la solubilidad de las sales de orina. En algunas de tales realizaciones, el conservante facilita el paso de las sales a través de un filtro en una etapa de filtración. Un pH deseable de la orina conservada para su paso a través de un filtro está entre aproximadamente 2,5 y 4. En algunas realizaciones, un pH deseable de orina conservado está entre aproximadamente 2,7 y 3,7. En algunas realizaciones, un pH deseable de orina conservado está entre aproximadamente 3 y 3,5. En algunas realizaciones, un pH deseable de orina conservado es de aproximadamente 3,2.

60 En algunas realizaciones se añade un conservante tal que la muestra de orina/conservante comprende de hidrocloreuro de guanidina 0,875 M a 2,625M, de 0,25 % a 0,75 % de N-acetil-L-cisteína, citrato de sodio de 6,25 a 18,75 mM, y de 0,625 % a 1,875 % de Tween-20 y tiene un pH de 3 a 3,5. En algunas realizaciones se añade un conservante de forma que la muestra de orina/conservante comprende aproximadamente hidrocloreuro de guanidina 1,75 M, aproximadamente 0,5% de N-acetil-L-cisteína, citrato de sodio a aproximadamente 12,5 mM y 65 aproximadamente 1,25 % de Tween-20 y tiene un pH de aproximadamente 3,2.

Un ejemplo no limitante de conservante comercial es PreservCyt (Hologic, Bedford, MA).

4.2.3.2. Enriquecimiento celular de ejemplo

5 En algunas realizaciones, las células uroteliales se enriquecen mediante centrifugación. En algunas de tales realizaciones, el sedimento celular se resuspende en el sobrenadante y/o un conservante. La resuspensión del sedimento celular se puede utilizar para ajustar la concentración de las células en solución. El sedimento celular resuspendido puede utilizarse (por ejemplo, con lisis) en los métodos descritos en el presente documento, o puede someterse a una etapa de enriquecimiento adicional, tal como filtración.

10 En algunas realizaciones, las células uroteliales se enriquecen mediante filtración. Ejemplos no limitantes de tamaños de poro del filtro que pueden ser adecuados para la captura de células uroteliales incluyen 0,8 µm, 2 µm, 8 µm y 10 µm. En algunas realizaciones, se selecciona un tamaño de poro de filtro que permite de paso a su través de glóbulos rojos y/o de glóbulos blancos, al tiempo que retiene la mayoría de las células uroteliales. En algunas realizaciones, un filtro se coloca dentro de un cartucho GeneXpert diseñado para llevar a cabo un ensayo de diagnóstico del cáncer de vejiga descrito en el presente documento.

4.2.3.3. Preparación de ARNm de ejemplo

20 El ARN diana se puede preparar por cualquier método apropiado. El ARN total se puede aislar mediante cualquier método, incluyendo, pero sin limitaciones, los protocolos establecidos en Wilkinson, M. (1988) Nucl. Acids Res. 16(22):10.933; y Wilkinson, M. (1988) Nucl. Acids Res. 16(22): 10934, o mediante el uso de kits y reactivos comercialmente disponibles, tales como el reactivo TRIzol® (Invitrogen), el kit de extracción de ARN total (iNtRON Biotechnology), el kit de purificación de ARN total (Norgen Biotek Corp.), RNAqueous™ (Ambion), MagMAX™ (Ambion), RecoverAll™ (Ambion), RNeasy (Qiagen), etc.

30 En algunas realizaciones, los niveles de ARN se miden en una muestra en la que el ARN no se ha purificado primero a partir de las células. En algunas de tales realizaciones, las células se someten a una etapa de lisis para liberar el ARN. Entre los ejemplos no limitantes de métodos de lisis se incluyen sonicación (por ejemplo, por 2-15 segundos, 8–18 µm, con 36 kHz); lisis química, por ejemplo, usando un detergente; y diversos reactivos de lisis disponibles comercialmente (tal como el tampón de lisis RNeasy, Qiagen). En algunas realizaciones, los niveles de ARN se miden en una muestra en la que se ha aislado ARN.

35 En algunas realizaciones, el ARN se modifica antes de detectar un ARN diana, tal como el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas realizaciones, se modifica todo el ARN en la muestra. En algunas realizaciones, solo se modifican los ARN diana concretos que se van a analizar, por ejemplo, de una manera específica de secuencia. En algunas realizaciones, el ARN sufre transcripción inversa. En algunas de tales realizaciones, el ARN se somete a transcripción inversa utilizando transcriptasa inversa del MMLV. Entre los ejemplos no limitantes de las condiciones para la transcripción inversa del RN utilizando transcriptasa inversa del MMLV se incluyen incubación de 5 a 20 minutos a de 40 °C a 50 °C.

45 Cuando un ARN diana se somete a transcripción inversa se forma un ADN complementario del ARN diana. En algunas realizaciones, se detecta el complementario de un ARN diana en lugar del propio ARN diana (o una copia de ADN del propio ARN). Por lo tanto, cuando los métodos tratados en el presente documento indican que se detecta un ARN diana, o se determina el nivel de un ARN diana, tal detección o determinación puede llevarse a cabo en un complementario de un ARN diana en lugar de, o además de, el propio ARN diana. En algunas realizaciones, cuando se detecta el complementario de un ARN diana en lugar del propio ARN diana, se utiliza un polinucleótido para la detección que es complementario al complementario del ARN diana. En algunas de tales realizaciones, un polinucleótido para detección comprende al menos una parte que tiene una secuencia idéntica a la del ARN diana, aunque puede contener timidina en lugar de uridina y/o comprender otros nucleótidos modificados.

4.2.4. Métodos analíticos de ejemplo

55 Como se ha descrito anteriormente, se presentan, métodos para la detección de cáncer de vejiga. Los métodos comprenden la detección de un panel de marcadores de cáncer de vejiga que consiste en CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, y que incluye, opcionalmente, al menos un control endógeno y/o al menos un control exógeno. En algunas realizaciones, la detección de un nivel elevado de uno de los cuatro marcadores de cáncer de vejiga indica la presencia de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, la detección de un nivel elevado de dos, tres o los cuatro marcadores de cáncer de vejiga indica la presencia de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es cáncer de vejiga de grado bajo. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es cáncer de vejiga de grado alto. En algunas realizaciones, el cáncer de vejiga es una recurrencia de cáncer de vejiga en un paciente con antecedentes de cáncer de vejiga.

65 Se puede utilizar cualquier procedimiento analítico capaz de permitir la detección específica y cuantificable (o semicuantificable) de un ARN diana, tal como los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, en los métodos presentados en el presente documento. Tales métodos analíticos incluyen, pero no se limitan a, métodos de RT-

PCR y otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, el método de detección de un ARN diana, tal como los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10, comprende la amplificación de ADNc complementario al ARN diana. Tal amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método. Entre los métodos de ejemplo se incluyen, pero sin limitaciones, PCR en tiempo real, PCR de punto final y amplificación usando polimerasa de T7 a partir de un promotor de T7 hibridado a un ADNc, tal como el proporcionado por el Kit SenseAmp Plus™ disponible en Implen, Alemania.

Cuando se amplifica un ARN diana o un ADNc complementario de un ARN diana, en algunas realizaciones se forma un amplicón de ADN del ARN diana. Un amplicón de ADN puede ser monocatenario o bicatenario. En algunas realizaciones, cuando un amplicón de ADN es monocatenario, la secuencia del amplicón de ADN está relacionada con el ARN diana, ya sea en orientación sentido o en orientación antisentido. En algunas realizaciones, se detecta un amplicón de ADN de un ARN diana en lugar del propio ARN diana. Por lo tanto, cuando los métodos tratados en el presente documento indican que se detecta un ARN diana, o se determina el nivel de un ARN diana, tal detección o determinación puede llevarse a cabo en un amplicón de ADN del ARN diana en lugar de, o además de, el propio ARN diana. En algunas realizaciones, cuando se detecta el amplicón de ADN del ARN diana en lugar del propio ARN diana, se utiliza un polinucleótido para la detección que es complementario al complementario del ARN diana. En algunas realizaciones, cuando se detecta el amplicón de ADN del ARN diana en lugar del propio ARN diana, se utiliza un polinucleótido para la detección que es complementario del ARN diana. Además, en algunas realizaciones, se pueden usar múltiples polinucleótidos para detección y algunos polinucleótidos pueden ser complementarios del ARN diana y algunos polinucleótidos pueden ser complementarios del complementario de ARN diana.

En algunas realizaciones, el método de detección de uno o más ARN diana, tal como el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, comprende RT-PCR, como se describe a continuación. En algunas realizaciones, la detección de uno o más ARN diana comprende control en tiempo real de una reacción de RT-PCR, que se puede lograr por cualquier método. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la utilización de TaqMan®, baliza molecular o sondas Scorpion (es decir, sondas de transferencia de energía (ET), tales como sondas FRET) y la utilización de colorantes intercalantes, tales como verde SYBR, EvaGreen, naranja de tiazol, YO-PRO, TO-PRO, etc.

Ejemplos no limitantes de las condiciones de ejemplo para la amplificación del ADNc del que se ha realizado transcripción inversa a partir de los ARN diana son los siguientes. Un ciclo de ejemplo comprende una desnaturalización inicial a 90 °C a 100 °C durante de 2 a 5 minutos, seguido de ciclado que comprende desnaturalización a de 90 °C a 100 °C durante de 1 a 10 segundos, hibridación a 60 °C a 70 °C durante de 10 a 30 segundos y extensión a de 60 °C a 75 °C durante de 10 a 40 segundos. En algunas realizaciones, para el primer ciclo después de la etapa de desnaturalización inicial, se omite la etapa ciclo de desnaturalización. En algunas realizaciones, se usa la polimerasa Taq para la amplificación. En algunas realizaciones, el ciclo se lleva a cabo al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces o al menos 45 veces. En algunas de tales realizaciones, la Taq se utiliza con una función de arranque en caliente. En algunas realizaciones, la reacción de amplificación se produce en un cartucho GeneXpert y la amplificación de los cuatro ARN diana marcadores de cáncer de vejiga se produce en la misma reacción. En algunas realizaciones, la detección de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10 se produce en menos de 3 horas, menos de 2,5 horas o menos de 2 horas, desde la desnaturalización inicial a través de la última extensión.

En algunas realizaciones, la detección de un ARN diana comprende la formación de un complejo que comprende un polinucleótido que es complementario de un ARN diana o de un complementario del mismo, y un ácido nucleico seleccionado de entre el ARN diana, un amplicón de ADN del ARN diana y un complementario del ARN diana. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polinucleótido forma un complejo con un ARN diana. En algunas realizaciones, el polinucleótido forma un complejo con un complementario del ARN diana, tal como un ADNc que se ha producido por transcripción inversa a partir del ARN diana. En algunas realizaciones, el polinucleótido forma un complejo con un amplicón de ADN del ARN diana. Cuando un amplicón de ADN bicatenario es parte de un complejo, tal como se usa en el presente documento, el complejo puede comprender una o ambas cadenas del amplicón de ADN. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un complejo comprende solamente una cadena del amplicón de ADN. En algunas realizaciones, un complejo es un triplex y comprende el polinucleótido y ambas cadenas del amplicón de ADN. En algunas realizaciones, el complejo se forma mediante hibridación entre el polinucleótido y el ARN diana, complementario del ARN diana, o el amplicón de ADN del ARN diana. El polinucleótido, en algunas realizaciones, es un cebador o sonda.

En algunas realizaciones, un método comprende la detección del complejo. En algunas realizaciones, el complejo no tiene que estar asociado en el momento de la detección. Es decir, en algunas realizaciones, se forma un complejo, a continuación, el complejo se disocia o destruye de alguna manera, y se detectan los componentes del complejo. Un ejemplo de dicho sistema es un ensayo TaqMan®. En algunas realizaciones, cuando el polinucleótido es un cebador, la detección del complejo puede comprender la amplificación del ARN diana, un complementario del ARN diana o un amplicón de ADN de un ARN diana.

En algunas realizaciones, el método analítico utilizado para la detección de al menos un ARN diana en los métodos establecidos en el presente documento incluye RT-PCR cuantitativa en tiempo real. En algunas realizaciones, el

método analítico utilizado para la detección de al menos un ARN diana incluye el uso de una sonda TaqMan®. El ensayo utiliza transferencia de energía ("ET"), tal como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"), para detectar y cuantificar el producto de PCR sintetizado. Típicamente, la sonda TaqMan® comprende una molécula de colorante fluorescente acoplado al extremo 5' y una molécula inactivadora acoplada al extremo 3',

5 de manera que el colorante y el inactivador están en proximidad cercana, permitiendo que el inactivador suprima a señal de fluorescencia del colorante mediante FRET. Cuando la polimerasa replica el molde del amplicón quimérico al que está unida la sonda TaqMan®, la nucleasa 5' de la polimerasa escinde la sonda, desacoplando el colorante y el inactivador de modo que se detecta la señal del colorante (tal como, fluorescencia). La señal (tal como fluorescencia) aumenta con cada ciclo de RT-PCR de forma proporcional a la cantidad de sonda que se escinde.

10 En algunas realizaciones, la cuantificación de los resultados de los ensayos de RT-PCR en tiempo real se realiza mediante la construcción de una curva estándar a partir de un ácido nucleico de concentración conocida y, a continuación, extrapolando la información cuantitativa para los ARN diana de concentración desconocida. En algunas realizaciones, el ácido nucleico utilizado para generar una curva estándar es un ARN (por ejemplo, un control endógeno o un control exógeno). En algunas realizaciones, el ácido nucleico utilizado para generar una curva estándar es un ADN plasmídico bicatenario purificado o un ADN monocatenario generado *in vitro*.

20 En algunas realizaciones, cuando las eficiencias de amplificación de los ácidos nucleicos diana y endógenos de referencia son aproximadamente iguales, la cuantificación se lleva a cabo mediante el método comparativo de Ct (umbral del ciclo, por ejemplo, el número de ciclos de PCR necesarios para que la señal de fluorescencia se eleve por encima del fondo). Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana en una muestra. En algunas realizaciones, los valores de Ct de un ARN diana se puede comparar con un control o calibrador, tal como dicho ARN de control exógeno. En algunas realizaciones, los valores de Ct del control exógeno y el ARN diana se normalizan con un control endógeno apropiado. Ejemplos no limitantes de controles endógenos se tratan en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, un valor de Ct umbral (o un "Ct de corte") para un ARN diana, por debajo del cual se indica cáncer de vejiga, se ha determinado previamente. En tales realizaciones, una muestra de control puede no analizarse de forma simultánea con la muestra de ensayo. En algunas realizaciones, como se trata en el presente documento, anteriormente se ha determinado un valor umbral de ΔCt por encima del cual se indica cáncer de vejiga.

30 Además de los ensayos TaqMan®, otras químicas de RT-PCR en tiempo real útiles para detectar y cuantificar los productos de PCR en los métodos presentados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, balizas moleculares, sondas Scorpion y colorantes intercalantes, tales como verde SYBR, EvaGreen, naranja de tiazol, YO-PRO, TO-PRO, etc., que se tratan a continuación.

35 En diversas realizaciones, se utiliza detección mediante RT-PCR en tiempo real para detectar, en una única reacción multiplex, los cuatro marcadores de cáncer de vejiga del panel descrito en el presente documento, y opcionalmente, al menos un control endógeno y/o al menos un control exógeno. En algunas realizaciones multiplex, se utiliza una pluralidad de sondas, tales como las sondas TaqMan®, cada una específica para un ARN diana diferente. En algunas realizaciones, cada sonda específica del ARN diana se puede distinguir en los espectros de las otras sondas utilizadas en la misma reacción multiplex.

40 En algunas realizaciones, la cuantificación de los productos de RT-PCR en tiempo real se realiza usando un colorante que se une a los productos de ADN bicatenario, tales como verde SYBR, EvaGreen, naranja de tiazol, YO-PRO, TO-PRO, etc. En algunas realizaciones, el ensayo es el ensayo QuantiTect SYBR Green PCR de Qiagen. En este ensayo, el ARN total se aísla primero a partir de una muestra. El ARN total se poliadenila posteriormente en el extremo 3' y se realiza transcripción inversa utilizando un cebador universal con poli-dT en el extremo 5'. En algunas realizaciones, una sola reacción de transcripción inversa es suficiente para analizar múltiples ARN diana. A continuación, se realiza RT-PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos del ARN diana y un cebador universal miScript, que comprende una secuencia de poli-dT en el extremo 5'. El colorante verde SYBR se une de forma no específica al ADN bicatenario y, tras la excitación, emite luz. En algunas realizaciones, las condiciones del tampón que promueven la hibridación altamente específica de los cebadores al molde de la PCR (por ejemplo, disponible en el Kit QuantiTect SYBR Green PCR de Qiagen) se pueden utilizar para evitar la formación de dúplex de ADN no específicos y dímeros de cebadores que se unirán al verde SYBR y afectan de forma negativa a la cuantificación. Por lo tanto, a medida que el producto de la PCR se acumula, la señal del verde SYBR aumenta, lo que permite la cuantificación de productos específicos.

45 La RT-PCR en tiempo real se realiza usando cualquier instrumento de RT-PCR disponible en la materia. Típicamente, los instrumentos utilizados en la recogida y análisis de los datos de la RT-PCR comprenden un ciclador térmico, óptica para la recogida de excitación y emisión de fluorescencia, y, opcionalmente, un ordenador y software de adquisición y análisis de datos.

50 En algunas realizaciones, el método analítico utilizado en los métodos descritos en el presente documento es un ensayo DASL® (hibridación, selección, extensión y ligadura mediada por ADNc). En algunas realizaciones, el ARN total se aísla de una muestra que se va a analizar por cualquier método. A continuación, el ARN total se puede

65

poliadenilar (se añaden > 18 residuos de A a los extremos 3' de los ARN en la mezcla de reacción). El ARN se sometió a transcripción inversa usando un cebador de ADN marcado con biotina que comprende del extremo 5' al extremo 3', una secuencia que incluye un sitio para el cebador de la PCR y una región de poli-dT que se une a la cola de poli-dA del ARN de la muestra. Los transcritos de ADNc biotinilado resultantes se hibridaron después a un soporte sólido a través de una interacción biotina-estreptavidina y en contacto con uno o más polinucleótidos específicos de ARN diana. Los polinucleótidos específicos del ARN diana comprenden, desde el extremo 5' al extremo 3', una región que comprende un sitio para el cebador de la PCR, comprendiendo la región una secuencia de dirección, y una secuencia específica del ARN diana.

En algunas realizaciones de DASL[®], la secuencia específica del ARN diana comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es la misma que, o complementaria a, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 nucleótidos contiguos del ARN diana marcador de cáncer de vejiga, un ARN de control endógeno o un ARN de control exógeno.

Después de la hibridación, se extiende el polinucleótido específico del de ARN diana y, a continuación, los productos extendidos se eluyen de la matriz de ADNc inmovilizado. Una segunda reacción de PCR que utiliza un cebador universal marcado con fluorescencia genera un ADN marcado con fluorescencia que comprende la secuencia específica del ARN diana. Los productos de PCR marcados se hibridan después a una matriz de microperlas para la detección y cuantificación.

En algunas realizaciones, el método analítico utilizado para detectar y cuantificar los niveles del al menos un ARN diana en los métodos descritos en el presente documento es un ensayo de citometría de flujo basado en perlas. Véase, Lu J. et al. (2005) Nature 435:834–838. Un ejemplo de un ensayo de citometría de flujo basado en perlas es la tecnología xMAP[®] de Luminex, Inc. (Véase, <http://www.luminexcorp.com/technology/index.html>). En algunas realizaciones, el ARN total se aísla de una muestra y después se marca con biotina. El ARN marcado se hibrida después con sondas de captura específicas del ARN diana (por ejemplo, productos FlexmiR[™] comercializados por Luminex, Inc. en <http://www.luminexcorp.com/products/assays/index.html>) que están unidas covalentemente a microperlas, cada una de las cuales está marcada con 2 colorantes que tienen diferentes intensidades de fluorescencia. Una molécula indicadora unida a estreptavidina (por ejemplo, estreptavidina-ficoeritrina, también conocido como "SAPE") se une al ARN diana capturado y la señal única de cada perla se lee usando citometría de flujo. En algunas realizaciones, la muestra de ARN se poliadenila primero y, posteriormente, se marca con un dendrímero biotinilado 3DNA[™] (es decir, un ADN de brazos múltiples con numerosas moléculas de biotina unidas al mismo), utilizando un polinucleótido de puente que es complementario al extremo 3' de la cola de poli-dA del ARN de la muestra y al extremo 5' del polinucleótido unido al dendrímero biotinilado. A continuación, la molécula indicadora unida a estreptavidina se une al dendrímero biotinilado antes del análisis mediante citometría de flujo. En algunas realizaciones, el ARN marcado con biotina se expone primero a SAPE y el complejo ARN/SAPE se expone posteriormente a un anticuerpo anti-ficoeritrina unida a un dendrímero de ADN, que se puede unir incluso hasta a 900 moléculas de biotina. Esto permite que múltiples moléculas de SAPE se unan al dendrímero biotinilado a través de la interacción biotina-estreptavidina, aumentando de este modo la señal del ensayo.

En algunas realizaciones, el método analítico utilizado para detectar y cuantificar los niveles del al menos un ARN diana en los métodos descritos en el presente documento es mediante electroforesis en gel y la detección con sondas marcadas (por ejemplo, sondas marcadas con un marcador radiactivo o quimioluminiscente), tal como mediante transferencia de tipo Northern. En algunas realizaciones, el ARN total se aísla de la muestra y, después, se separa por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. A continuación, el ARN separado se transfiere a una membrana y se hibrida con sondas complementarias radiomarcadas. En algunas realizaciones, las sondas de ejemplo contienen uno o más análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad, como se trata a continuación, tales como análogos de ácido nucleico bloqueado ("LNA"), que contienen un resto de azúcar bicíclico en lugar de los azúcares desoxirribosa o ribosa. Véase, por ejemplo, Várallyay, E. et al. (2008) Nature Protocols 3(2):190–196.

En algunas realizaciones, la detección y cuantificación de uno o más ARN diana se lleva a cabo utilizando dispositivos de microfluidos y detección de una sola molécula. En algunas realizaciones, los ARN diana en una muestra de ARN total aislado se hibridan con dos sondas, una que es complementaria a los ácidos nucleicos en el extremo 5' del ARN diana y la segunda que es complementaria del extremo 3' del ARN diana. Cada sonda comprende, en algunas realizaciones, uno o más análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad, tales como análogos de nucleótidos de LNA, y cada uno está marcado con un colorante fluorescente diferente que tiene diferentes espectros de emisión de fluorescencia (es decir, colorantes diferentes de forma detectable). A continuación, se hace fluir la muestra a través de un capilar de microfluidos en el que múltiples láseres excitan las sondas fluorescentes, de forma que una descarga coincidente única de fotones identifica un ARN diana concreto, y el número de descargas coincidentes únicas particulares de fotones se puede contar para cuantificar la cantidad de el ARN diana en la muestra. En algunas realizaciones alternativas, una sonda específica del ARN diana se puede marcar con 3 o más marcadores diferentes seleccionados de, por ejemplo, fluoróforos, marcadores de espín de electrones, etc., y, después, se hibrida a una muestra de ARN.

De manera opcional, el ARN de la muestra se modifica antes de la hibridación. A continuación, el dúplex ARN diana/sonda se hace pasar a través de los canales en un dispositivo de microfluído y que comprende detectores que registran la señal única de los 3 marcadores. De esta manera, se detectan moléculas individuales mediante su señal única y se cuentan. Véanse las patentes de Estados Unidos números 7.402,422 y 7.351.538 de Fuchs et al., U.S. Genomics, Inc.

4.2.5. Automatización y sistemas de ejemplo

En algunas realizaciones, la expresión génica se detecta utilizando una plataforma de análisis y/o manipulación automática de las muestras. En algunas realizaciones, se utilizan plataformas de análisis automatizadas disponibles comercialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usa el sistema GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA).

La presente invención se ilustra para su uso con el sistema GeneXpert. Los métodos de preparación y análisis de muestras de ejemplo se describen a continuación. Sin embargo, la presente invención no se limita a un método de detección en particular o plataforma de análisis. Un experto en la materia reconoce que se puede utilizar cualquier número de plataformas y métodos.

El sistema GeneXpert® utiliza un cartucho de un solo uso independiente. La extracción, la amplificación y la detección de las muestras se pueden llevar a cabo todos ellos llevados en un "laboratorio en un cartucho" independiente. (Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.958.349, 6.403.037, 6.440.725, 6.783.736, 6.818.185.)

Los componentes del cartucho incluyen, pero no se limitan a, cámaras de procesamiento que contienen reactivos, filtros y tecnologías de captura útiles para extraer, purificar y amplificar los ácidos nucleicos diana. Una válvula permite la transferencia de fluido desde una cámara a otra y contiene los componentes de filtración y lisis de ácidos nucleicos. Una ventana óptica permite la detección óptica en tiempo real. Un tubo de reacción permite ciclos térmicos muy rápidos.

En algunas realizaciones, el sistema GeneXpert® incluye una pluralidad de módulos para la escalabilidad. Cada módulo incluye una pluralidad de cartuchos, junto con los componentes de manipulación y análisis de muestras.

En algunas realizaciones, el método de preparación de muestras GeneXpert® utiliza la filtración con el fin de capturar y concentrar las células a partir de la orina. En algunas realizaciones, se utiliza un filtro de tamaño de poro de 0,8 µm. Este tamaño facilita la captura de todas las células en la orina. En otras realizaciones, se utilizan tamaños de poro de 0,5 a 10 µm, de 0,5 a 5 µm, de 0, de 8 a 10 µm, de 0, de 8 a 5 µm, de 0, de 8 a 2 µm, de 2 a 5 µm, de 2 a 10 µm, de 2 a 8 µm, de 5 a 8 µm, de 0 de 5 a 10 µm. Algunos filtros (tales como 5 µm, 8 µm, and 10 µm) permiten la eliminación de la mayoría de los glóbulos rojos y blancos de la muestra durante la captura de las células uroteliales más grandes, que son las células diana del ensayo. En algunas realizaciones, este método de preparación de muestras mejora la especificidad del ensayo mediante la eliminación de los glóbulos blancos que pueden estar presentes debido a una infección o inflamación. En algunos casos, los métodos de preparación de muestras, tales como la centrifugación de la orina entera, seguida de aislamiento del ARN del sedimento de orina no permiten la eliminación de los glóbulos blancos. En algunas realizaciones, la eficiencia de la captura de células por filtración es mayor en comparación con la centrifugación, y puede proporcionar resultados más consistentes.

Después de que las células de la orina son capturadas en el filtro, en algunas realizaciones, se lavan y, después, se lisan mediante sonicación (2-15 segundos, 8-16 µm a 36 kHz). El lisado celular se recoge después y se utiliza para reconstituir los reactivos de la RT-PCR, que están presentes en el cartucho como partículas liofilizadas.

En algunas realizaciones, la RT-PCR se utiliza para amplificar y analizar la presencia o los niveles de expresión de los marcadores de cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, la transcripción inversa utiliza la enzima RT del MMLV y una incubación de 5 a 20 minutos a 40 °C a 50 °C. En algunas realizaciones, la PCR utiliza la Taq polimerasa con función de arranque en caliente, tal como AptaTaq (Roche). En algunas realizaciones, la desnaturalización inicial se realiza a de 90 °C a 100 °C durante de 2 a 5 minutos; la temperatura de desnaturalización del ciclo es de 90 °C a 100 °C durante de 1 a 10 segundos; la temperatura de hibridación del ciclo es de 60 °C a 70 °C durante de 10 a 30 segundos; y la temperatura de extensión del ciclo es 60 °C a 75 °C durante de 10 a 40 segundos; y se realizan hasta 50 ciclos.

La presente invención no se limita a secuencias concretas de cebadores y/o de sondas. Ejemplos de cebadores de amplificación y sondas de detección se describen en los ejemplos.

En algunas realizaciones, se usa una centrifugación fuera de línea para mejorar los resultados del ensayo con muestras con bajo contenido celular. La muestra, con o sin el conservante añadido, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. A continuación, se resuspende el sedimento en un volumen más pequeño de cualquiera del sobrenadante o el conservante. El sedimento resuspendido se añade a continuación a un cartucho de GeneXpert® como se ha descrito anteriormente.

4.2.6. Análisis de datos de ejemplo

En algunas realizaciones, se usa un programa de análisis basado en ordenador para traducir los datos en bruto generados por el ensayo de detección (por ejemplo, el nivel de expresión de los marcadores de cáncer de vejiga descritos en el presente documento) en datos de valor predictivo para un clínico. El clínico puede acceder a los datos predictivos usando cualquier medio adecuado. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona el beneficio adicional de que el clínico, que no es probable que esté formado en genética o en biología molecular, no necesita entender los datos brutos. Los datos se presentan directamente al clínico en su forma más útil. Después, el clínico podrá usar inmediatamente la información con el fin de optimizar los cuidados del sujeto.

La presente invención contempla cualquier método capaz de recibir, procesar y transmitir la información a y desde los laboratorios que realizan los ensayos, proveedores de información, personal médico y sujetos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, se obtiene una muestra (por ejemplo, una muestra de biopsia o de suero o de orina) de un sujeto y se somete a un servicio de perfiles (por ejemplo, el laboratorio clínico en un centro médico, negocios de perfil genómico etc.) localizado en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país diferente al país en el que reside el sujeto o en el que la información se va a usar en última instancia) para generar los datos brutos. Cuando la muestra comprende un tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede acudir a un centro médico para que se le extraiga la muestra, que se enviará al centro de realización del perfil, o los sujetos pueden obtener ellos mismos la muestra (por ejemplo, una muestra de orina) y enviarla directamente a un centro de realización de perfiles. Cuando la muestra comprende información biológica determinada previamente, el sujeto puede enviar la información se puede enviar directamente al servicio de realización de perfiles (por ejemplo, un ordenador puede escanear una tarjeta de información que contiene la información y transmitir los datos a un ordenador del centro de realización de perfiles usando un sistema de comunicación electrónica). Una vez recibida por el servicio de perfiles, la muestra se procesa y se produce un perfil (es decir, los datos de expresión), específico para la información de diagnóstico o pronóstico deseada para el sujeto.

Después, los datos del perfil se preparan en un formato adecuado para su interpretación por un clínico encargado del tratamiento. Por ejemplo, en lugar de proporcionar datos de expresión brutos, el formato preparado puede representar un diagnóstico o evaluación de riesgos (por ejemplo, el nivel de expresión de los marcadores de cáncer de vejiga descritos en el presente documento o diagnóstico de cáncer de vejiga) para el sujeto, junto con recomendaciones de opciones terapéuticas concretas. Los datos se pueden mostrar al clínico mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el servicio de realización de perfiles genera un informe que se puede imprimir para el clínico (por ejemplo, en el centro de atención) o mostrar al clínico en un monitor de ordenador.

En algunas realizaciones, la información se analiza primero en el centro de atención o en una instalación regional. Después, los datos brutos se envían a una instalación de procesamiento central para su posterior análisis y/o para convertir los datos brutos en información útil para un clínico o un paciente. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), velocidad y uniformidad de los análisis de datos. A continuación, la instalación de procesamiento central puede controlar el destino de los datos tras el tratamiento del sujeto. Por ejemplo, usando un sistema de comunicación electrónica, la instalación central puede proporcionar datos al clínico, al sujeto o a los investigadores.

En algunas realizaciones, el sujeto puede acceder directamente a los datos usando el sistema de comunicación electrónica. Según los resultados, el sujeto puede elegir intervención o asesoramiento adicionales. En algunas realizaciones, los datos se utilizan para uso en investigación. Por ejemplo, los datos se pueden usar para optimizar aún más la inclusión o eliminación de marcadores como indicadores útiles de una afección o estado de enfermedad concreto o como un compañero de diagnóstico para determinar un curso de tratamiento de acción particular.

4.2.7. Polinucleótidos de ejemplo

En el presente documento se divulgan polinucleótidos. También se divulgan polinucleótidos sintéticos. Los polinucleótidos sintéticos, tal como se usa en el presente documento, se refieren a polinucleótidos que se han sintetizado *in vitro* ya sea química o enzimáticamente. La síntesis química de polinucleótidos incluye, pero no se limita a, síntesis usando sintetizadores de polinucleótidos, tales como OligoPilot (GE Healthcare), sintetizador ABI 3900 DNA (Applied Biosystems), y similares. La síntesis enzimática incluye, pero no se limita a la misma, la producción de polinucleótidos mediante amplificación enzimática, por ejemplo, PCR. Un polinucleótido puede comprender uno o más análogos de nucleótidos (es decir, nucleótidos modificados) tratados en el presente documento.

En algunas realizaciones, se proporciona un polinucleótido que comprende una región que es idéntica a, o complementaria a, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, o al menos 30 nucleótidos

contiguos de una secuencia seleccionada del ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. En algunas realizaciones se proporciona un polinucleótido que comprende una región que es idéntica a, o complementaria a, un tramo de 6 a 100, de 8 a 100, de 8 a 75, de 8 a 50, de 8 a 40 o de 8 a 30 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos se muestran en las tablas 1 y 6.

En diversas realizaciones, un polinucleótido que comprende menos de 500, menos de 300, menos de 200, menos de 150, menos de 100, menos de 75, menos de 50, menos de 40 o menos de 30 nucleótidos. En diversas realizaciones, un polinucleótido tiene una longitud de entre 6 y 200, entre 8 y 200, entre 8 y 150, entre 8 y 100, entre 8 y 75, entre 8 y 50, entre 8 y 40 o entre 8 y 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el polinucleótido es un cebador. En algunas realizaciones, el cebador se marca con un resto detectable. En algunas realizaciones, un cebador no está marcado. Un cebador, tal como se usa en el presente documento, es un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a un ARN diana o a un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARN diana o a un amplicón que se ha amplificado a partir de un ARN diana o un ADNc (denominado colectivamente como "molde") y, en presencia del molde, una polimerasa y tampones y reactivos adecuados, puede extenderse para formar un producto de extensión del cebador.

En algunas realizaciones, el polinucleótido es una sonda. En algunas realizaciones, la sonda se marca con un resto detectable. Un resto detectable, tal como se usa en el presente documento, incluye restos directamente detectables, tales como colorantes fluorescentes, y restos indirectamente detectables, tales como miembros de pares de unión. Cuando el resto detectable es un miembro de un par de unión, en algunas realizaciones, la sonda puede ser detectable mediante la incubación de la sonda con un marcador detectable unido al segundo miembro del par de unión. En algunas realizaciones, una sonda no está marcada, tal como cuando una sonda es una sonda de captura, por ejemplo, en una micromatriz o perla. En algunas realizaciones, una sonda no se puede extender, por ejemplo, mediante una polimerasa. En otras realizaciones, una sonda se puede extender.

En algunas realizaciones, el polinucleótido es una sonda FRET que, en algunas realizaciones, está marcado en el extremo 5' con un colorante fluorescente (donante) y en el extremo 3' con un inactivador (aceptor), un grupo químico que absorbe (es decir, suprime) la emisión de fluorescencia del colorante cuando los grupos están en estrecha proximidad (es decir, unidos a la misma sonda). En otras realizaciones, el colorante y el inactivador no están en los extremos de la sonda FRET. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el espectro de emisión del colorante debería superponerse considerablemente con el espectro de absorción del inactivador.

4.2.7.1. Modificaciones de polinucleótidos de ejemplo

En algunas realizaciones, los métodos de detección de al menos un ARN diana descrito en el presente documento emplean uno o más polinucleótidos que se han modificado, tales como polinucleótidos que comprenden uno o más análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad. Los polinucleótidos modificados útiles en los métodos descritos en el presente documento incluyen cebadores para la transcripción inversa, cebadores de amplificación por PCR y sondas. En algunas realizaciones, la incorporación de nucleótidos potenciadores de la afinidad aumenta la afinidad de unión y la especificidad de un polinucleótido por su ácido nucleico diana, en comparación con los polinucleótidos que contienen solo desoxirribonucleótidos, y permite el uso de polinucleótidos más cortos o para las regiones más cortas de la complementariedad entre el polinucleótido y el ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad incluyen nucleótidos que comprenden una o más modificaciones de bases, modificaciones de azúcares y/o modificaciones del esqueleto.

En algunas realizaciones, las bases modificadas para su uso en análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad incluyen 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 2-cloro-6-aminopurina, xantina e hipoxantina.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad incluyen nucleótidos que tienen azúcares modificados, tales como azúcares 2'-sustituidos, tales como azúcares 2'-O-alkil-ribosa, azúcares 2'-amino-desoxirribosa, azúcares 2'-fluoro-desoxirribosa, azúcares 2'-fluoro-arabinosa y azúcares 2'-O-metoxietil-ribosa (2'MOE). En algunas realizaciones, los azúcares modificados son azúcares arabinosa, o azúcares d-arabino-hexitol.

En algunas realizaciones, los análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad incluyen modificaciones del esqueleto, tales como el uso de ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por ejemplo, un oligómero que incluye bases nucleotídicas unidas entre sí por una cadena principal de aminoácidos). Otras modificaciones del esqueleto incluyen enlaces fosforotioato, ácidos nucleicos modificados con fosfodiéster, combinaciones de ácidos nucleicos fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, alquilfosfonatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres de carboximetilo, metilfosforotioato, fosforoditioato, p-etoxi y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, un polinucleótido incluye al menos un análogo de nucleótido potenciador de la afinidad

que tiene una base modificada, al menos un nucleótido (que puede ser el mismo nucleótido) que tiene un azúcar modificado, y/o al menos un enlace internucleotídico que es de origen no natural.

En algunas realizaciones, un análogo de nucleótido potenciador de la afinidad contiene un azúcar de ácido nucleico bloqueado ("LNA"), que es un azúcar bicíclico. En algunas realizaciones, un polinucleótido para su uso en los métodos descritos en el presente documento comprende uno o más nucleótidos que tienen un azúcar LNA. En algunas realizaciones, un polinucleótido contiene una o más regiones que consisten en nucleótidos con azúcares de LNA. En otras realizaciones, un polinucleótido contiene nucleótidos con azúcares de LNA intercalados con desoxirribonucleótidos. Véase, por ejemplo, Frieden, M. et al. (2008) *Curr. Pharm. Des.* 14(11): 1138–1142.

4.2.7.2. Cebadores de ejemplo

En algunas realizaciones, se proporciona un cebador. En algunas realizaciones, un cebador es idéntico a, o complementaria a, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, o al menos 30 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. En algunas realizaciones se proporciona un cebador que comprende una región que es idéntica a, o complementaria a, un tramo de 6 a 100, de 8 a 100, de 8 a 75, de 8 a 50, de 8 a 40 o de 8 a 30 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. Ejemplos no limitantes de cebadores se muestran en las Tablas 1 y 6. En algunas realizaciones, un cebador puede comprender también partes o regiones que no son idénticas ni complementarias al ARN diana. En algunas realizaciones, una región de un cebador que es idéntica o complementaria de un ARN diana es contigua, de manera que cualquier región de un cebador que no sea idéntica o complementaria del ARN diana no interrumpe la región idéntica o complementaria.

En algunas realizaciones, un cebador comprende una parte que está presente de forma idéntica en un ARN diana. En algunas de tales realizaciones, un cebador que comprende una región que está presente de forma idéntica en el ARN diana es capaz de hibridarse selectivamente con un ADNc que se ha producido por transcripción inversa a partir del ARN, o a un amplicón que se ha producido mediante amplificación del ARN diana o el ADNc. En algunas realizaciones, el cebador es complementario a una parte suficiente del ADNc o amplicón, de modo que hibrida selectivamente con el ADNc o amplicón en las condiciones del ensayo particular que se utilice.

Tal como se usa en el presente documento, "hibridar selectivamente" significa que un polinucleótido, tal como un cebador o sonda, hibridará con un ácido nucleico particular en una muestra con una afinidad al menos 5 veces mayor de lo que hibridará con otro ácido nucleico presente en la misma muestra que tiene una secuencia de nucleótidos diferente en la región de hibridación. Los ejemplos de condiciones de hibridación se tratan en el presente documento, por ejemplo, en el contexto de una reacción de transcripción inversa o una reacción de amplificación por PCR. En algunas realizaciones, un polinucleótido hibridará con un ácido nucleico particular en una muestra con una afinidad al menos 10 veces mayor de lo que hibridará con otro ácido nucleico presente en la misma muestra que tiene una secuencia de nucleótidos diferente en la región de hibridación.

En algunas realizaciones, se usa un cebador para la transcripción inversa de un ARN diana, por ejemplo, como se trata en el presente documento. En algunas realizaciones, se usa un cebador para amplificar un ARN diana o un ADNc producido por transcripción inversa del mismo. Tal amplificación, en algunas realizaciones, es PCR cuantitativa, por ejemplo, como se trata en el presente documento. En algunas realizaciones, un cebador comprende un resto detectable.

En el presente documento se divulgan pares de cebadores. Tales pares de cebadores se diseñan para amplificar una porción de un ARNm diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, o un ARN de control endógeno, o un ARN de control exógeno. En algunas realizaciones, se diseña un par de cebadores para producir un amplicón que es de 50 a 1.500 nucleótidos de longitud, de 50 a 1.000 nucleótidos de longitud, de 50 a 750 nucleótidos de longitud, de 50 a 500 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, de 50 a 300 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud, de 50 a 150 nucleótidos de longitud o de 50 a 100 nucleótidos de longitud. Ejemplos no limitantes de pares de cebadores ejemplares se muestran en las Tablas 1 y 6. En algunas realizaciones, se diseña un par de cebadores que abarca un intrón en la secuencia genómica de manera que el ARNm, sin el intrón, se amplifica más preferiblemente que la secuencia genómica. Por "abarca un intrón" se quiere decir que un cebador del par de cebadores es complementario a una secuencia en el ARNm o un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARNm que está situado al menos parcialmente en 5' de un intrón en la secuencia genómica y un cebador del par de cebadores es complementario de una secuencia en el ARNm o un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARNm que está situado al menos parcialmente en 3' del mismo intrón en la secuencia genómica. En algunas realizaciones, un cebador del par de cebadores es complementario a una secuencia en el ARNm o un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARNm que está situado en 5' de un intrón en la secuencia genómica y un cebador del par de cebadores es complementario de una secuencia en el ARNm o un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARNm que está situado en 3' del mismo intrón en la secuencia genómica. En algunas realizaciones, uno de los cebadores en el par de cebadores puede ser complementario de una secuencia en el ARNm o un ADNc producido por transcripción inversa a partir del ARNm

que se corta y empalma cuando se elimina el intrón, de tal manera que la secuencia complementaria contigua no se encuentra en la secuencia genómica. Un par de cebadores que comprende un cebador de este tipo todavía se considera que abarca un intrón.

5 4.2.7.3. Sondas de ejemplo

En diversas realizaciones, los métodos de detección de la presencia de cáncer de vejiga comprenden hibridar los ácidos nucleicos de una muestra con una sonda. En algunas realizaciones, la sonda comprende una porción que es complementaria a un ARN diana, tal como el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas realizaciones, la sonda comprende una parte que está presente de forma idéntica en el ARN diana. En algunas de tales realizaciones, una sonda que es complementaria de un ARN diana es complementaria a una parte suficiente del ARN diana de forma que hibrida selectivamente con el ARN diana en las condiciones del ensayo concreto que se utilice. En algunas realizaciones, una sonda que es complementaria de un ARN diana comprende una región que es complementaria de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29 o al menos 30 nucleótidos contiguos del ARN diana, tal como el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. Ejemplos no limitantes de sondas se muestran en las Tablas 1 y 6. Una sonda que es complementaria de un ARN diana también puede comprender porciones o regiones que no son complementarias del ARN diana. En algunas realizaciones, una región de una sonda que es complementaria de un ARN diana es contigua, de manera que cualquier región de una sonda que no sea complementaria al ARN diana no interrumpe la región complementaria.

En algunas realizaciones, la sonda comprende una porción que está presente de forma idéntica en el ARN diana, tal como el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas de tales realizaciones, una sonda que comprende una región que está presente de forma idéntica en el ARN diana es capaz de hibridarse selectivamente con un ADNc que se ha producido por transcripción inversa a partir del ARN, o a un amplicón que se ha producido mediante amplificación del ARN diana o el ADNc. En algunas realizaciones, la sonda es complementaria de una parte suficiente del ADNc o amplicón, de modo que hibrida selectivamente con el ADNc o amplicón en las condiciones del ensayo particular que se utilice. En algunas realizaciones, una sonda que es complementaria de un ADNc o amplicón comprende una región que es complementaria de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29 o al menos 30 nucleótidos contiguos del ADNc o amplicón. Una sonda que es complementaria de un ADNc o amplicón también puede comprender partes o regiones que no son complementarias del ADNc o amplicón. En algunas realizaciones, una región de una sonda que es complementaria de un ADNc o amplicón es contigua, de manera que cualquier región de una sonda que no sea complementaria del ADNc o amplicón no interrumpe la región complementaria.

En algunas realizaciones, el método de cuantificación de manera detectable de uno o más ARN diana comprende: (a) transcripción inversa de un ARN diana para producir un ADNc que es complementario del ARN diana; (b) amplificar el ADNc a partir de (a); y (c) detectar la cantidad de un ARN diana usando RT-PCR en tiempo real y una sonda de detección (que puede ser simultánea con la etapa de amplificación (b)).

Como se ha descrito anteriormente, en algunas realizaciones, la detección mediante RT-PCR en tiempo real se puede realizar utilizando una sonda FRET, que incluye, pero no se limita a, una sonda TaqMan[®], una sonda de baliza molecular y una sonda Scorpion. En algunas realizaciones, la detección y cuantificación mediante RT-PCR en tiempo real se realiza con una sonda TaqMan[®], es decir, una sonda lineal que tiene típicamente un colorante fluorescente unido covalentemente a un extremo del ADN y una molécula inactivadora unida covalentemente en el otro extremo del ADN. La sonda FRET comprende una secuencia que es complementaria de una región del ADNc de tal manera que, cuando la sonda FRET se hibrida con el ADNc, la fluorescencia del colorante se inactiva y cuando la sonda se digiere durante la amplificación del ADNc, se libera el colorante desde la sonda y produce una señal de fluorescencia. En tales realizaciones, la cantidad de ARN diana en la muestra es proporcional a la cantidad de fluorescencia medida durante la amplificación del ADNc.

La sonda TaqMan[®] comprende típicamente una región de nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es complementaria de una región de un ARN diana o su ADNc complementario que se produce por transcripción inversa a partir del molde de ARN diana (es decir, la secuencia de la región de la sonda es complementaria de o está presente de forma idéntica en el ARN diana que se va a detectar), de forma tal que la sonda puede hibridar específicamente con el amplicón resultante de la PCR. En algunas realizaciones, la sonda comprende una región de al menos 6 nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es totalmente complementaria o está presente de forma idéntica en una región de un ADNc que se ha producido por transcripción inversa a partir de un molde de ARN diana, tal como que comprende una región de al menos 8 nucleótidos contiguos, al menos 10 nucleótidos contiguos, al menos 12 nucleótidos contiguos, al menos 14 nucleótidos contiguos o al menos 16 nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es complementaria de o está presente de forma idéntica en una región de un ADNc producido por transcripción inversa a partir de un ARN diana que se va a detectar.

En algunas realizaciones, la región del ADNc que tiene una secuencia que es complementaria de la secuencia de la sonda TaqMan® está en o cerca del centro de la molécula de ADNc. En algunas realizaciones, existen de forma independiente al menos 2 nucleótidos, tal como al menos 3 nucleótidos, tales como al menos 4 nucleótidos, tal como al menos 5 nucleótidos del ADNc en el extremo 5' y en el extremo 3' de la región de complementariedad.

5 En algunas realizaciones, se pueden usar balizas moleculares para detectar y cuantificar los productos de PCR. Como las sondas TaqMan®, las balizas moleculares utilizan FRET para detectar y cuantificar un producto de PCR a través de una sonda que tiene un colorante fluorescente y un inactivador unido en los extremos de la sonda. A diferencia de las sondas TaqMan®, las balizas moleculares permanecen intactas durante los ciclos de PCR. Las sondas de balizas moleculares forman una estructura tallo-bucle cuando están libre en solución, permitiendo de este modo que el colorante y el inactivador estén en estrecha proximidad suficiente para causar la inactivación de la fluorescencia. Cuando la baliza molecular hibrida con una diana, la estructura de tallo-bucle se suprime de manera que el colorante y el inactivador se separan en el espacio y el colorante brilla. Las balizas moleculares están disponibles, por ejemplo, de Gene Link™ (véase <http://www.genelink.com/newsite/products/mbintro.asp>).

15 En algunas realizaciones, las sondas Scorpion se pueden utilizar tanto como cebadores específicos de la secuencia como para la detección y cuantificación del producto de la PCR. Como las balizas moleculares, las sondas Scorpion forman una estructura tallo-bucle cuando no ha hibridado con un ácido nucleico diana. Sin embargo, a diferencia de las balizas moleculares, una sonda Scorpion consigue tanto cebado específico de secuencia como la detección de productos de la PCR. Una molécula de colorante fluorescente está unida al extremo 5' de la sonda Scorpion y un inactivador está unido al extremo 3'. La parte 3' de la sonda es complementaria del producto de extensión del cebador de PCR, y esta parte complementaria está ligada al extremo 5' de la sonda por un resto no amplificable. Después de que la sonda Scorpion se ha extendido, la secuencia específica de la diana de la sonda se une a su complementaria dentro del amplicón extendido, de modo que se abre la estructura de tallo-bucle y permite que el colorante en el extremo 5' brille y genere una señal. Las sondas están disponibles en, por ejemplo, Premier Biosoft International (véase http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/Scorpion.html).

30 En algunas realizaciones, los marcadores que se pueden utilizar en las sondas FRET incluyen colorantes colorimétricos y fluorescentes, tales como colorantes Alexa Fluor, colorantes BODIPY, tales como BODIPY FL; azul cascada; amarillo Cascade; cumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metil-cumarina, aminocumarina e hidroxycumarina; colorantes de cianina, tales como Cy3 y Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína; quelatos macrocíclicos de iones lantánidos, tales como colorante Quantum™; azul Marina; verde Oregón; colorantes de rodamina, tales como rojo rodamina, tetrametilrodamina y rodamina 6G; rojo Texas; colorantes fluorescentes de transferencia de energía, tales como naranja de tiazol-heterodímero de etidio; y TOTAB.

40 Entre los ejemplos específicos de colorantes se incluyen, pero no se limitan a los mismos, los identificados anteriormente y los siguientes: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750; colorantes BODIPY reactivos de amina, tales como BODIPY 493/503, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, y BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 514, azul Pacific, REG, verde rodamina, rojo rodamina, renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, 2',4',5',7'-tetrabromosulfonefluoresceína y TET.

50 Entre los ejemplos de pares de colorantes/inactivadores (es decir, pares de donantes/aceptores) se incluyen los colorantes, pero no se limitan a estos, fluoresceína/tetrametilrodamina; IAEDA S/fluoresceína; EDANS/DABCYL; fluoresceína/fluoresceína; BODIPY FL/BODIPY FL; fluoresceína/QSY 7 o QSY 9. Cuando el donante y aceptor son los mismos, FRET puede detectarse, en algunas realizaciones, mediante la despolarización de la fluorescencia. Ciertos ejemplos específicos de pares de colorantes/inactivadores (es decir, pares de donantes/aceptores) incluyen, pero no se limitan a, Alexa Fluor 350/Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 555; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 568/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 594/Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 350/QSY 35; Alexa Fluor 350/dabcyl; Alexa Fluor 488/QSY 35; Alexa Fluor 488/dabcyl; Alexa Fluor 488/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 555/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 568/QSY 7 o QSY 9; Alexa Fluor 568/QSY 21; Alexa Fluor 594/QSY 21; y Alexa Fluor 647/QSY 21. En algunos casos, el mismo inactivador puede usarse para múltiples colorantes, por ejemplo, un inactivador de amplio espectro, tal como un inactivador Iowa Black® (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA)) p un inactivador Black Hole Quencher™ (BHQ™; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

65 En algunas realizaciones, por ejemplo, en una reacción multiplex en la que se detectan dos o más restos (tales como amplicones) de forma simultánea, cada sonda comprende un colorante detectable diferente de tal manera que los colorantes se pueden distinguir cuando se detectan de manera simultánea en la misma reacción. Un experto en la materia puede seleccionar un conjunto de colorantes diferentes de forma detectable para su uso en una reacción multiplex.

Los ejemplos específicos de ribonucleótidos marcados con fluorescencia útiles en la preparación de sondas de RT-PCR para su uso en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento están disponibles en Molecular Probes (Invitrogen) e incluyen Alexa Fluor 488-5-UTP, fluoresceína-12-UTP, BODIPY FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, tetrametilrodamina-6-UTP, Alexa Fluor 546-14-UTP, rojo Texas-5-UTP y BODIPY TR-14-UTP. Otros ribonucleótidos fluorescentes están disponibles en Amersham Biosciences (GE Healthcare), tales como Cy3-UTP y Cy5-UTP.

Entre los ejemplos de desoxirribonucleótidos marcados con fluorescencia útiles en la preparación de sondas de RT-PCR para su uso en los métodos descritos en el presente documento se incluyen dinitrofenilo (DNP)-1'-dUTP, azul Cascade-7-dUTP, Alexa Fluor 488-5-dUTP, fluoresceína-12-dUTP, verde Oregón 488-5-dUTP, BODIPY FL-14-dUTP, verde rodamina-5-dUTP, Alexa Fluor 532-5-dUTP, BODIPY TMR-14-dUTP, tetrametilrodamina-6-dUTP, Alexa Fluor 546-14-dUTP, Alexa Fluor 568-5-dUTP, rojo Texas-12-dUTP, rojo Texas-5-dUTP, BODIPY TR-14-dUTP, Alexa Fluor 594-5-dUTP, BODIPY 630/650-14-dUTP, BODIPY 650/665-14-dUTP; Alexa Fluor 488-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 546-16-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 594-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 647-12-OBEA-dCTP. Los nucleótidos marcados con fluorescencia están disponibles comercialmente y se pueden adquirir en, por ejemplo, Invitrogen.

En algunas realizaciones, se introducen colorantes y otros restos, tales como desactivadores, en el polinucleótido usado en los métodos descritos en el presente documento, tales como sondas FRET, mediante nucleótidos modificados. Un "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que se ha modificado químicamente, pero todavía funciona como un nucleótido. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado tiene un resto químico, tal como un colorante o inactivador, unido covalentemente, y se puede introducir en un polinucleótido, por ejemplo, mediante la síntesis en fase sólida del polinucleótido. En otras realizaciones, el nucleótido modificado incluye uno o más grupos reactivos que pueden reaccionar con un colorante o inactivador antes, durante o después de la incorporación del nucleótido modificado en el ácido nucleico. En realizaciones específicas, el nucleótido modificado es un nucleótido modificado con amina, es decir, un nucleótido que se ha modificado para que tenga un grupo amina reactivo. En algunas realizaciones, el nucleótido modificado comprende un resto de base modificada, tales como uridina, adenosina, guanosina y/o citosina. En realizaciones específicas, el nucleótido modificado con amina se selecciona de entre 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-ATP; N6-(4-amino)butil-ATP, N6-(6-amino)butil-ATP, N4-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-CTP; N6-(6-amino)hexil-ATP; 8-[(6-amino)hexil]amino-ATP; 5-propargilamino-CTP, 5-propargilamino-UTP. En algunas realizaciones, los nucleótidos con diferentes restos de bases nucleotídicas se modifican de manera similar, por ejemplo, 5-(3-aminoalil)-GTP en lugar de 5-(3-aminoalil)-UTP. Muchos nucleótidos modificados con amina están disponibles comercialmente en, por ejemplo, Applied Biosystems, Sigma, Jena Bioscience y TriLink.

Entre los ejemplos de restos detectables se incluyen, pero no se limitan a, los miembros de pares de unión. En algunas de tales realizaciones, un primer miembro de un par de unión está unido a un polinucleótido. El segundo miembro del par de unión está unido a un marcador detectable, tal como un marcador fluorescente. Cuando se incuban el polinucleótido unido al primer miembro del par de unión con el segundo miembro del par de unión unido al marcador detectable, el primer y segundo miembros del par de unión se asocian y se puede detectar el polinucleótido. Entre los pares de unión de ejemplo se incluyen, pero no se limitan a, biotina y estreptavidina, anticuerpos y antígenos, etc.

En algunas realizaciones, se detectan múltiples ARN diana en una sola reacción multiplex. En algunas de tales realizaciones, cada sonda que está dirigida a un ADNc único se puede distinguir espectralmente cuando se libera de la sonda. Por lo tanto, cada ARN diana se detecta mediante una señal de fluorescencia única.

Un experto en la materia puede seleccionar un método de detección adecuado para un ensayo seleccionado, por ejemplo, un ensayo de RT-PCR en tiempo real. El método de detección seleccionado no tiene por qué ser un método descrito anteriormente y puede ser cualquier método.

4.3. Composiciones y kits de ejemplo

En otro aspecto, se proporcionan composiciones. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

Se divulgan composiciones que comprenden al menos un cebador específico del ARN diana. La expresión "cebador específico del ARN diana" abarca cebadores que tienen una región de nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que está (i) presente de forma idéntica en un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, o (ii) complementaria de la secuencia de una región de nucleótidos contiguos que se encuentran en un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. Se divulga una composición que comprende al menos un par de cebadores específicos del ARN diana. La expresión "par de cebadores específicos del ARN diana" abarca pares de cebadores que son adecuados para la amplificación de una región definida de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. Un par de cebadores específicos del ARN diana comprende típicamente un primer cebador que comprende una secuencia que es idéntica a la secuencia de una región de un

- ARN diana (aunque el cebador comprenderá típicamente ADN o nucleósidos modificados en lugar de ARN) y un segundo cebador que comprende una secuencia que es complementaria de una región de un ARN diana. Típicamente, un par de cebadores es adecuado para amplificar una región de un ARNm diana que tiene de 50 a 1.500 nucleótidos de longitud, de 50 a 1.000 nucleótidos de longitud, de 50 a 750 nucleótidos de longitud, de 50 a 500 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, de 50 a 300 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud, de 50 a 150 nucleótidos de longitud o 50 a 100 nucleótidos de longitud. En las Tablas 1 y 6 se muestran ejemplos no limitantes de cebadores y pares de cebadores.
- En algunas realizaciones, una composición comprende cuatro pares de cebadores específicos del ARN diana, un par para amplificar cada uno de los ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. En algunas realizaciones, una composición comprende adicionalmente un par de cebadores específicos del ARN diana para la amplificación de un ARN de control endógeno y/o un par de cebadores específicos del ARN diana para la amplificación de un ARN de control exógeno.
- En algunas realizaciones, una composición comprende al menos una sonda específica del ARN diana. La expresión "sonda específica del ARN diana" abarca cebadores que tienen una región de nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que está (i) presente de forma idéntica en un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10, o (ii) complementaria de la secuencia de una región de nucleótidos contiguos que se encuentran en un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. Ejemplos no limitantes de sondas específicas de la diana se muestran en las tablas 1 y 6.
- En algunas realizaciones, una composición (que incluye una composición descrita anteriormente que comprende cuatro o más pares de cebadores específicos del ARN diana) comprende cuatro sondas, una sonda para detectar cada uno de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. En algunas realizaciones, una composición comprende, además, una sonda para la detección de un ARN de control endógeno y/o una sonda para la detección de un ARN de control exógeno.
- En algunas realizaciones, una composición es una composición acuosa. En algunas realizaciones, la composición acuosa comprende un componente tampón, tales como fosfato, tris, HEPES, etc., y/o componentes adicionales, como se trata a continuación. En algunas realizaciones, una composición está seca, por ejemplo, liofilizada, y adecuada para la reconstitución mediante la adición de fluido. Una composición seca puede incluir uno o más componentes de tampón y/o componentes adicionales.
- En algunas realizaciones, una composición comprende además uno o más componentes adicionales. Los componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a, sales, tales como NaCl, KCl, y MgCl₂; polimerasas, incluyendo polimerasas termoestables tales como Taq; dNTP; transcriptasas inversas, tales como la transcriptasa inversa del MMLV; inhibidores de la ENASA; seroalbúmina bovina (BSA) y similares; agentes reductores, tales como β-mercaptoetanol; EDTA y similares; etc. Un experto en la materia puede seleccionar los componentes adecuados de la composición dependiendo del uso previsto de la composición.
- En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un polinucleótido para la detección de al menos un ARN diana. En algunas realizaciones, el polinucleótido se utiliza como cebador para una reacción de transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, el polinucleótido se utiliza como cebador para la amplificación. En algunas realizaciones, el polinucleótido se utiliza como cebador para la RT-PCR. En algunas realizaciones, el polinucleótido se utiliza como sonda para la detección de al menos un ARN diana. En algunas realizaciones, el polinucleótido está marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, el polinucleótido es una sonda FRET. En algunas realizaciones, el polinucleótido es una sonda TaqMan[®], una baliza molecular o una sonda Scorpion.
- En algunas realizaciones, una composición comprende al menos una sonda FRET que tiene una secuencia que está presente de forma idéntica en, o complementaria de, una región del ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas realizaciones, una sonda FRET está marcada con un par donante/aceptor de tal manera que cuando la sonda se digiere durante la reacción de PCR, se produce una emisión de fluorescencia única que está asociada con un ARN diana específico. En algunas realizaciones, cuando una composición comprende múltiples sondas FRET, cada sonda está marcada con un par donante/aceptor diferente, de tal manera que cuando la sonda se digiere durante la reacción de PCR, cada una produce una emisión de fluorescencia única que está asociada con una secuencia de la sonda específica y/o el ARN diana. En algunas realizaciones, la secuencia de la sonda FRET es complementaria de una región diana de un ARN diana. En otras realizaciones, la sonda FRET tiene una secuencia que comprende uno o más desapareamientos de bases en comparación con la secuencia de la región diana mejor alineada de un ARN diana.
- En algunas realizaciones, una composición comprende una sonda FRET que consiste en al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos, en la que al menos una parte de la secuencia está presente de forma idéntica en, o complementaria a una región de, el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas realizaciones, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al

menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos de la sonda FRET están presentes de forma idéntica en, o complementaria a una región de, el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. En algunas realizaciones, la sonda FRET tiene una secuencia con uno, dos o tres desapareamientos de bases en comparación con la secuencia o complementaria de un ARNm pequeño de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10.

En el presente documento se divulga un kit que comprende un polinucleótido tratado anteriormente. Un kit puede comprender al menos un cebador y/o sonda tratados anteriormente. Un kit puede comprender al menos una polimerasa, tal como una polimerasa termoestable. Un kit puede comprender dNTP. Los kits para su uso en los métodos de RT-PCR en tiempo real descritos en el presente documento pueden comprender una o más sondas FRET específicas del ARN diana y/o uno o más cebadores para la transcripción inversa de los ARN diana y/o uno o más cebadores para la amplificación de los ARN diana o ADNc producidos por transcripción inversa de los mismos.

En algunas realizaciones, uno o más de los cebadores y/o sondas es "lineal". Un cebador "lineal" se refiere a un polinucleótido que es una sola molécula monocatenaria y, por lo general, no comprende una región corta de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que es complementaria de otra región dentro del mismo polinucleótido, de forma que el cebador forma un dúplex interno. En algunas realizaciones, los cebadores para su uso en la transcripción inversa comprenden una región de al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7 o más nucleótidos contiguos en el extremo 3' que tiene una secuencia que es complementaria de la región de al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7 o más nucleótidos contiguos en el extremo 5' de un ARN diana.

Un kit puede comprender uno o más pares de cebadores lineales (un "cebador directo" y un "cebador inverso") para la amplificación de un ADNc producido por transcripción inversa a partir de un ARN diana, tal como ARNm de CRH, IGF2, KRT20 o ANXA10. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un primer cebador comprende una región de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es idéntica a la secuencia de una región de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos contiguos en una primera ubicación en el ARNm. Adicionalmente, en algunas realizaciones, un segundo cebador comprende una región de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos contiguos que tienen una secuencia que es complementaria de la secuencia de una región de al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 nucleótidos contiguos en una segunda ubicación en el ARNm, de manera que una reacción de PCR usando los dos cebadores da como resultado un amplicón que se extiende desde la primera ubicación del ARNm a la segunda ubicación del ARNm.

El kit puede comprender al menos, al menos tres o al menos cuatro conjuntos de cebadores cada uno de los cuales es para la amplificación de un ADNc producido por transcripción inversa a partir de un ARN diana diferente, incluyendo el ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXA10. El kit puede comprender además al menos un conjunto de cebadores para la amplificación de un ARN de control, tal como un control endógeno y/o un control exógeno.

En algunas realizaciones, las sondas y/o cebadores para su uso en las composiciones descritas en la presente memoria comprenden desoxirribonucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas y/o cebadores para su uso en las composiciones descritas en el presente documento comprenden desoxirribonucleótidos y uno o más análogos de nucleótidos, tales como análogos de LNA u otros análogos de nucleótidos de estabilización de dúplex descritos anteriormente. En algunas realizaciones, las sondas y/o cebadores para su uso en las composiciones descritas en la presente memoria comprenden todos los análogos de nucleótidos. En algunas realizaciones, las sondas y/o cebadores comprenden uno o más análogos de nucleótidos de estabilización de dúplex, tales como análogos de LNA, en la región de complementariedad.

En algunas realizaciones, los kits para su uso en los métodos de RT-PCR en tiempo real descritos en el presente documento comprenden además reactivos para su uso en las reacciones de transcripción inversa y de amplificación. En algunas realizaciones, los kits comprenden enzimas, tales como la transcriptasa inversa, y una ADN polimerasa termoestable, tal como la Taq polimerasa. En algunas realizaciones, los kits comprenden además desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) para su uso en la transcripción inversa y amplificación. En realizaciones adicionales, los kits comprenden tampones optimizados para la hibridación específica de las sondas y los cebadores.

Los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

5. EJEMPLOS

5.1 Ejemplo 1: Detección de cáncer de vejiga de grado alto y de grado bajo

Se evaluaron más de 30 marcadores de ARNm y 20 marcadores de microARN en muestras de tejido de la vejiga y de orina para determinar el panel más preciso para la detección de cáncer de vejiga. Según los resultados de más de 200 muestras de orina utilizando ocho marcadores y el sistema GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA), se seleccionó un panel que consiste en marcadores de ARNm de CRH, IGF2, KRT20, y ANXA10 (con o sin al menos un control endógeno y/o al menos un control exógeno).

Se diseñaron varias composiciones de reacción para su uso en el sistema de GeneXpert®, para la detección de varias combinaciones de ARNm de CRH, IGF2, KRT20 y ANXAIO. En la Tabla 1 se muestran las secuencias de los cebadores y las sondas utilizados para detectar cada uno de los ARN diana mediante RT-PCR cuantitativa en las diversas composiciones de reacción.

Tabla 1: Secuencias de los cebadores y las sondas

Nombre del oligo	Diana	Secuencia	SEQ ID NO	Formul. del reactivo ("TSR")
Ceb. dir. 4 ABLa3a4	ABL	GATCAACACTGCTTCTGATGGCAA	8	CL3, CL4, CL1
Ceb. inv. I ABLa3a4	ABL	CCACCGTTGAATGATGATGAACCAA	9	CL3, CL4, CL1
Sonda 1 ABLa3a4	ABL	F4-CCTCCGAGAGCCGCTTCAAC-Q4	10	CL3
Sonda F6 ABL	ABL	F6-CCTCCGAGAGCCGCTTCAAC-Q6	11	CL4
Sonda F1 ABL	ABL	F1-CCTCCGAGAGCCGC(T-dabsyl)TCAAC-Q1	12	CL1
Dir KRT20	KRT20	TTGAAGAGCTGCGAAGTCAGAT	13	CL3, CL4
Inv KRT20	KRT20	TGAAGTCCTCAGCAGCCAGTT	14	CL3, CL4
Sonda KRT20 (F3)	KRT20	F3-TCAACTGCAAAATGCTCGGTGTGTCC-Q3	15	CL3, CL4
Dir_4 de IGF2	IGF2	CGCGGCTTCTACTTCAGCAG	16	CL3, CL4
Inv_4 de IGF2	IGF2	GCGGAAACAGCACTCCTCAA	17	CL3, CL4
Sonda_2 de IGF2	IGF2	F5-TGTGAGCCGTGCGAGCCGTG-Q5	18	CL3, CL4
Dir de CRH	CRH	ACCCGGCTCACCTGCGAA	19	CL3, CL4, CL1
Inv de CRH	CRH	GGACTCCCGCGGACACAA	20	CL3, CL4, CL1
Sonda 3 de CRH	CRH	F2-TCCTGGGAAGCGAGTGCCCTAA-Q2	21	CL3, CL1
Sonda_F1 de CRH	CRH	F1-CCTGGGAAGCGAG(T-Dabsyl)GCCCTAA-Q1	22	CL4
Directo de Armored RNA®	control exógeno	GGCTATTCTCCTCTTGGCAGAT	23	CL1
Inverso de Armored RNA®	control exógeno	TGCTTGAGCTCCAGTCCCTAAG	24	CL1
Sonda de Armored RNA	control exógeno	F6-AGCCGAGAAGGCGGAGTCTGGC-Q6	25	CL1
ANXA10-DIR	ANXA10	GTGAAACAAGTTTATGCAATCGATCAA	26	CL1
ANXA10-INV3	ANXA10	GATTGAAATTGGGAGCTGGGAA	27	CL1
ANXA10-F3	ANXA10	F3-TCATCCCTGAGGTTAACAATTACCATCAA-Q3	28	CL1

De F1 a F6 son colorantes diferentes de forma detectable que pueden detectarse y distinguirse simultáneamente en

una reacción multiplex y de Q1 a Q6 son inactivadores (en el presente ejemplo, Q2, Q4, Q5 y Q6 son el mismo inactivador).

Las composiciones finales del cebador y la sonda de tres composiciones de reacción diferentes se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Cebadores y sondas en TSR CL3, CL4 y CL1

TSR CL3					
Objetivo	Marcador	Objetivo	Conc. final del cebador directo	Conc. final del Cebador inverso	Conc. final de la sonda
ABL	F4	Normalización (control endógeno)	400 nM	400 nM	150 nM
KRT20	F3	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	75 nM
IGF2	F5	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	200 nM
CRH	F2	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	200 nM
TSR CL4					
Diana	Marcador	Objetivo	Conc. final del cebador directo	Conc. final del cebador inverso	Conc. final de la sonda
ABL	F6	Normalización (control endógeno)	400 nM	400 nM	400 nM
KRT20	F3	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	75 nM
IGF2	F5	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	300 nM
CRH	F1	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	600 nM
TSR CL1					
Diana	Marcador	Objetivo	Conc. final del cebador directo	Conc. final del cebador inverso	Conc. final de la sonda
ABL	F1	Normalización (control endógeno)	400 nM	400 nM	600 nM
Armored RNA [®]	F6	Control exógeno	400 nM	400 nM	400 nM
ANXA10	F3	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	75 nM
CRH	F2	Marcador de cáncer de vejiga	400 nM	400 nM	300 nM

Cada reacción contenía KCl 50-90 mM, MgCl₂ 3-5 mM, dNTP 400-825 μM, Tris 20 mM, pH 8,5, azida sódica al 0,01 % y 0,9 unidades/μl de inhibidor de la ARNasa. Se utilizaron la transcriptasa inversa del MMLV (0,375 unidades/μl) y AptaTaq (0,25 unidades/μl; Roche) para la transcripción inversa y la amplificación, respectivamente. TSR CL1 incluyó un control exógeno Armored RNA[®] (SEQ ID NO: 47; Asuragen, Austin, TX).

Para cada muestra que se va a analizar, se añadieron 5 ml de orina miccionada a 5 ml de conservante (guanidina HCl 3,5 M, 1 % de N-acetil-L-cisteína, citrato de sodio 25 mM y 2,5 % de Tween-20, pH 3,2), preferiblemente en un plazo de 1 hora desde la obtención de la muestra. Las muestras conservadas se transportaron en hielo y se almacenaron a 4 °C. El centro de obtención proporcionó la información clínica para cada muestra. El número de glóbulos rojos por mililitro se determinó mediante evaluación microscópica.

Antes de su uso, se invirtió la orina conservada tres veces para mezclar. Se cargaron 1,2 ml de orina conservada en un cartucho GeneXpert para su análisis. El cartucho contenía un filtro de 0,8 μm para capturar las células uroteliales. Las células capturadas se lavaron y se lisaron mediante sonicación (2-15 segundos, 8-16 μm a 36 kHz) dentro del cartucho. A continuación se utilizó el lisado para reconstituir los reactivos utilizados para la RT-PCR en tiempo (descrito anteriormente). El ciclo de reacción utilizado fue: 10 minutos a 45 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C, y, después, 45 ciclos de (a) de 5 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C, utilizando un cartucho GeneXpert[®] en un sistema GeneXpert[®]. Se calculó el Delta Ct (ΔCt) como la Ct (ABL) – Ct (marcador). El valor de corte de ΔCt se fijó como el ΔCt que dio una especificidad mínima del 95 % con muestras de pacientes que no se espera que tengan cáncer de vejiga (datos no mostrados). Un ΔCt por encima del valor de corte ΔCt para uno

cualquiera de los marcadores se consideró un resultado positivo, indicativo de la presencia de cáncer de vejiga.

5 Algunas muestras también se analizaron usando UroVysion® (Abbott Laboratorios, Abbott Park, IL). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 3 (cáncer de vejiga de grado alto) y en la Tabla 4 (cáncer de vejiga de grado bajo). Los valores de ΔCt por encima del umbral, indicativos de un resultado positivo, se resaltan. Cada uno de los tres lotes de TSR, CL3, CL4 y CL1, detectaron el 100 % de las muestras de cáncer de vejiga de grado alto, al igual que UroVysion®.

10 Para el cáncer de vejiga de grado bajo, la tasa de detección fue del 37 % (7/19), en comparación con solo el 16 % (3/19) para UroVysion®.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 3: Detección de cáncer de vejiga de grado alto

ID de la muestra	Estadio	Grado	Resultado de UroVysion®	Citología	Antecedentes de cáncer de vejiga	Lote de CL3 de TSR			Lote de CL4 de TSR			Lote CL1 de CIC TSR			Resultado de GX
						CRH	KRT20	IGF2	CRH	IGF2	CRH	ANXA10	CRH		
67001	pTa	alto	positivo	sospecha	sí	-10	2,2	-1	4	0,5	-5	-0,5	-3	positivo	
67006	pT1	alto	positivo	positiva	no	-0,7	4,4	-6,2	5,7	-2,8	-0,6	-20	2,2	positivo	
67009	pT2	alto	positivo	positiva	no	-20	4,9	-0,4	4,9	1,5	-20	1,1	-20	positivo	
75211	pT2	alto	positivo	negativa	no	-0,8	1,4	-4,1						positivo	
75216	pTa, C1C	alto	positivo	sospecha	sí	-3,5	2	-0,8	0,9	-0,6	-3,4			positivo	
75218	pTa	alto	positivo	negativa	no	0,9	3,8	-0,9	3,8	-1,6	0,5			positivo	
75245	pTa	alto	positivo	NA	no	20	1,6	6,7	0,4	6,2	20	1,9	8,2	positivo	
75247	C1S	alto	positivo	atípica	no	-1,4	3,4	2,7	3,6	3,7	-3,8	-0,2	0,4	positivo	
75248	pT1/C1S	alto	positivo	atípica	no	-20	4,3	0	4,8	1	-20	0,4	-5,1	positivo	
75249	pT1	alto	positivo	negativa	no	-20	3,3	2,1	3,4	2,5	-20	3,7	-20	positivo	
75258	C1S, pTa	alto	positivo	atípica	no				4,2	-3,7	0,6	-2	1,9	positivo	
75246			positivo	positiva	no	-20	4,3	5,3	4,4	5,9	9,1	-1	3,4	positivo	

Tabla 4: Detección de cáncer de vejiga de grado bajo

ID de la muestra	Estadio	Grado	Resultado de UroVysion®	Citología	Antecedentes de cáncer de vejiga	Lote de CL3 de TSR			Lote de CL4 de TSR			Lote CL1 de CIC			Resultado de GX
						CRH	KRT20	IGF2	CRH	IGF2	KRT20	ANXA10	CRH		
67002	pTa	bajo	negativo	atípica	sí	-10	2,2	-1	4	0,5	4	-0,5	-3	positivo	
67003	pTa	bajo	negativo	negativa	no	-20	-20	-3,2	-20	-20	-20	-20	-20	negativo	
67004	pTa	bajo	negativo	negativa	no	-2	4,7	-2,3	5,2	0,1	-1,7	2,4	2,2	positivo	
67010	pTa	bajo	positivo	atípica	no	-20	-5,3	-8,8	-3,8	-6,7	-20	-5	-20	negativo	
67011	pTa	bajo	positivo	atípica	no	-1,3	4,6	1,9	4	2,4	-2	-1,3	1	positivo	
67018	pTa	bajo	negativo	atípica	sí	-20	-20	-4,4	-20	-20	-20	-20	-20	negativo	
67050	pTa	bajo	negativo	atípica	sí	-20	-0,4	3,4	1,9	3,3	-20	-0,5	-20	positivo	
67100	pTa	bajo	límite	atípica	sí				-2,9	-2,7	-20	-20	-20	negativo	
75161	pTa	bajo	negativo	atípica	sí	-20	-3	-4,7	-3,6	-1,3	-20	-5,7	-20	negativo	
75183	pTa	bajo	positivo	negativa	sí	-1,5	3,1	-2	3,4	-0,5	0,7	-4,1	2,3	positivo	
75184	pTa	bajo	No concluyente	negativa	sí	-20	-0,6	1,3	-1,5	1,8	-20	-20	-20	positivo	
75185	pTa	bajo	negativo	negativa	no	-20	3	5	1,3	4,7	-20	1,2	-4,2	positivo	
75191	pTa	bajo	negativo	negativa	sí	-20	-0,4	-3,4	1,1	-0,5	-20	-4,1	-20	negativo	
75202	pTa	bajo	negativo	negativa	sí	-20	0,3	-2,3	-0,4	-1,5	-20	-2,4	-20	negativo	
75236	pTa	bajo	negativo	negativa	no	-20	-5,7	-7,9	-20	-8,9	-20	-3,2	-20	negativo	
75251	pTa	bajo	negativo	negativa	sí	-20	-3,6	-5,1	-1	-4,4	-20	-20	-20	negativo	
75257	pTa	bajo	negativo	negativa	no				-2,1	-0,9	-20	-20	-20	negativo	
75265	pTa	bajo	negativo	negativa	sí				1,4	-20	-20	-20	-20	negativo	

En la tabla 5 se muestra un resumen de la sensibilidad para el cáncer de de vejiga de grado alto y el cáncer de vejiga de grado bajo, y la especificidad en pacientes con un riesgo bajo de cáncer de vejiga para cada uno de los marcadores individuales analizados en las tablas 3 y 4.

5

Tabla 5: Resumen de la sensibilidad y especificidad de los marcadores individuales

10

Marcador	Sensibilidad, cáncer de vejiga de grado alto	Sensibilidad, cáncer de vejiga de grado bajo	Especificidad, cáncer de vejiga de bajo riesgo
CRH	15/30 (50 %)	9/53 (17 %)	220/221 (99 %)
KRT20	11/21 (52 %)	6/34 (18 %)	144/145 (99 %)
IGF2	13/21 (62 %)	8/34 (24 %)	144/145 (99 %)
ANXA10	5/9 (56 %)	2/19(11 %)	74/76 (97 %)
Combinación de 4 marcadores	12/12 (100 %)	7/19 (37 %)	83/88 (94 %)

15

20

En la Tabla 6 se muestran ejemplos de cebadores y sondas alternativos para la detección de los cuatro marcadores, KRT20, IGF2, CRH, y ANXA10. En la Tabla 6 también muestra un conjunto de cebadores y sondas de ejemplo para la detección de un control exógeno y un control endógeno, ABL. Los colorantes e inactivadores que se muestran en la Tabla 6 son genéricos y dos o más de inactivadores Q1 a Q6 pueden ser el mismo. Un experto en la materia podría seleccionar un conjunto adecuado, por ejemplo un conjunto de colorantes diferentes de forma detectable para su uso en un ensayo multiplex. También se muestra la longitud del amplicón previsto para cada conjunto de cebadores, así como la longitud de cualquier intrón o intrones intermedios entre los sitios de los cebadores en la copia genómica de la diana.

25

30

Tabla 6: Secuencias de los cebadores y las sondas

35

40

45

50

55

60

65

Nombre	5' mod	Secuencia	3' mod	SEQ ID NO	Longitud del amplicón (pb)	Longitud del intrón (pb)
KRT20 Dir_3		CGACTACAGTGCATATTACAGACAA		29	113	2142
KRT20 Inv_2		CAGCAGCCAGTTTAGCATTATCAA		30		
Sonda KRT20	F1	TCAACTGCAAAA(T-dabsyl) GCTCGGTGTGTCC	Q1	31		
Dir_5 de IGF2		GGACCGCGGCTTCTACTTCA		32	95	1701
Inv_5 de IGF2		CCAGGTCACAGCTGCGGAA		33		
Sonda_2_F4 de IGF2	F4	TGTGAGCCGTCGCAGCCGTG	Q4	34		
CRH_Dir 4		TGCGAAGCGCCTGGGAAGC		35	66	801
CRH Rev		GGACTCCCGCGGACACAA		36		
CRH_sonda_F2	F2	TGCCCTAACATGCGGCTGCC	Q2	37		
ANXA10_Dir_3		TCAGCGCTGCAATGCACAA		38	122	22.947
ANXA10_Dir_4		CTGCAATGCACAAAGGATGA		48	117	22.947
ANXA10_Inv_5		GGCCAGCCATCACATCTTTGAA		39		
ANXA10_Sonda_3	F3	TAGAGCATGTATGGCCGGACCT	Q3	40		
Ceb. dir. 4 ABLa3a4		GATCAACACTGCTTCTGATGGCAA		41	92	7666
Ceb. Inv. 1 de ABLa3a4		CCACCGTTGAATGATGATGAACCAA		42		
Sonda F5 de ABL	F5	CCTCCGAGAGCCGCTTCAAC	Q5	43		
Directo de Armored RNA®		GGCTATTCTCCTCTTGGCAGAT		44	101	NA
Inverso de Armored RNA®		TGCTTGAGCTCCAGTCCCTAAG		45		
Sonda de Armored RNA®	F6	AGCCGAGAAGGCGGAGTCTGGC	Q6	46		

5.2 Ejemplo 2: Sensibilidad del ensayo para la detección de cáncer de vejiga mediante el uso del panel de marcadores KRT20, IGF-2, CRH y ANXA10 en una cohorte más amplia

Se obtuvieron muestras de orina de los sujetos en siete centros diferentes. Los criterios de elegibilidad para la inclusión en el estudio fueron:

- 18 años o más;
- consentimiento informado documentado como lo exige la revisión del IRB o el HREC y una declaración de derechos de los sujetos de experimentación firmada para pacientes en California;
- al menos uno de los siguientes criterios:
 - antecedentes o recurrencia de cáncer de vejiga;
 - remisión a evaluación por cistoscopia debido a microhematuria o macrohematuria en la orina;
 - remisión a evaluación urológica, pero sin antecedentes de cáncer de vejiga o pruebas clínicas de cáncer de vejiga;
- consentimiento para proporcionar al menos 15 ml de orina miccionada, además de la requerida para los cuidados de referencia;

- consentimiento para permitir la revelación de los resultados de patología para cualquier espécimen de biopsia tomada durante el procedimiento de cistoscopia y otros registros médicos.

Los criterios de exclusión incluían sólo menores de 18 años de edad y la primera orina miccionada. Los pacientes tratados actualmente o previamente con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) y los pacientes tratados actualmente o previamente con terapia intravesical o resección transuretral de la vejiga o radioterapia para el cáncer de vejiga fueron elegibles para el estudio. Además, también se permitió repetir el reclutamiento durante el curso del estudio.

Dos de los centros de recolección proporcionaron los resultados del análisis UroVysion® en las muestras de orina. Para cada muestra que se va a analizar, se añadieron 15 ml de orina miccionada a hasta 15 ml de conservante (guanidina HCl 3,5 M, 1 % de N-acetil-L-cisteína, citrato de sodio 25 mM y 2,5 % de Tween-20, pH 3,2), preferiblemente en un plazo de 1 hora desde la obtención de la muestra. Las muestras conservadas se transportaron en hielo y se almacenaron a 4 °C. El centro de obtención proporcionó la información clínica para cada muestra.

Antes de su uso, se invirtió la orina conservada tres veces para mezclar. Se cargaron 4 ml de orina conservada en un cartucho GeneXpert para su análisis. El cartucho contenía un filtro de 0,8 µm para capturar las células uroteliales. Las células capturadas se lavaron y se lisaron mediante sonicación (2-15 segundos, 8-16 µm a 36 kHz) dentro del cartucho. A continuación se utilizó el lisado para reconstituir los reactivos utilizados para la RT-PCR en tiempo (descrito anteriormente). El ciclo de reacción utilizado fue: 10 minutos a 45 °C, seguido de 2 minutos a 95 °C, y, después, 45 ciclos de (a) de 5 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y 20 segundos a 72 °C, utilizando un cartucho GeneXpert® en un sistema GeneXpert®. Para ANXA10, KRT20 y IGF2, Se calculó el Delta Ct (ΔCt) como la Ct (ABL) – Ct (marcador). El valor de corte de ΔCt se fijó como el ΔCt que dio una especificidad alta (> 90 %) con muestras de pacientes que no se espera que tengan cáncer de vejiga (datos no mostrados). Un ΔCt por encima del valor de corte ΔCt para uno cualquiera de los marcadores se consideró un resultado positivo, indicativo de la presencia de cáncer de vejiga. Para CRH, se utilizaron los valores de Ct en lugar de ΔCt para determinar la positividad para el marcador de CRH. Un valor de Ct <45 para CRH se consideró un resultado positivo, indicativo de la presencia de cáncer de vejiga. Además de los cuatro marcadores de cáncer de vejiga (KRT20, IGF2, CRH y ANXA10), el ensayo GeneXpert® para cáncer de vejiga incluyó dos controles: cebadores y la sonda para la detección del ARNm de ABL en las muestras, y los cebadores y la sonda para la detección de un ARN de control exógeno Armored RNA®.

En el primer análisis, se analizaron 132 muestras obtenidas de pacientes con resultados positivos en la cistoscopia para el cáncer de vejiga con el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert®. Sesenta de esas muestras también se habían analizado usando UroVysion®. En la Tabla 7 se muestran los resultados para dichas 132 muestras.

Tabla 7: Sensibilidad del ensayo por estadio y grado del cáncer de vejiga

	Vejiga Xpert				UroVysion			
	POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Estadio:								
Todos	94	35	3	72,9 %	29	26	5	52,7 %
Ta, grado bajo	29	23	2	55,8 %	5	18	4	21,7 %
Ta, grado alto	20	2		90,9 %	4	6	1	40,0 %
T1	13	2		86,7 %	6	1		85,7 %
T2	11	2		84,6 %	4	0		100,0 %
T3	3	0		100,0 %	1	0		100,0 %
T4	2	0		100,0 %				
CIS	11	1		91,7 %	7	0		100,0 %
DES	5	5	1	50,0 %	2	1		66,7 %
Grado:								
Todos	94	35	3	72,9 %	29	26	5	52,7 %
Grado bajo	33	28	2	54,1 %	6	19	4	24,0 %
Grado alto	61	7	1	89,7 %	23	7	1	76,7 %
**Dos resultados no válidos se debieron a la Ct baja de ABL, lo que sugiere un número bajo de células de la muestra y uno de los resultados no válidos se debió a la mala calidad de la muestra.								

Como se muestra en la Tabla 7, para estas muestras, el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® tenía una sensibilidad del 54,1 % para el cáncer de vejiga de grado bajo y una sensibilidad del 89,7 % para el cáncer de vejiga de grado alto. Por el contrario, UroVysion® tuvo una sensibilidad de tan solo un 24 % para el cáncer de vejiga de grado bajo y una sensibilidad del 76,6 % para el cáncer de vejiga de grado alto. Además, el ensayo de cáncer de vejiga la GeneXpert® pudo detectar todos los grados y estadios del cáncer de vejiga.

A continuación, el mismo conjunto de datos se dividió en función de tres grupos de pacientes: (A) pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga que en la actualidad estaban siendo controlados para detectar recurrencia del cáncer de vejiga, (B) pacientes que habían sido tratados con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) en los tres meses anteriores a la obtención de las muestras y (C) pacientes que presentaban síntomas de cáncer de vejiga y que no tenían antecedentes de cáncer de vejiga. Los resultados para dichos grupos de pacientes se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Sensibilidad del ensayo por población de pacientes

		Control (población A)							
		Vejiga Xpert*				UroVysion			
		POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Grado:									
	Todos	50	20	1	71,4 %	11	12		47,8 %
	Grado bajo	21	18		53,8 %	2	11	1	15,4 %
	Grado alto	29	2	1	93,5 %	9	1		90,0 %
		Tratado con BCG en los últimos 3 meses (población B)							
		Vejiga Xpert*				UroVysion			
		POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Grado:									
	Todos	4	2		66,7 %	1			100,0 %
	Grado bajo								
	Grado alto	4	2		66,7 %	1			100,0 %
		Sintomáticos (población C)							
		Vejiga Xpert*				UroVysion			
		POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Grado:									
	Todos	40	13	2	75,5 %	17	14	4	54,8 %
	Grado bajo	12	10	2	54,5 %	4	8	3	33,3 %
	Grado alto	28	3		90,3 %	13	6	1	68,4 %
		**Dos resultados no válidos se debieron a la Ct baja de ABL, lo que sugiere un número bajo de células de la muestra y uno de los resultados no válidos se debió a la mala calidad de la muestra.							

Como se muestra en la Tabla 8, el ensayo para cáncer de vejiga GeneXpert® tenía una sensibilidad similar para el cáncer de vejiga de grado bajo y de grado alto en pacientes que están siendo controlados para detectar cáncer de vejiga y en pacientes con síntomas de cáncer de vejiga como en el grupo de pacientes como un todo (véase la Tabla 7). En los pacientes tratados con BCG en los últimos tres meses, el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® tenía una sensibilidad del 66,7 %, aunque el tamaño de la muestra era demasiado pequeño (6 muestras) para extraer conclusiones a partir de dicho resultado.

Con el fin de tener una comparación directa ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® y UroVysion®, se seleccionó un conjunto de datos que incluía solo las muestras que se habían analizado en ambos ensayos. En la Tabla 9 se muestran los resultados para ese conjunto de datos, con los pacientes separados en dos grupos: (A y B) pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga que en la actualidad estaban siendo controlados para detectar recurrencia del cáncer de vejiga combinados con pacientes tratados con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) en los tres meses anteriores a la obtención de las muestras (estos grupos se combinaron porque solo se había analizado con los dos ensayos una muestra de un paciente tratado con BCG) y (C) pacientes que presentaban síntomas de cáncer de vejiga y que no tenían antecedentes de cáncer de vejiga.

Tabla 9: Sensibilidad del ensayo para muestras analizadas con GeneXpert® y UroVysion®

		Control y tratados con BCG (poblaciones A y B)							
		Vejiga Xpert				UroVysion			
		POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Grado:									
Todos		18	7	1	72,0 %	12	13	1	48,0 %
Grado bajo		6	7	1	46,2 %	2	12		14,3 %
Grado alto		12	0		100,0 %	10	1	1	90,9 %
		Sintomáticos (población C)							
		Vejiga Xpert				UroVysion			
		POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad	POS	NEG	No concluyente	Sensibilidad
Grado:									
Todos		26	8	1	76,5 %	17	14	4	54,8 %
Grado bajo		7	7	1	50,0 %	4	8	3	33,3 %
Grado alto		19	1		95,0 %	13	6	1	68,4 %

Como se muestra en la Figura 9, para las muestras que se han analizado tanto con el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® como con UroVysion®, el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® demostró una mayor sensibilidad que UroVysion® para la detección de cáncer de grado bajo y de grado alto en ambos grupos de pacientes.

A continuación, el conjunto de datos se dividió en muestras que se habían archivado, lo que significa que se analizaron más de una semana después de la obtención (las muestras variaron de 8 días de edad hasta nueve meses de edad) y las muestras que eran frescas, lo que significa que se analizaron una semana después de la obtención. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: sensibilidad del ensayo en muestras archivadas y recién preparadas

Muestras archivadas					
Vejiga Xpert					
	n	POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad
Grado:					
Todos	89	61	25	3	70,9 %
Grado bajo	46	23	21	2	52,3 %
Grado alto	43	38	4	1	90,5 %
Muestras recién preparadas					
Vejiga Xpert					
	n	POS	NEG	Inválido/ Error**	Sensibilidad
Grado:					
Todos	43	33	10		76,7 %
Grado bajo	17	10	7		58,8 %
Grado alto	26	23	3		88,5 %
**Dos resultados no válidos se debieron a la Ct baja de ABL, lo que sugiere un número bajo de células de la muestra y uno de los resultados no válidos se debió a la mala calidad de la muestra.					

Como se muestra en la Tabla 10, el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® tenía una sensibilidad similar para la detección de vejiga de grado bajo y de grado alto en muestras recién preparadas y archivadas.

5.3 Ejemplo 3: Especificidad del ensayo para la detección de cáncer de vejiga mediante el uso del panel de marcadores KRT20, IGF-2, CRH y ANXA10 en una cohorte más amplia

Además de las muestras de pacientes con resultados positivos en la cistoscopia para el cáncer de vejiga, las muestras de orina se recogieron en los siete centros de pacientes con resultados negativos en la cistoscopia para el cáncer de vejiga, pero que se estaban controlando para detectar recurrencia del cáncer de vejiga, habían recibido BCG en los últimos tres meses antes de la obtención de las muestras y que parecían presentar síntomas de cáncer de vejiga, pero no tenían antecedentes de cáncer de vejiga. Además, las muestras de orina se recogieron de pacientes con remisiones a urología por sospecha de otras afecciones, tales como cálculos renales. Finalmente, se obtuvieron muestras de orina de individuos sanos. Las muestras de orina se conservaron y se analizaron usando el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert®, tal como se describe en el Ejemplo 2.

Para las muestras de pacientes con resultados negativos en la cistoscopia para el cáncer de vejiga, los resultados de los ensayos se dividieron de acuerdo con los tres grupos de pacientes: (A) pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga que en la actualidad estaban siendo controlados para detectar recurrencia del cáncer de vejiga, (B) pacientes que habían sido tratados con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) en los tres meses anteriores a la obtención de las muestras y (C) pacientes que presentaban síntomas de cáncer de vejiga y que no tenían antecedentes de cáncer de vejiga. Los resultados para dichos grupos de pacientes se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Especificidad del ensayo en pacientes con cistoscopia negativa por población

Control (población A)			
Vejiga Xpert			
POS	NEG	Inválido/ Error	Especificidad
55	156	17	73,9 %
Tratados con BCG (población B)			
Vejiga Xpert			
POS	NEG	Inválido/ Error	Especificidad
1	6	0	85,7 %
Sintomáticos (población C)			
Vejiga Xpert			
POS	NEG	Inválido/ Error	Especificidad
16	86	10	84,3 %

Como se muestra en la Tabla 11, el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® tenía una especificidad del 73,9 %, 85,7 % y 84,3 % para los grupos de pacientes (A), (B) y (C), respectivamente.

A continuación, se determinó la especificidad del ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® en pacientes que eran sospechosos de tener otras afecciones urológicas, pero no cáncer de vejiga. Se recolectaron setenta muestras de pacientes en esta categoría. Los resultados con el ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® fueron 14 resultados positivos, 50 negativos y 6 no válidos. Por tanto, la especificidad del ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® para esta población de pacientes fue del 78,1 %.

Por último, la especificidad del ensayo de cáncer de vejiga GeneXpert® se determinó en individuos sanos. Se recolectaron cincuenta y cinco muestras en esta categoría. Los resultados fueron 4 positivos y 51 negativos, lo que indica una especificidad del 92,7 % para esta categoría de sujetos.

45
50
55
60
65

Tabla de determinadas secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	ARNm de la CRH humana	TCGTTCCCTG GCAGGGCCCT ATGATTTATG CAGGAGCAGA GGCAGCACGC AATCGAGCTG TCAAGAGAGC GTCAGCTTAT TAGGCAAATG CTGCGTGGTT TTTGAAGAGG GTCGACACTA TAAATCCCA CTCCAGGCTC TGGAGTGGAG AAACTCAGAG ACCAAGTCCA TTGAGAGACT GAGGGGAAAAG AGAGGAGAGA AAGAAAAAGA GAGTGGGAAC AGTAAAGAGA AAGGAAGACA ACCTCCAGAG AAAGCCCCCG GAGACGTCTC TCTGCAGAGA GCGGCGCAGA CCCGGCTCAC CTGCGAAGCG CCTGGGAAGC GAGTGCCCTT AACATGCGGC TGCCCGTGCT TGTGTCCGGG GGAGTCTCTG TGGTGGCTCT CCTGCCCTGC CCGCCATGCA GGGCGCTCCT GAGCCGCGGG CCGGTCCCGG GAGCTCGGCA GGCGCCGCA CACCCCTCAG CCTTGGATTT CTTCCAGCCG CCGCCGAGT CCGAGCAGCC CCAGCAGCCG CAGGCTCGGC CGGTCTCTGCT CCGCATGGGA GAGGAGTACT TCCTCCGCCT GGGGAACCTC AACAAGAGCC CCGCCGCTCC CCTTTCGCCC GCCTCCTCGC TCCTCGCCGG AGGCAGCGGC AGCCGCCTT CGCCGGAAAC GGCGACCCGC AACTTTTTC GCGTCTTGCT GCAGCAGCTG CTGTGCCTC GCGGCTCGCT CGACAGCCCC GCGGCTCTCG CGGAGCGCGG TGCTAGGAAT GCCCTCGGGG GCCACCAGGA GGCACCGGAG AGAGAAAGGC GGTCCGAGGA GCCTCCCATC TCCCTGGATC TCACCTTCCA CCTCCTCCGG GAAGTCTTGG AAATGGCCAG GGCCGAGCAG TTAGCACAGC AAGCTCACAG CAACAGGAAA CTCATGGAGA TTATTGGGAA ATAAAACGGT GCGTTTGGCC AAAAAGAAATC TGCATTTAGC ACAAAAAAAA TTTAAAAAAA TACAGTATTC TGTACCATAG CGCTGCTCTT ATGCCATTTG TTTATTTTTA TATAGCTTGA AACATAGAGG GAGAGAGGGA GAGAGCCTAT ACCCCTTACT TAGCATGCAC AAAGTGATTT CACGTGCAGC AGCAACACAA TGTATTTCGT TTTGTCTACG TTTAGTTTCC GTTTCCAGGT GTTTATAGTG GTGTTTTAAA GAGAATGTAG ACCTGTGAGA AAACGTTTTG TTTGAAAAAG CAGACAGAAG TCACTCAATT GTTTTTGTGT TGTAAGCTCT TTGAAACAAC TTTCTCTTGT AAACGTTTCA GTAATAAAAC ATCTTTCCAG TCCTTGGTCA GTTTGGTTGT GTAAGAGAAT GTTGAATACT TATATTTTTA ATAAAAGTTG CAAAGGTAAT CATG
2	Variante 2 del transcrito del ARNm de IGF2 humana	CCGCTAATGT ACCATGCCCT GGTGCTGGAA AGTGCCTGAG CCAGCTGCCC CAGCGGCCCTC AGCACTACCA AGTTGGCACA AAGCTCCCCA AATTCCGGAGG GGCTCAGGGA AACGAGTGGG GGGGATGAGG AGGTGAGGGG TAAACCCATC ATTTCAATTG GCATTTGAGC AGGTGCCATG CTCAGCGGAG ATGAGGCTCT CCCATCTGTA GGGGCCGTAT TAACATGCAC ACTCTAAAAG TGCCCTTCGT TTCTCCAGCC TCAGCTTTGT CCCTCTCCTC CTCCACGTCA ACCTGGCCAG AGGTCTTGGA CGCCACAGCC AGGGCACCCC CTGCTTTGGT GGTGACTGCT AATATTGGCC AGGCCGGCGG ATCATCGTCC AGGCAGTTTC GGCAGAGAGC CTTGGGCACC AGTGACTCCC CCGTCTCTCT TATCCACTGT CCAGGAGCTG CGGGGACTGC GCAGGGACTA GAGTACAGGG GCCGAAGAGT CACCACCGAG CTTGTGTGGG AGGAGGTGGA TTCCAGCCCC CAGCCCCAGG CCTCTGAATC GCTGCCAGCT CAGCCCCCTG CCCAGCCTGC CCCACAGCCT GAGCCCCAGC AGGCCAGAGA GCCCAGTCTT GAGGTGAGCT GCTGTGGCCT GTGGCCAGG CGACCCAGC GCTCCAGAA CTGAGGCTGG CAGCCAGCCC CAGCCTCAGC CCCAACTGCG AGGCAGAGAG ACACCAATGG GAATCCCAAT GGGGAAGTCCG ATGCTGGTGC TTCTCACCTT CTTGGCCTTC GCCTCGTGTG GCATTTGCTGC TTACCGCCCC AGTGAGACCC TGTGCGGCGG GGAGCTGGTG GACACCTCC AGTTCGTCTG TGGGGACCGC GGCTTCTACT TCAGCAGGCC CGCAAGCCGT GTGAGCCGTC GCAGCCGTGG CATCGTTGAG GAGTGTGTT TCCGCAGCTG TGACCTGGCC CTCCTGGAGA CGTACTGTGC TACCCCGGCC AAGTCCGAGA GGGACGTGTC GACCCCTCCG ACCGTGCTTC CGGACAACCT CCCCAGATAC CCCGTGGGCA AGTTCTTCCA ATATGACACC TGGAAAGCAGT CCACCCAGCG CCTGCGCAGG GGCCTGCCTG CCCTCCTGCG TGCCCGCCGG GGTACAGTGC TCGCCAAGGA GCTCGAGGCG TTCAGGGAGG CCAAACGTCA CCGTCCCTG ATTGCTCTAC CCACCAAGA CCCCAGCCAC GGGGGCGCCC CCCCAGAGAT GGCCAGCAAT CGGAAGTGAG CAAAACCTGCC GCAAGTCTGC AGCCCGCGC CACCATCTCT CAGCCTCCTC CTGACCACGG ACGTTTCCAT CAGGTTCCAT CCCGAAAATC TCTCGGTTCC ACGTCCCTT GGGGCTTCTC CTGACCCAGT CCCCGTGCCC CGCCTCCCCG AAACAGGCTA CTCTCCTCGG CCCCCTCCAT CGGGCTGAGG AAGCACAGCA GCATCTTCAA ACATGTACAA AATCGATTGG CTTTAAACAC CCTTCACATA CCCCCTCCCC AAATTATCCC CAATTATCCC CACACATAAA AAATCAAAAC ATTTAAACTAA CCCCCTTCCC CCCCCCCCAC AACACCCCTC TTAAAATAA TTGGCTTTTT AGAAACACCC CACAAAAGCT CAGAAATTGG CTTTAAAAAA AACACCACC AAAAAAATC AATTGGCTAA

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		AAAAAAAAAG TATTAAAAAC GAATTGGCTG AGAAACAATT GGCAAAATAA
		AGGAATTTGG CACTCCCCAC CCCCCTCTTT CTCTTCTCCC TTGGACITTTG
		AGTCAAAATIG GCCTGGACTT GAGTCCCTGA ACCAGCAAAG AGPAAAAGAG
		GACCCCAAGAA ATCACAGGTG GGCACGTGGC TGCTACCCGC ATCTCCCTTC
		TCACGGGAAT TTTCAGGGTA AACTGGCCAT CCGAAAATAG CAACAAACCA
		GACTGGCTCC TCACCTCCCTT TTCCATCAC TAAAAACAGA GAGCAGTCAG
		AGGGACCCAG TAAGACCCAA GAGGGGGAGG ACAGAGCCTG AAAACCCAAA
		TCATGCAAAA TGAATGTAA ITGGCACCAC CCTCACCCCC AAATCTTACA
		TCCTCAATTCC CATCCTAATA AGCACTCATA CTTTATGCAT CCCCAGACT
		ACACACACAC AACACACAGC ACACGCATGA ACACAGCACA CACACGAGCA
		CAGCACACAC ACAACAGCAC AGCACACACA GCACACAGAT GAGCACACAG
		CACACACACA AACGCACAGC ACACACACGC ACACACATGC ACACACAGCA
		CACAAACCCA CGGCACACAC ACGCACACAC ATGCACACAC AGCACACACA
		CAAAACGCACA GCACACACAA ACGCACAGCA CACACGCACA CACAGCACAC
		ACACGAGCAG ACAGCACACA AACGCACAGC ACACGCACAC ACATGCAAC
		ACAGCACACA CACTAGCACA CAGCACACAC ACAAGACAC AGCACACACA
		TCCACACACA GCACACACAC CCGAACACAG CACACACGAA CACACACAC
		ACAGCACACA CACAAACACA GCACACACAT GCACACAGCA CACGCACACA
		CAGCACACAC ATGAAACACAG CACACAGCAC ACACATGCAC ACACAGCAC
		CACGCATGCA CAGCAACAT GAACACAGCA CACACACAAA CAACACAGCA
		ACACATGCAC ACACACACA CACACTCATG CCGACACAT ACATGAACAC
		AGCTCACACC ACACAACAC CCGACACACA CGTTGCACAC CCAAGCACCC
		ACCTGCACAC ACACATGCCG ACACACACGC ACACCCCCAC AAAATTTGGT
		GAAAAAATA AGCATATCTA AGCAACTACG ATATCTGTAT GGATCAGGGC
		AAAGTCCCGC TAAGATTCTC CAATGTTTTT ATGGTCTGAG CCCCCTCCCT
		GTTCCTATCT CCACCTCCCC TCGGCCCTCT CTGTGCCCTG CCTCTCAGAG
		GAGGGGGTIC AGATGTTGGC CCTGAGTGT GCGGCCGGCG GCATTTGGGA
		TACACCCGTA GGGTGGGGG GGTGTGTCCC AGGCCAATT CCTCTTTCC
		ACCATGACAG AGATGCTCTT CTGAGGGCTGG CCTCTTTGGC GCTGTCTCCC
		ACGGCCCGCG CAGCGTGGAG CACGATGCTC CCTATACCC ACCCATTTCC
		GATACACCTT ACTTACTGTG TGTGGCCCA GCCAGAGTGA GGAAGGAGTT
		TGSCACACTT GGAGATGGCG GTAGCTGAGC AGACATGCC CCACGAGTAG
		CCTGACTCCC TGGTGTGCTC CTGGAAGGAA GATCTTGGGG ACCCCCCAC
		CAGGACACAC CTAGGGATCA TCTTTGGGGG TCTCTTGGGG ACCCCCAAG
		AAATGTCCAG TCTCTGGGG CCTGCACTG ATCGGGGAG TGTGGGAGCT
		CTGGCGGTIG GAGGSSTTGG TGGGGGGCAG TGGGGGCTGG CCGGGGGGAG
		TTCTGGGGTA GGAAGTGGTC CCGGGGAGAT TTGGATGGAA AAGTCAGGAG
		GATTGACAGC AGACTTGCAG AATTACATAG AGAAATTAGG AACCCCAAA
		TTTCATGTCA ATTGATCTAT TCCCCTCTT TGTTCCTTGG GGCATTTTTC
		CTTTTITIT TTTTITITTT ITTTTTTIAC CCTCTCTAG CTTTATGCCG
		TCAGAAACCA AATTAAACCC CCCCCCATG TAACAGGGGG GCAGTGACAA
		AAGCAAGAAC GCACGAGCC AGCCTGGAGA CCACCACGTC CTGCCCCCGG
		CGATTTATCG CCTGATTTG ATTTTGTIT TCATCTGTCC CCGTGTCTDG
		GSITGAGTIG AGGGTGGAG CTCTTGGGG GCACCTGGCA CTGAGCCCCC
		TTGGACAAC TACAGGGGAG TGGAGAAGCC CACTCTCCGG CCTGCCTCT
		GSGGACAGTG GCTGTTCCCC AGAAGTCTTG AGGGCGGAGG GGGGGGTTGG
		GCAGGGTCTC CTCAGTGTG AGGAGGGTGC TCGGAGGCCA CAGGAGGGGG
		CTCTGGCTG CCTGAGGCT GCGCGGAGGG GAAGGGGCTA GCAGGTGTGT
		AAACAGAGGG TTCCATCAGG CTGGGGCAGG GTGGCCGCTT TCCGCACACT
		TGAGGAACCC TCCCCTCTCC CTCGGTGACA TCTTGGCCGC CCTCAGCAC
		CCTGCCTTGT CTCCAGGAG TCCGAAGCTC TGTGGGACCT CTTGGGGGCA
		AGGTGGGTIG AGGCSSGGGA GTAGGGAGCT CAGGGGGTTC TGAGCCACA
		GAGCAGGAGA GCTGCTAGGT CTGCCCATCG ACCAGGTTCG TTGGGCCCGG
		CAGCCCAAGG GTCTGATGAT CCGATAGCAG CCACCACCG CCGCCCTAGG
		CTTGGCGGAG GGACTCGGCC TCTGGGAGGT TTACCTCGCC CCTACTTGTG
		CCCCAGCTC AGCCCCCTG CACGCAGCCC GACTAGCAGT CTAGAGGCTT
		GAGGCTTCTG GGTCTGGTG ACGGGGCTGG CATGACCCCG GGGTCTGTCC
		ATGCCAGTCC GCTCTAGTCC CAGAGGGTCC CTCGGCAAGC GCGCTGTGAG
		TGGCCATTC GGAACATTTG ACAGAAGCCC AAAGAGCCAA ATGTTCACAA
		TTGTGAAC CACATGGCC TGAGATCCAA AACGCTTCGA GGCACCCCAA
		ATTACCTGCC CATCTCTCAG GACACCCACC CACCCAGTGT TATATTCTGC
		CTGGCCGGAG TGGGTGTTCC GGGGGGCAC TTGCCGACCAG CCCCCTGGCT
		CCCCAGGTT GCAGCTCTCC CCTGGGCCAC TAACCATCTT GCGCCGGGCT
		CCCTGTCTGA CCTCTTGC CCTTCTGTGC TCTCCATCTT CTCTCTTCCC
		CSTGTCCCCA ATGCTTTCAG TGGGGGGCCC CCTCTGGGT CCCCCTCTCT
		GCATACACCT GAAGACCCCC ACGCCAAACA CTGAATGTCA CCTGTGCCCTG
		CTCCCTCGST CCACCTTGGC GCCCGTGTCT GACTCAACTC AACCTCTTCA
		ACGCTAATAT TTCCSSCAA ATCCCATGCT TGGGTTTTGT CTTTAACTCT

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
3	Variante 1 del transcrito del ARNm de IGF2 humana	<p>CGCCTGTCCC CCTCCCGAGG CCGGGGCTCG CGACGGCAGA GGGCTCCGTC</p> <p>GGCCCAAACC GAGCTGGGGG CCGCCGGTCC GGGTGCAGCC TCCACTCCGC</p> <p>CCCCCAGTCA CCGCCTCCCC CGGCCCTCG ACGTGGCGCC CTCCCCTCGG</p> <p>CTTCTCTGTG CTCCCGGGC CCTCTTGGC GTCGGGCCCC GGGCCCCGCT</p> <p>CTTCTCCCG CAACCTTCCC TTGGCTCCCT CCGCTCCCCC CCAGCTCCTA</p> <p>GCCTCCGACT CCGTCCCCC CTCACGCCG CCGTCTCGCC TTCCCGGAC</p> <p>CAAGTGGAT TAAATACAG CTTTCTGTTT CTCTCCGTGC TGTTCTCTCC</p> <p>CGCTGTGGC CTGCCCCGCT CTGGCTGTCC TCTCTCCCC TCGCCCTCTC</p> <p>TTCCGGCCCC CCGTTTCACC TTCACTCTGT CTCCCCCACT ATCTCTGCCC</p> <p>CCCTCTATCC TTGATACAAC AGCTGACCTC ATTTCCCGAT ACCTTTTCCC</p> <p>CCCCGAAAAG TACAACATCT GGGCCGCCCC AGCCCGAAGA CAGCCCGTCC</p> <p>TCCCTGGACA ATCAGACGAA TTCTCCCCC CCCCCAAAA AAAAGCCATC</p> <p>CCCCCGCTCT GCCCCGTCCG ACATTCGGCC CCGCGGACTC GGGCAGAGGC</p> <p>GGCTGGCAG AGGAGTGTCC GGCAGGAGGG CCAAGGCCCG CTGTTCGGTT</p> <p>TGCGACACGC AGCAGGGAGG TGGGGGCGC CGTCCCGCC TTCCAGACAC</p> <p>CAATGGGAT CCCAATGGGG AAGTCTGATC TGGTGTCTCT CACCTCTCTG</p> <p>GCCTTCGCCT CGTGTGCAT TGCTGCTTAC CGCCCCAGTG AGACCTGTG</p> <p>CGCGGGGAG CTGGTGGACA CCTCCAGTT CGTCTGTGG GACCGGGGCT</p> <p>TCTACTTCAG CAGGCCCGCA AGCCGTGTGA GCGCTCCGAG CCGTGGCACC</p> <p>GTGAGGAGT GCTGTTTCCG CAGCTGTGAC CTGGCCCTCC TGGAGACGTA</p> <p>CTGTGCTACC CCGGCAAGT CCGAGAGGGA CGTGTGACC CCTCCGACCG</p> <p>TGCTTCCGGA CAACTTCCCC AGATACCCC TGGGCAAGTT CTTCCAATAT</p> <p>GACACCTGGA AGCAGTCCAC CCAGCCCTCG CGCAGGGGCC TGCTTCCCT</p> <p>CCTGGGTGCC CGCCGGGGTC ACGTGTCTCG CAAGGAGCTC GAGGCGTTCA</p> <p>GGGAGGCCAA ACGTCAACGT CCGCTGATG CTCACCCAC CCAAGACCCC</p> <p>GCCACGGGG GCGCCCCCCC AGAGATGGCC AGCAATCGGA AGTGAGCATA</p> <p>ACTGGCCGAA GTCTGCAGCC CCGCGCCACC ATCTCTGAGC CTCTCTCTGA</p> <p>CCACGGAGCT TTCCATCAGG TTCCAATCCG AAAATCTCTC GGTTCAGCT</p> <p>CCCCCTGGG CTCTCTCTGA CCGAGTCCCC GTGCCCCGCC TCCCCGAAC</p> <p>AGGCTACTCT CTTCCGGCCC CTCCATCGGG CTGAGGAAGC ACAGCAGCAT</p> <p>CTTCAAAAT GTACAAAATC GATTTGCTTT AAAACACCTTT CACATACCTT</p> <p>CCCCCAAAAT TATCCCCAAT TATCCCCACA CATAAAAAAT CAAAACATTA</p> <p>AATAACCCC CTCCCCCCCC CCCCCAACA ACCCTCTTA AACTAATTGG</p> <p>CTTTTTAGAA ACACCCACCA AAGGCTCAGA AATTGGCTTT AAAAAAACA</p> <p>ACCACCAAAA AAAATCAATT GGTAAAAAA AAAAAGTATT AAAAAAGAT</p> <p>TGGCTCAGAA ACAATTGGCA AAATAAAGGA ATTTGGCACT CCCCACCCC</p> <p>CTCTTTCTCT TCTCCCTTGG ACTTTGAGTC AAAATGGCCT GGACTTGAAT</p> <p>CCCTGAACCA GCAAGAGAA AAGAGGAGCC CCAGAAATCA CAGGTGGGCA</p> <p>CGTCCGTCT ACCGCCATCT CCTTCTCAC GGGAAATTTT AGGGTAAACT</p> <p>GGCCATCCGA AAATAGCAAC AACCCAGACT GGCCTCCAC TCCCTTTTCC</p> <p>ATCAGTAAAA ATCAGCAGGC AGLCAGAGGG ACCCAGTAAG ACCAAAAGGAG</p> <p>GGGAGGACAG AGCATGAAAA CCAAAATCCA TGCAAAATGAA ATGTAATTGG</p> <p>CACGACCCCT ACCCCCAAT CTTACATCTC AATTCCCATC CTA AAAAGCA</p> <p>CTCATACTTT ATGCATCCCC GCAGCTACAC ACACACACAC CACAGCACAC</p> <p>GCATGAACAC AGCACACACA CGAGCACAGC ACACACACAA ACCCACAGCA</p> <p>CACACAGCAC ACAGATGAGC ACACAGCACA CACACAAAGC CACAGCACAC</p> <p>ACACGCACAC ACATGCACAC ACAGCACACA AACGCACGGC ACACACACGC</p> <p>ACACACATGC ACACACAGCA CACACACAAA CGCACAGCAC ACACAAACGC</p> <p>ACAGCACACA CGCACACACA GCACACACAC GAGCACACAG CACACAAACG</p> <p>CACAGCACAC GCACACACAT GCACACACAG CACACACACT AGCACACAGC</p> <p>ACACACACAA AGACACAGCA CACACATGCA CACACAGCAC ACACACCGGA</p> <p>ACACAGCACA CACGAACACA GCACACACAG CACACACACA AACACAGCAC</p> <p>ACACATGCAC ACAGCACACG CACACACAGC ACACACATGA ACACAGCACA</p> <p>CAGCACACAC ATGCACACAC AGCACACAGC CATGCACAGC ACACATGAAC</p> <p>ACAGCACACA CACAAACACA CAGCACACAC ATGCACACAC AGCACACACA</p> <p>CTCATGCGCA GCACATACAT GAACACAGCT CACAGCACAC AAACACGAG</p> <p>CACACAGCTT GCACACGCAA GCACCCACCT GCACACACAC ATGCGCACAC</p> <p>ACACGCACAC CCCCACAAAA TTGGATGAAA ACAATAAGCA TACTTAAGCA</p> <p>ACTACGATAT CTGTATGGAT CAGGCCAAG TCCCGCTAAG ATCTCCAAT</p> <p>GTTTTCATGG TCTGAGCCCC GCTCTGTTC CCACTTCCAC TGCCCTTCGG</p> <p>CCCTGTCTGT GCCCTGCCTC TCAGAGGAGG GGGCTCAGAT GGTGCGGCCCT</p> <p>GAGTGTGGG CCGCGGCAT TTGGGATACA CCGTAGGGT GGGCGGGGTG</p> <p>TGTCACAGGC CTAATTCCAT CTTTCCACCA TGACAGAGAT GCCTTGTGA</p> <p>GGCTGGCCTC CTTGGCGCCT GTCCCCAGG CCCCCGAGC GTGAGCCACG</p> <p>ATGCTCCCCA TACCCCACCC ATTCCCGATA CACCTTACTT ACTGTGTGTT</p> <p>GGCCAGCCA GAGTGAGGAA GGAGTTGGC CACATTGGAG ATGGCGGTAG</p>

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		CTGAGCAGAC ATGCCCCAC GAGTAGCCTG ACTCCCTGGT GTGCTCCTGG AAGGAAGATC TTGGGGACCC CCCCAACCGA GCACACCTAG GGATCATCTT TGCCCGTCTC CTGGGGACCC CCCAAGAAAT GTGGAGTCTT CGGGGGCCCGT GCACTGATGC GGGGAGTGTG GGAAGTCTGG CGGTTGGAGG GGTGGGTGGG GGGCAGTGGG GGCTGGGCGG GGGGAGTTCT GGGGTAGGAA GTGGTCCCGG GAGATTTTGG ATGGAAAAGT CAGGAGGAT GACAGCAGAC TTGCAGAATT ACATAGAGAA ATTAGGAACC CCCAAATTC ATGTCAATTG ATCTATTCCC CCTCTTTGTT TCTTGGGGCA TTTTTCCTTT TTTTTTTTTT TTIGTTTTTT TTTTACCCTT CCTAGCTTT ATGCGCTCAG AAACCAAATT AAACCCCCCC CCCATGTAAC AGGGGGGCG TGACAAAAGC AAGAACGCAC GAAGCCAGCC TGGAGACCAC CACGTCCTGC CCCCCGCAT TTAATGCTT GATTGGATT TGTTTTTTCA CTGTCCCTGT TGCTTGGGTT GAGTTGAGGG TGGAGCCTCC TGGGGGGCAC TGGCCACTGA GCCCCCTTGG AGAAGTCAGA GGGGAGTGGG GAAGGCCACT GTCCGGCCTG GCTTCTGGGG ACAGTGGCTG GTCCCCAGAA GTCTGAGGG CGGAGGGGGG GGTGGGCGAG GGTCTCCTCA GGTGTACGGA GGGTGTCTCG AGGCCACAGG AGGGGGCTCC TGGCTGGCCT GAGGCTGGCC GGAGGGGAAG GGGCTAGCAG GTGTGTAAC AGAGGGTTC ATCAGGCTGG GGCAGGGTGG CCGCCTTCCG CACACTTGAG GAACCCTCC CTCTCCCTCG GTGACATCTT GCCCGCCCT CAGCACCTG CCTGTCTCC AGGAGGTCGG AAGCTCTGTG GGACCTCTG GGGCAAGGT GGGGTGAGGC CGGGGAGTAG GGAGGTCAGG CGGGTCTGAG CCCACAGAGC AGGAGAGCTG CCAGGTCTGC CCATCGACCA GGTGTCTTGG GCCCGGAGC CCACGGGTCT GGTGATGCCA TAGCAGCCAC CACCGCGCG CCTAGGGCTG CGGCAGGAC TCGGCCCTG GGAGGTTTAC CTGCCCCCA CTGTGCCCC CAGCTCAGCC CCCCTGCAGC CAGCCGACT AGCAGTCTAG AGGCCTGAGG CTCTGGGCT CTGGTACGGA GGTGGCATG ACCCGGGGG TCGTCCATGC CAGTCCGCT CAGTCGCA GGTCCCTCG GCAAGCGCC TGTGAGTGG CCATTCCGAA CATTGGACAG AAGCCAAAG AGCCAAATTG TCACAATTGT GGAACCCACA TTGGCCTGAG ATCCAAAACG CTTGAGGCA CCCCAAATTA CTGCCCCATT CGTCAGGACA CCCACCCACC CAGTGTATA TTCTGCCTCG CCGGAGTGGG TGTCCCGGG GGCCTTGGC GACCAGCCCC TTGCGTCCCC AGGTTTGCAG CTCTCCCTG GGCCACTAAC CATCCTGGCC CGGGCTGCCT GTCTGACCTC CGTGCCTAGT CGTGGCTCTC CATCTGTCT CCTCCCGTG TCCCAATGT CTTCAGTGGG GGCCTCCCTC TGGGTCCCC TCCTTGCCA TCACCTGAAG ACCCCACCG CAAACACTGA ATGTCACCTG TGCCTGCCG CTGGTCCAC CTGCGGCC GTGTTTACT CAACTCAACT CCTTAAACGC TAAATATTCC GGCAAAATCC CATGCTTGGG TTTTGTCTT AACCTGTAA CGCTTGAAT CCCAATAAAG CATTAAAGT CATGAAAAA AAAAAAATAA AA
4	Variante 3 del transcrito del ARNm de IGF2 humana	GGCCGCGCGC CCTCAGGACG TGGACAGGGA GGGCTTCCCC GTGTCCAGGA AAGCGACCGG GCATTGCCCC CAGTCTCCCC CAAATTTGGG CATTGTCCCC GGGTCTTCCA ACGGACTGGG CGTTGCTCCC GGACTGAG GACTGGCCCC GGGTCTCGC TCACCTTCAG CAGCGTCCAC CGCTGCAC AGAGCGTTCCG ATCGCTCGCT GCCTGAGCTC CTGGTGGCC CGCGGACGCA GCCTCCAGCT TCGCGGAGAT GGTTCGCCA GACCCCAAA TTATCGTGGT GGCCCGCAG ACCGAACCTG CGTCTATGCA AGTCCAACGC ACTGAGGACG GGGTAACCAT TATCCAGATA TTTTGGGTGG GCCGCAAAGG CGAGCTACTT AGACGCACCC CGGTGAGCTC GGCCATGCAG ACACCAATGG GAATCCCAAT GGGGAAGTCCG ATGCTGGTGC TTCTCACCTT CTTGGCCTTC GCCTCGTGCT GCATTGTGCTG TTACCGCCCC AGTGAGACCC TGTGGGCGG GGAGCTGGTG GACACCCTCC AGTTCGTCTG TGGGGACCGC GGCTTCTACT TCAGCAGGCC CGCAAGCCGT GTGAGCCGTC GCAGCCGTGG CATCGTTGAG GAGTGCTGTT TCCCGACTG TGACCTGGCC CTCTGGAGA CGTACTGTGC TACCCCGCC AAGTCCGAGA GGGACGTGTC GACCCCTCCG ACCGTGCTTC CGGACAACCT CCCAGATAC CCGGTGGGA AGTCTTCCA ATATGACACC TGAAGCAGT CCACCCAGCG CCTGCGCAGG GGCTTGCCTG CCCTCTGCG TGCCCGCGG GGTACGTTG TCGCAAGGA GCTCGAGGCG TTCAGGGAG CCAAACGTCA CCGTCCCTG ATTGCTCTAC CCACCAAGA CCCC GCCAC GGGGGCGCC CCCAGAGAT GGCCAGCAAT CGGAAGTGAG CAAACTGCC GCAAGTCTG AGCCCGGCGC CACCATCCTG CAGCCTCCTC CTGACCACGG ACGTTTCCAT CAGTTCCAT CCCGAAAATC TCTCGGTTCC ACGTCCCCCT GGGGCTTCTC CTGACCAGT CCCCGTGGCC CGCCTCCCG AAACAGGCTA CTCTCCTCG CCCCTTCCAT CGGGCTGAGG AAGCACAGCA GCATCTTCAA ACATGTACAA AATCGATTGG CTTTAAACAC CCTTACATA CCCTCCCCC AAATTATCC CAATTATCC CACACATAAA AAATCAAAC ATTAATACTAA CCCCTTCCC CCCCCCCAC AACAAACCTC TTAATACTAA TTGGCTTTTT AGAAACACCC CACAAAAGCT CAGAAATTGG CTTTAAAAA AACAAACCAC AAAAAAATC AATTGGCTAA AAAAAAAG TATTAATAAC GAATTGGCTG AGAAACAAT GGCAAAATAA AGGAATTTGG CACTCCCCAC CCCCCTCTT CTCTTCTCC TTGGACTTTG

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		AGTCAAAATG GCCTGGACTT GAGTCCCTGA ACCAGCAAAG AGAAAAAGAG CACCCCAAA ATCACAGGTG GGCACCTCCG TCGTACCCCC ATCTCCCTTC TCACGGGAAT TTTCAGGGTA AACTGGGCAT CCGAAAAATAG CAACAACCCA GACTGGCTCC TCACTCCCTT TTCCATCACT AAAAATCACA GAGCAGTCAG AGGGACCCAG TAAGACCAAA GGAGGGGAGG ACAGAGCATG AAAACCAAAA TCCATGCAAA TGAATGTAA TTGGCACGAC CCGCACCCCC AAATCTTACA TCTCAATTCG CAUCCFAAAA AGCACACATA CTTTATGCAI CCCCAGAGCT ACACACACAC AACACACACC ACACGCATGA ACACGCACA CACCCAGCA CACACACACAC ACAAACGCAC AGCACACACA GCACACAGAT GCACACACAG CACACACACA AACGCACAGC ACACACACGC ACACACATGC ACACACAGCA CACAAACGCA CGGCACACAC ACGCACACAC ATGCACACAC AGCACACACA CAACACGACA GCACACACAA ACGCACAGCA CACACGACA CACAGCACAC ACACGAGCAC ACAGCACACA AACGCACAGC ACACGCACAC ACATGCACAC ACAGCACACA CACTAGCACA CAGCACACAC ACAAAGACAC AGCACACACA TGCACACACA GCACACACAC GCGAACACAG CACACACGAA CACAGCACAC ACAGCACACA CAAAAACACA GCACACACAT GCACACAGCA CACCCACA CACACACAC ATGAACACAG CACACACAC ACACATGCAC ACACAGCACA CACGCATGCA CAGCACACAT GAACACAGCA CACACACAAA CACACAGCAC ACACATGCAC ACACAGCACA CACACTCATG CCGAGCACAT ACATGAACAC AGCTCACAGC ACACAACAC GCACGCACACA CTTTGACAC GCAAGCACCC ACCTGCACAC ACACATGGCG ACACACACGC ACACCCCCAC AAAATTTGAT GAAAAAALA AGCATAACTA AGCAACIACG AATATCTGIAI GGTACAGGCC AAAGTCCCGC TAAGATCTTC CAATGTTTTT ATGGTCTGAG CCGCGCTCCT GTCCCATCTT CCACTGCCCC TCGGCCCTGT CTGTGCCCTG CCTCTAGAG GASGGGGCTC AGATGGTGGC GCGTGGTGT GCGCGCGCG GCATTTGGGA TACACCCGTA GGGTGGGGGG GGTGTGTCCC AGCCCTAATC CCATCTCTCC ACCATCACAG AGATGCCCTT CTGAGGCTGG CCGCTTCCG CCCTGTCCCC ACGGCCCGCG CAGGCTGAGC CACGATGCTC CCCATACCCC ACCCATCTCC GATACACCTT ACTTACTGTG TGTGGGCCA GCGAGAGTGA GGAAGGAGTT TGGCCACATG GGAGATGGCG GTAGCTGAGC AGCATGTCCC CCACGAGTAG CGTACTCCC TGGTGTGCTC CTGGAAGGAA GATCTTGGGG ACCCCCCAC CGAGCACAC CTAGGATCA TCTTCCCGG TCCTCTGGG ACCCCCAAG AAATGTGGAG TCCTCGGGGG CCGTGCCTG ATCGGGGAG TGTGGGAAT CTGGCGGTTG GAGGGGTGGG TGGGGGGCAG TCGGGGCTG GCGGGGGGG TCTTGGGGTA GGAAGTGGTC CCGGGAGATT TTGGATGGA AAGTCAGGAG GATTCACAGC AGACTTGCAG AATTAACIAG AAAAAITAGG AACCCCAAAA LITCAATGCA ATTTGACTAT TCCCTCTCTT TGTTCITGG GGCATTTCT CTTTTTTTT TTTTTTGT TTTTTTTTAC CCGTCTTAG CTTTTAGCC TCAGAAACCA AATTAACCC CCCCCCATG TAACAGGGGG GCAGTGACAA AAGCAAGAAC GCACGAAGCC AGCCTGGAGA CCACCACCTC CTGCCCCCG CCATTTATG CCGTGAATGG ATTTTGTITT TCATCTGICC CTGTTGCTTG CGTTGAGTTC AGGCTGGACC CTCTGGGGG CCACTGGCCA CTGAGCCCC TGGAGAAAGT CAGAGGGGAG TGGAGAAAGC CACTGTCCCG CCTGGCTCT GCGGACAGT GCTGGTCCC AGAAGTCTG AGGGCGGAG GGGGGGTTGG GCAGGGTCTC CTCAGGTGTC AGGAGGCTG TCGGAGCCA CAGGAGGGGG CTCTGGCTG GCTGAGGCT GGGGGGAGG GAAGGGGCA GCAGGTGTGT AAACACACCG TTCCATCAG CTGCCCCAG CTGGCCCTT TCCGCACACT TGAGGAACCC TCCCTCTCC CTCGGTGACA CTGTGCCCG CCTCAGCAC CTTGCCTTGT CTCAGGAGG TCGAAGCTC TGTGGACCT CTTGGGGGA AGTGGGGTG AGGCCGGGGA GTAGGAGGT CAGGGGGTCT TGAGCCACA GAGCAGGAGA GCTGCCAGGT CTGCCCCAG ACCAGGTTC TGGGGCCCG GAGCCACCG GTCTGGTAT GCCATAGCAG CCACCACCG GGGCCCTAGG GCTGGCGCAG GCACTCGGCC TCTGGAGGT TTACTCGCC CCTACTGTG CCCCAGCTC AGCCCCCTG CACGCAGCCC GACTAGCAGT CTAGAGGCC GAGGCTTCTG GGTCTGTGT AGGGGGTGG CATGACCCCG GGGGTCTGTC ATGCAAGLCC GCTCAGLCC CAGAGGTTCC CTGGCAAGC GCGCTGAGG TGGCCATTC GCAACATTC ACAGAAGCCC AAGAGCCAA ATTTCAACA TTGTGGAACC CACATTGGCC TGAGATCCAA AACGCTTCA GGCACCCAA ATTACCTGCC CATTCTGTAG GACACCCACC CACCCAGTGT TATATTCTGC CTGCGCGGAG TGGGTGTCC CCGGGGCACT TCGGACCAG CCGCTTGCCT CCCGAGGTT GCAGCTCTCC CTTGGGCAAC TAACCATCTT GCGCCGGCT CCCTGTCTCA CCTCCCTGCC TAGTCTGTC TCTCCATCT GTCTCCCTCC CGTGTCCCA ATGTCTTCAG TGGGGGGCCC CCGTGTGGT CCGCTCTCT GCAATCACCT GAAGACCCCC ACGCCAAACA CTGAATGICA CCTGTGCCIG CGGCTCGGT CCACCTGGG GCGGCTGTT GACTCAACT AACCTCTTA ACGCAAAAI TCCGGCAAA ATCCCATGCT TGGGTTTGT CTTTAACTTT GTAACGCTT CAATCCCAAT AAAGCATTA AAGTCATGAA AAAAAA AAAAA

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
5	ARNm del KRT20 humano	<p>GAGACACACT CTGCCCAAC CATCCTGAAG CTACAGGTGC TCCCTCCTGG AATCTCCAAT GGATTTTCAGT CGCAGAAGCT TCCACAGAAG CCTGAGCTCC TCCTTGCCAGG CCCCTGTAGT CAGTACAGTG GGCATGCAGC GCCTCGGGAC GACACCCAGC GTTTATGGGG GTGCTGGAGG CCGGGGCATC CGCATCTCCA ACTCCAGACA CACGGTGAAC TATGGGAGCG ATCTCACAGG CGGCGGGGAC CTGTTTGTGTG GCAATGAGAA AATGGCCATG CAGAACCTAA ATGACCGTCT ATCGAGCTAC CTAGAAAAGG TGGGACCCTT GGAGCAGTCC AACTCCAAAC TTGAAGTGCA AATCAAGCAG TGGTACGAAA CCAACGCCCC GAGGGGTGGT CGCGACTACA GTGCATATTA CAGACAAATT GAAGAGCTGC GAAGTCAGAT TAAGGATGCT CAACTGCAAA ATGCTCGGTG TGTCTGCAA ATTGATAATG CTAAACTGGC TGCTGAGGAC TTCAGACTGA AGTATGAGAC TGAGAGAGGA ATACGTCTAA CAGTGGGAAG TGATCTCCAA GGCTTGAATA AGTCTTTTGA TGACCTAACCT CTACATAAAA CAGATTTGGA GATTCAAATT GAAGAAGTGA ATAAAGACCT AGCTCTCCCTC AAAAAGGAGC ATCAGGAGGA AGTCGATGGC CTACACAAGC ATCTGGGCAA CACTGTCAAT GTGGAGTTG ATGCTGTCTC AGGCCTGAAC CTGGCGTCA TCATGAATGA AATGAGGCGA AAGTATGAAG TCATGGCCCA GAAGAACCTT CAAGAGGCCA AAGAACAGTT TGAGAGACAG ACTGCAGTTC TGCAGCAACA GGTCCACAGT AATACTGAAG AATTAAGAGG AACTGAGGTT CAACTAACGG AGCTGAGACG CACCTCCAG AGCCTTGAGA TAGAACTCCA GTCCCATCTC AGCATGAAAG AGTCTTTGGA GCACACTCTA GAGGAGACCA AGGCCCGTTA CAGCAGCCAG TTAGCCAACC TCCAGTCGCT GTTGAGCTCT CTGGAGGCC AACTGATGCA GATTCGGAGT AACATGGAAC CCAGAAACA CGAATACCAT ATCCTTCTTG ACATAAAGAC TCGACTTGAA CAGGAAATTG CTACTTACC GCGCCTTCTG GAAGGAGAAG ACGTAAAAAC TACAGAAAT CAGTTAAGCA CCCTGGAGA GAGAGATATA AAGAAAACCA GGAAGATTA GACAGTCGTG CAAGAAGTAG TGGATGGCAA GGTCTGTCTA TCTGAAGTCA AAGAGGTGGA AGAAAATATC TAAATAGTCA CCAGAAGGAG ATGCTGCTGA GGTTTTGA GAAATTTGGC TATAATCTTA TCTTTGCTCC CTGCAAGAAA TCAGCCATA GAAAGCACTA TTAATACTCT GCAGTGATTA GAAGGGTGG GGTGGCGGGA ATCCTATTTA TCAGACTCTG TAATTGAATA TAAATGTTT ACTCAGAGGA GCTGCAAAAT GCCTGCAAAA ATGAAATCCA GTGAGCACTA GAATATTTAA AACATCATT CTGCCATCT TATCATGAAG CACATCAATT ACAAGCTGTA GACCACCTAA TATCAATTTG TAGGTAATGT TCCTGAAAAT TGCAATACAT TTCAATTATA CTAACCCTCA CAAAGTAGAG GAATCCATGT AAATTGCAAA TAAACCCTT TCTAATTTTT TCCTGTTTCT GAATTGTAAA ACCCCCTTTG GGAGTCCCTG GTTCTTTATT GAGCCAATTT CTGGG</p>
6	ARNm de ANXA10 humana	<p>ATCCAGATT GCTTTTACAT TTTCTGCTT GAGTCTGAGG TGAACAGTGA ACATATTTAC ATTTGATTTA ACAGTGAACC TTAATTCCTT CTGGCTTCAC AGTGAAACAA GTTTATGCAA TCGATCAAAT ATTTTCATCC CTGAGGTTAA CAATTACCAT CAAAATGTTT TGTGGAGACT ATGTGCAAGG AACCATCTTC CCAGCTCCCA ATTTCAATCC CATAATGGAT GCCCAAATGC TAGGAGGAGC ACTCCAAGGA TTTGACTGTG ACAAAGACAT GCTGATCAAC ATTTCTGACTC AGCGCTGCAA TGCACAAAGG ATGATGATTG CAGAGGCATA CCAGAGCATG TATGGCCGGG ACCTGATTGG GGATATGAGG GAGCAGCTTT CGGATCACTT CAAAGATGTG ATGGCTGGCC TCATGTACCC ACCACCCTG TATGATGCTC ATGAGCTCTG GCATGCCATG AAGGGAGTAG GCACTGATGA GAATTTGCCCTC ATTGAAATAC TAGCTTCAAG AACAAATGGA GAAATTTTCC AGATGGCGAGA AGCCTACTGC TTGCAATACA GCAATAACCT CCAAGAGGAC ATTTATTCAG AGACCTCAGG ACACCTCAGA GATACTCTCA TGAACCTGGT CCAGGGGACC AGAGAGGAAG GATATACAGA CCCTGCGATG GCTGCTCAGG ATGCAATGGT CCTATGGGAA GCCTGTCAGC AGAAGACGGG GGAGCACAAA ACCATGCTGC AAATGATCCT GTGCAACAAG AGCTACCAGC AGCTGCGGCT GGTTTTCCAG GAATTTCAA ATATTTCTGG GCAAGATATG GTAGATGCCA TTAATGAATG TTATGATGGA TACTTTGAGG AGCTGCTGGT TGCAATTTGT CTCTGTGTTT GAGACAAACC AGCCTATTTT GCTTATAGAT TATATAGTGC AATTCATGAC TTTGGTTTCC ATAATAAAAC TGTAATCAGG ATTCTCATG CCAGAAGTGA AATAGACCTG CTGACCATAA GGAAACGATA CAAAGAGCGA TATGGAAAAAT CCCTATTTCA TGATATCAGA AATTTTGCTT CAGGGCATA TAAGAAAGCA CTGCTTGCCA TCTGTGCTGG TGATGCTGAG GACTACTAAA ATGAAGAGGA CTTGGAGTAC TGTGCACTCC TCTTCTAGA CACTTCCAAA TAGAGATTTT CTCACAAATT TGTACTGTTT ATGGCACTAT TAACAAAAT ATACAATCAT ATTTCTCTT CTATCTTTGA AATTATTCTA AGCCAAAGAA AACTATGAAT GAAAGTATAT GATACTGAAT TTGCCACTA TCCTGAATTT GCCTACTATC TAATCAGCAA TTAATAAAAT TGTGCATGAT GGAATAATAG AAAAATGCA TTGGAATAGA TTTTATTTAA ATGTGAACCA TCAACAACCT ACAACAA</p>

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
7	ARNm del ABL humano	GGTTGGTGAC TTCCACAGGA AAAGTTCTGG AGGAGTAGCC AAAGACCACC ACCGTTTCCT TTATCTGTGA CAATTCAAA7 GACTAGCATT ATTGACCCCT TFCAGCATCC CCTGTGAATA TTCTGTITA GGTFTTCTT CTTGAAARA AATTGTTAIT CAGCCCGTT AAAACAAATC AAGAACTTT TGGTAACAT TSCAATTACA TGAAATTGAT AACCCGAAA ATAATTGGAA CTCCTGCCTG CAAGTGTCAA CCTAAAAAA GTGCTTCCCT TTGTTATGGA AGATGTCTTT CTSTGATTGA CTTCAATTGC TGACTTCTGG AGATGCAGCC AATGTGAAT CCCACCTAIA TCCCATTTCC CTCACCTCC CCTGACCCCT CTGGAAGATC TFGAACCCCTC TTCTSGAAAG GGGTACCTAT TATTACTTTA TGGGGCAGCA GCCTGGAAAA GTACTTGGGG ACCAAAGAAG GCCAAGCTTG CCTGCCCTGC ATTTTATCAA AGGAGCAGGG AAGAAGGA7 CATCGAGGCA TGGGGTCCA CACTGCAATG TTTTGTGGA ACATGAGGCC CTTGAGCCGC CAGTAGCATC TGACTTTGAG CCTCAGGGTC TGAGTGAAGC CGCTCGTTGG AACTCCAAGG AAAACCTTCT CGCTGGACCC AGTGAAATG ACCCAACCT TTTCTGTGCA CTSTATGAT TTGTGGCCAG TGGAGATAAC ACTCTAAGCA TAACATAAAG TGAANAAGTC CGGGTCTTAG GCTATAATCA CAATGGGAA TGGTGTGAG CCAAACCAA AAATGCCAA GCCTGCCTCC CAAGCAACTA CATCACGCCA CTCACAGTC TGGAGAAACA CTCCTGTACT CATGGCCCTG TGTCCCAGAA TCCCGCTGAG TATCTGTGA GCAGCGGGAT CAATGGCAGC TCTTTGGTGC TFGAGAGTGA GAGCAGTCC1 GGCCAGAGG1 CCATCTCGCT GAGATACGAA GSSAGGGTGT ACCATTACAG GATCAACACT GCTTCGATG GCAAGCTCTA CCTCTCCTCC GAGAGCCCTC TCAACACCTT GCCCGAGTTG GTTCATCATC ATTCAACGGT GGCCGACGGG CTCATCAGCA CGCTCCATTA TCCAGCCCA AAGCGCAACA AGCCCACTGT CTATGGTGTG TCCCCAART ACGACAAGTG GAGATGGAA CGCACGGACA TCACCATGAA GCACAAGCTG GGGGGGGGCC AGTACGGEGA GGTGTACGAG GGCGTGTGGA AGAATACAG CCTGACCGTG GCGGTGAAGA CCTTGAAGGA GGACACCATG GAGGTGGAG AGTCTTGA ABAAGCTGCA GTCATGAAAG AGATCAACA CCCTAACCTG GTGAGGCTCC TFGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCTTCT1 ATATCATCAC TGAATTCAAG ACCTACGEGA ACCTCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCACCC GGCAGGAGGT GAACGCGCTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCACGG AGTACCTGSA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCOCGAAAC TGCCCTGGTAG GGGASAAACA CTTGGTCAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC CCATCAAAAG GACTGCACCC GAGACCCCTG CCTACAACA OTTCTCCACTC AAGTCCGACG TCTGGGCATT TGGAGTATG CTTTGGGAAA TTGCTACCTA TGSCATGTC CCTTACCCGG GAATTGACCT GTCCAGGTG TATGAGCTGC TAGAGAAGA CTACCCGATG GAGCGCCAG AAGGCTGCC AGAGAAGGTG TATGAACTCA TGGGAGCATG TTGGCAGTGG AATCCCTCTG ACCGGCCCTA CTTTGTCAA ATCCCAAG CCTTCAAAC AATCTTCCAG GAATCCAG7C TCTCAGACCA AGTGSAAAAG GAGCTGGGA AACAAGGCT CCGTGGGCT GTGAGTACCT TGCTGCAGGC CCCAGAGCTG CCCACCAAGA CGAGGAGCTC CAGGAGACT GCAGAGCACA GAGACACCAC TGACGTGCC TGAATGCCCTC ACTCCAAGGG CCAGGGAGAG AGCGATCTTC TGGACCATGA GCTTCCGCTG TCTCCATTC TCCCTCGAA AGAGCCACCT CCCCAGAGG CCGCCTGAA TGAAGATGAG CGCTTCTCC CCAAGACAA AAAGACCAAC TTGTTACAGG CCTTGATCAA GAAGAAGAAG AAGACAGCCC CAACCCCTCC CAACCGCAGC AGCTCCTTCC GGGAGATGGA CGGCCAGCCG GAGGCGCAGAG GGGCCGGGA GBAAGAGGSC CGAGCATCA GCAACGGGSC ACTGGCTTTT ACCCCCTTGG ACACAGCTGA CCCAGCCAAG TCCCAAAAGC CCAGCAATGG GGTGGGGCTC CCAAATGGAG CCTCCGGGA GTCCGGGGGC TCAGGCTTCC GGTCTCCCA CTTGTGGGAA AAGTCCAGCA CGCTGACGAG CAGCCGCTA GCCACGGGG AGGAGGAGGG CGGTGGCAGC TCCAGCAAGC GCTTCTGCG CTCTTGTCC GCTCCTCGG TTCCCATAG GGCACACAC ACGCAGTGA GCTCAGTAC CTTGCTCGG GACTTGCAGT CCACGGGAAG ACAGTTTAC TCGTCCACAT TFGAGGGCA CAABAATGAG AAGCCGCTC TGCTTCGAA GAGGGCAGGG GAGAACAGCT CTGACAGGT GACCCGAGGC ACAGTAACGC CTUCCUCCAG CTTGGTGAAG AAGAATGAGG AAGCTGCTGA TGAGTCTTC AAAGACATCA TSSAGTCCAG CCGGGCTCC AGCCCGCCA ACCTGACTCC AAAACCCCTC CCGCGCAGG TCACCGTGG CCTGCCCTCG GGCCTCCCC ACAAGGAAGA AGCTGGAAG GGCATGCTT TGGGACCCCT TGCTGCAGCT GAGCAGTGA CCCCACUAG CAAAGCAGGC TCAAGTGCAC CAGGGGGCAC CAGCAAGGSC CCGCCGAGG AGTCCAGAGT GAGGAGGCAC AAGCACTCCT CTGAGTCCGC AAGGAGGAC AAGGGAAAT TGTCCAGGCT CAAACCTGCC CCGCCGCCCC CACCAGCAGC CTCTGCAGGG AAGGCTGGAG GAAAGCCCTC GCAGAGCCCG ASCCAGGAGG CGGCCGGGA GGCAGTCTGT GGGCAAGA CAAAGGCCAC GAGTCTGCT GATGCTGTGA ACAGTACCG TGCCAGCCC AGCCAGCCGG GAGAGGGCT CAAAAGGCC GTGCTCCCG CCACTCCAAA GCCACAGTCC

(continuación)

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		GCCAAGCCGT CGGGGACCCC CATCAGCCCA GCCCCCGTTC CCTCCACGTT GCCATCAGCA TCCTCGGCC TGGCAGGGGA CCAGCCGTCT TCCACGCCT TCATCCCTCT CATATCAACC CGAGTGTCTC TTCGAAAAAC CCGCCAGCCT CCAGAGCGGA TCGCCAGCGG CGCCATCACC AAGGGCGTGG TCCTGGACAG CACCAGGCG CTGTGCCTCG CCATCTCTAG GAACTCCGAG CAGATGGCCA GCCACAGCGC AGTGTGGAG GCCGGCAAAA ACCTCTACAC GTTCTCGGTG AGCTATGTGG ATTCATCCA GCAAATGAGG AACAAAGTTG CCTTCGGAGA GGCCATCAAC AAAGTGGAGA ATAATCTCCG GGAGCTTCAG ATCTGCCCGG CGACAGCAGG CAGTGGTCCA GCGGCCACTC AGGACTTCAG CAAGCTCCTC AGTTCGGTGA AGGAAATCAG TGACATAGTG CAGAGGTAGC AGCAGTCAGG GGTCAAGTGT CAGGCCCGTC GGAGCTGCCT GCAGCACATG CGGGCTCGCC CATAACCGTG ACAGTGGCTG ACAAGGGACT AGTGAGTCAG CACCTTGCC CAGGAGCTCT GCGCCAGGCA GAGCTGAGGG CCCTGTGGAG TCCAGTCTA CTACCTACGT TTGCACCGCC TGCCCTCCCG CACCTTCCTC CTCCCCGCTC CGTCTCTGTC CTCGAATTTT ATCTGTGGAG TTCTGTCTCC GGTGACTGCA GTCGGCATGC CAGGACCGC CAGCCCCGCT CCCACCTAGT GCCCCAGACT GAGCTCTCCA GGCCAGGTGG GAACGGCTGA TGTGGACTGT CTTTTTCATT TTTTTCTCTC TGGAGCCCTT CCTCCCCCGG CTGGGCCCTC TTCTTCCACT TCTCCAAGAA TGGAAAGCCTG AACTGAGGCC TTGTGTGTCA GGCCCTCTGC CTGCACTCCC TGGCCTTGCC CGTCGTGTGC TGAAGACATG TTTCAAGAAC CGCATTTCCG GAAGGGCATG CACGGGCATG CACACGGCTG GTCACCTCTG CCTCTGCTGC TGCCCGGGGT GGGGTGCACT CGCCATTTC TCACGTGCAG GACAGCTCTT GATTTGGGTG GAAAACAGGG TGCTAAAGCC AACAGCCTT TGGTCCCTGG GCAGGTGGGA GCTGAAAAGG ATCGAGGCAT GGGGCATGTC CTTTCCATCT GTCCACATCC CCAGAGCCCA GCTCTTGCTC TCTTGTGACG TTGCACTGTA ATCCTGGCAA GAAAGCTTGA GTCTCAAGGG TGGCAGTCA CTGTCACCTG CGACATCCCT CCCCAGCAG AATGGAGGCA GGGGACAAGG GAGGCAGTGG CTAGTGGGGT GAACAGCTGG TGCCAAATAG CCCCAGACTG GGCCAGGCA GGTCTGCAAG GGCCAGAGT GAACCGTCTT TTCACACATC TGGGTGCCCT GAAAGGGCCC TTCCCTCCC CCACTCCTCT AAGACAAAGT AGATTCTTAC AAGGCCCTTT CCTTTGGAAC AAGACAGCCT TCACTTTTCT GAGTTCTTGA AGCATTCAA AGCCCTGCCT CTGTGTAGCC GCCCTGAGAG AGAATAGAGC TGCCACTGGG CACCTGCGCA CAGGTGGGAG GAAAGGGCCT GCCAGTCTCT GTTCTTGGCT GCACTCTTGA ACTGGGGGAA TGTCTTATTT AATTACCGTG AGTGACATAG CCTCATGTTT TGTGGGGTTC ATCAGGGAGG GTTAGGAAAA CCACAAACGG AGCCCTGAA AGCCTCAGT ATTTACAGAG GCACGCCCTG CATCTTCTCC CCGAGGCTGC CCCAGGCCGG AGCCAGATA CGGGGGCTGT GACTCTGGGC AGGGACCCGG GGTCTCTGG ACCTTGACAG AGCAGCTAAC TCCGAGAGCA GTGGGCAGGT GGCCGCCCTT GAGGCTTCAC GCCGGGAGAA GCCACCTTCC CACCCTTCA TACCCTCGT TGCCAGCAGC CTCGCACAGG CCTAGCTTT ACGCATCA CCTAAACTTG TACTTTATTT TTCTGATAGA AATGGTTTCC TCTGGATCGT TTTATGCGGT TCTTACAGCA CATCACCTCT TTGCCCCGA CGGCTGTGAC GCAGCCGGAG GGAGGCACTA GTCACCGACA GCGGCTTGA AGACAGAGCA AAGCGCCAC CCAGGTCCCT CGACTGCCTG TCTCCATGAG GTACTGGTCC CTTCCTTTG TTAACGTGAT GTGCCACTAT ATTTTACACG TATCTCTTGG TATGCATCTT TTATAGACGC TCTTTTCTAA GTGGCGTGTG CATAGCGTCC TGCCCTGCC CCTCGGGGGC CTGTGGTGGC TCCCCCTCG CTTCGCGGG TCCAGTGCAT TTTGTTTCTG TATATGATTC TCTGTGGTTT TTTTGAATC CAAATCTGTG CTCTGTAGTA TTTTTTAAAT AATCAGTGT TTACATTAGA A
47	Secuencia de Armored RNA®	GAUGCUCACU UCAUCUAUGG UUACCCUGGG ACUUUUACAC CAACAGAACU AGCAUCAUCC UCUGCAUGGU CAGGUCAUGG AUCGGCAUCC UGACAGUUUC GGGAAUUAGG CAUCUGCAGU CUUACUGCUC AUCGGCUGAU GAUGCUGCUG UAAUCCCAU CCAAGCAAGC UUGUGAUCCU CCGCCAUUUA CCCAAUUGU AUAACAUUUA GGACUUAAAAG CUAUGCAAUU AUCACCUUUG UUUUCAACAG CAAGACCUAA UAUUUUCUUU UCAUCAUUAA UGCCUUUUGA UGGAUCAGGC AACCAUUUUA AAAUAUGUUC ACCAGCCGAA GUCAGUAGUG AUUGGGUGGU UCCUGGCUUG GGAUCAUGCC GCUGCAGAGG CUAUUCUCCU CUUGGCAGAU UGUCUGUAGC CGAGAAGGCG GAGUCUGGCA AUGAUGAUGC AUACAGUGUA CGACAGCCUU AGGGACUGGA GCUCAAGCAG UGUUUCCUCA ACCAGUCACA

Listado de secuencias

<110> Cepheid

5 <120> MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CÁNCER DE VEJIGA

<130> CEPHD-32468/WO-1/ORD

<150> US 61/636.194

10 <151> 2012-04-20

<150> US 61/770.803

<151> 2013-02-28

15 <160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1434

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25	tcgttccttg gcagggcct atgatttatg caggagcaga ggcagcacgc aatcgagctg	60
	tcaagagagc gtcagcttat taggcaaatg ctgcgtggtt tttgaagagg gtcgacacta	120
	taaaatocca ctccaggctc tggagtggag aaactcagag accaagtcca ttgagagact	180
30	gaggggaaag agaggagaga aagaaaaaga gagtgggaac agtaaagaga aaggaagaca	240
	acctccagag aaagcccccg gagacgtctc tctgcagaga ggcggcagca cccggtcac	300
	ctgcgaagcg cctgggaagc gagtgcccct aacatgctggc tgccgctgct tgtgtccgcy	360
35	ggagtccctgc tgggtggctct cctgccctgc ccgccatgca ggcgctcct gagccgcggg	420
	ccggtcccgg gagctcggca ggcgcgcag caccctcagc ccttggattt cttccagccg	480
	ccgccgcagt ccgagcagcc ccagcagccg caggctcggc cggtcctgct ccgcatggga	540
40	gaggagtact tcctccgcct ggggaacctc aacaagagcc cggccgctcc cctttcgccc	600
	gcctcctcgc tcctcgcccg aggcagcggc agccgccctt cgccggaaca ggcgaccgcc	660
45	aactttttcc gcgtgttgct gcagcagctg ctgctgcctc ggcgctcgt cgacagcccc	720
	gcggctctcg cggagcgcgg cgctaggaat gccctcggcg gccaccagga ggcaccggag	780
	agagaaaggc ggtccgagga gcctcccatc tccttgatc tcacctcca cctcctccgg	840
50	gaagtcttgg aaatggccag ggccgagcag ttagcacagc aagctcacag caacaggaaa	900
	ctcatggaga ttattgggaa ataaaacggt gcgtttggcc aaaaagaatc tgcatttagc	960
	acaaaaaaaa tttaaaaaaaa tacagtattc tgtaccatag cgctgctctt atgccatttg	1020
55	tttattttta tatagcttga aacatagagg gagagagga gagagcctat accccttact	1080
	tagcatgcac aaagtgtatt cacgtgcagc agcaacacaa tgttattcgt tttgtctacg	1140
60	tttagtttcc gtttccaggt gtttatagtg gtgttttaaa gagaatgtag acctgtgaga	1200

65

ES 2 619 032 T3

	aaacgttttg tttgaaaaag cagacagaag tcaactcaatt gtttttgttg tggctctgagc	1260
	caaagagaat gccattctct tgggtgggta agactaaatc tgtaagctct ttgaaacaac	1320
5	tttctcttgt aaacgtttca gtaataaaaac atctttccag tccttgggtca gtttggttgt	1380
	gtaagagaat gttgaatact tatatthttta ataaaagttg caaaggtaat catg	1434
10	<210> 2 <211> 5156 <212> ADN <213> Homo sapiens	
15	<400> 2	
	ccgctaattgt accatgccct ggtgctggaa agtgccctgag ccagctgccc cagcggcctc	60
	agcactacca agttggcaca aagctcccca aattcggagg ggctcagga aacgagtgga	120
20	gggatgagg aggtgagggg taaaccatc atttcagttg gcatttgagc aggtgccatg	180
	ctcagcggag atgaggctct cccatctgta ggggccgtat taacatgcac actctaaaag	240
	tgcccttctg ttctccagcc tcagctttgt ccctctcctc ctccacgtca acctggccag	300
25	agggtctgga cgccacagcc agggcacccc ctgctttggt ggtgactgct aatattggcc	360
	aggccggcgg atcatcgtcc aggcagttc ggcagagagc cttgggcacc agtgactccc	420
	cggtcctctt tatccactgt ccaggagctg cggggactgc gcagggacta gagtacaggg	480
30	gccgaagagt caccaccgag cttgtgtggg aggaggtgga ttccagcccc cagccccagg	540
	gctctgaatc gctgccagct cagccccctg cccagcctgc cccacagcct gagccccagc	600
35	aggccagaga gcccagtcct gaggtgagct gctgtggcct gtggcccagg cgacccccagc	660
	gctcccagaa ctgaggctgg cagccagccc cagcctcagc cccaactgcg aggcagagag	720
	acaccaatgg gaatcccaat ggggaagtgc atgctggtgc ttctcacctt cttggccttc	780
40	gcctcgtgct gcattgctgc ttaccgcccc agtgagacct tgtgcggcgg ggagctggtg	840
	gacaccctcc agttcgtctg tggggaccgc ggcttctact tcagcaggcc cgcaagccgt	900
	gtgagccgtc gcagccgtgg catcgttgag gagtgctggt tccgcagctg tgacctggcc	960
45	ctcctggaga cgtactgtgc taccgcccgc aagtccgaga gggacgtgtc gaccctccg	1020
	accgtgcttc cggacaactt ccccagatac cccgtgggca agttcttcca atatgacacc	1080
50	tggaagcagt ccaccagcg cctgcgcagg ggctgcctg ccctcctgcg tgcccgcgg	1140
	ggtcacgtgc tcgccaagga gctcgaggcg ttcagggagg ccaaactgca ccgtcccctg	1200
	attgctctac ccacccaaga ccccgcccac gggggcgccc cccagagat ggccagcaat	1260
55	cggaagtgag caaaactgcc gcaagtctgc agccggcgc caccatcctg cagcctcctc	1320
	ctgaccacgg acgtttccat caggttccat cccgaaaatc tctcggttcc acgtcccct	1380
	ggggcttctc ctgaccagt ccccgctgcc cgcctccccg aaacaggcta ctctcctcgg	1440
60		
65		

ES 2 619 032 T3

cccctccat cgggctgagg aagcacagca gcatcttcaa acatgtacaa aatcgattgg 1500
 ctttaaacac ccttcacata ccctcccccc aaattatccc caattatccc cacacataaa 1560
 5 aatcaaaac attaaactaa ccccttccc cccccccac aacaaccctc ttaaaactaa 1620
 ttggcttttt agaaacaccc cacaaaagct cagaaattgg ctttaaaaaa aacaaccacc 1680
 aaaaaaatc aattggctaa aaaaaaaaaa tattaaaaac gaattggctg agaaacaatt 1740
 10 ggcaaaataa aggaatttgg cactccccac cccctcttt ctcttctccc ttggactttg 1800
 agtcaaattg gcctggactt gagtccctga accagcaaag agaaaagaag gaccccagaa 1860
 15 atcacaggtg ggcacgtcgc tgctaccgcc atctcccctc tcacgggaat tttcagggta 1920
 aactggccat ccgaaaatag caacaaccca gactggctcc tcactccctt ttccatcact 1980
 aaaaatcaca gagcagtcag agggaccag taagaccaa ggaggggagg acagagcatg 2040
 20 aaaacaaaa tccatgcaa tgaaatgtaa ttggcacgac cctcaccccc aaatcttaca 2100
 totcaattcc catcctaaaa agcactcata ctttatgcat ccccgagct acacacacac 2160
 aacacacagc acacgcatga acacagcaca cacacgagca cagcacacac acaaacgcac 2220
 25 agcacacaca gcacacagat gagcacacag cacacacaca aacgcacagc acacacagc 2280
 acacacatgc acacacagca cacaaacgca cggcacacac acgcacacac atgcacacac 2340
 agcacacaca caaacgcaca gcacacacaa acgcacagca cacacgcaca cacagcacac 2400
 30 acacgagcac acagcacaca aacgcacagc acacgcacac acatgcacac acagcacaca 2460
 cactagcaca cagcacacac acaaagacac agcacacaca tgcacacaca gcacacacac 2520
 35 gcgaacacag cacacacgaa cacagcacac acagcacaca cacaaacaca gcacacacat 2580
 gcacacagca cagcacaca cagcacacac atgaacacag cacacagcac acacatgcac 2640
 acacagcaca cagcagatga cagcacacat gaacacagca cacacacaaa cacacagcac 2700
 40 acacatgcac acacagcaca cacactcatg cgcagcacat acatgaacac agctcacagc 2760
 acacaaacac gcagcacaca cgttgcacac gcaagcacc acctgcacac acacatgcgc 2820
 acacacagc acacccccac aaaattggat gaaaacaata agcatatcta agcaactacg 2880
 45 atatctgtat ggatcaggcc aaagtcccgc taagattctc caatgttttc atggtctgag 2940
 ccccgctcct gttcccatct ccactgcccc tcggccctgt ctgtgccctg cctctcagag 3000
 gagggggctc agatggtgcg gcctgagtg gcggccggcg gcatttggga tacacccgta 3060
 50 ggggtggcgg ggtgtgtccc aggcctaatt ccatctttcc accatgacag agatgccctt 3120
 gtgaggctgg cctccttggc gcctgtcccc acggcccccg cagcgtgagc cacgatgctc 3180
 cccatacccc acccattccc gatacacctt acttactgtg tgttgccca gccagagtga 3240
 55 ggaaggagtt tggccacatt ggagatggcg gtagctgagc agacatgcc ccacgagtag 3300

60

65

ES 2 619 032 T3

cctgactccc tgggtgtgctc ctggaaggaa gatcttgggg acccccccac cggagcacac 3360
 ctagggatca tctttgcccg tctcctgggg acccccgaag aaatgtggag tccctggggg 3420
 5 ccggtgactg atcgggggag tgtgggaagt ctggcggttg gaggggtggg tggggggcag 3480
 tgggggctgg gcggggggag ttctggggta ggaagtgttc ccgggagatt ttggatggaa 3540
 aagtcaggag gattgacagc agacttgacg aattacatag agaaattagg aacccccaaa 3600
 10 tttcatgtca attgatctat tccccctctt tgtttcttgg ggcatttttc cttttttttt 3660
 tttttttgtt ttttttttac ccctccttag ctttatgccc tcagaaacca aattaaacc 3720
 ccccccatg taacaggggg gcagtacaa aagcaagaac gcacgaagcc agcctggaga 3780
 15 ccaccacgtc ctgccccccg ccatttatcg ccctgattgg attttgtttt tcatctgtcc 3840
 ctggtgcttg ggttgagttg aggggtggagc ctccctggggg gcactggcca ctgagcccc 3900
 ttggagaagt cagaggggag tggagaaggc cactgtccgg cctggcttct ggggacagtg 3960
 20 gctggtcccc agaagtccct agggcgaggg ggggggttgg gcagggcttc ctccaggttc 4020
 aggaggtgc tcggaggcca caggaggggg ctccctggctg gcctgaggct ggccggaggg 4080
 gaaggggcta gcaggtgtgt aaacagaggg ttccatcagg ctggggcagg gtggccgctt 4140
 25 tccgcacact tgaggaacct tccccctctc ctccgtgaca tcttgcccgc ccctcagcac 4200
 cctgccttgt ctccaggag tccgaagctc tgtgggacct cttgggggca aggtggggtg 4260
 30 aggccgggga gtagggaggt caggcggttc tgagcccaca gagcaggaga gctgccaggt 4320
 ctgcccatcg accaggttgc ttgggccccg gagcccacgg gtctggtgat gccatagcag 4380
 ccaccaccgc ggcgcctag gctgcccag ggactcggcc tctgggaggt ttacctgcc 4440
 35 cccacttgtg cccccagctc agccccctg cacgcagccc gactagcagt ctagaggcct 4500
 gaggtctctg ggtcctggtg acggggctgg catgaccccg ggggtcgtcc atgccagtcc 4560
 gcctcagtcg cagaggggtc ctccgcaagc gccctgtgag tgggccattc ggaacattgg 4620
 40 acagaagccc aaagagccaa attgtcacia ttgtggaacc cacattggcc tgagatccaa 4680
 aacgcttoga ggcaccccaa attacctgcc cttcgtcag gacacccacc caccagtg 4740
 tatattctgc ctcccgagg tgggtgttcc cgggggcact tgccgaccag ccccttgcgt 4800
 45 ccccaggtt gcagctctcc cctgggccac taaccatcct ggcccgggct gcctgtctga 4860
 cctccgtgcc tagtcgtggc tctccatctt gtctcctccc cgtgtcccca atgtcttcag 4920
 50 tggggggccc cctcttgggt cccctcctct gccatcacct gaagaccccc acgccaaca 4980
 ctgaatgtca cctgtgcctg ccgcctcggg ccacettgcg gcccggtttt gactcaactc 5040
 aactccttta acgctaatat ttccggcaaa atcccatgct tgggttttgt ctttaacctt 5100
 55 gtaacgcttg caatcccaat aaagcattaa aagtcatgaa aaaaaaaaaa aaaaaa 5156

60

65

ES 2 619 032 T3

<210> 3
 <211> 5182
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<400> 3

10	cgctgtccc cctcccgagg cccgggctcg cgacggcaga gggctccgtc ggcccaaacc	60
	gagctgggcg cccgcgggtcc ggggtgcagcc tccactccgc cccccagtca cgcctcccc	120
	cgcccccctcg acgtggcgcc cttccctccg cttctctgtg ctccccgcgc ccctcttggc	180
15	gtctggcccc ggcccccgct ctttctcccg caaccttccc ttcgctccct cccgtcccc	240
	ccagctccta gcctccgact ccctcccccc ctcaagcccg ccctctcgcc ttgcggaac	300
	caaagtggat taattacacg ctttctgttt ctctccgtgc tgttctctcc cgtgtgctgc	360
20	ctgcccgcct ctgctgtcc tctctcccc tcgcctctc ttgggcccc ccctttcag	420
	ttcaactctgt ctctcccact atctctgccc ccctctatcc ttgatacaac agctgaacct	480
	atttcccgat accttttccc ccccgaaaag tacaacatct ggcccgcccc agcccgaaga	540
25	cagcccgctc tccctggaca atcagacgaa ttctcccccc cccccaaaa aaaagccatc	600
	cccccgctct gccccgctgc acattcggcc cccgcgactc ggccagagcg gcgctggcag	660
	aggagtgtcc ggcaggaggg ccaacgcccg ctgttcgggt tgcgacacgc agcaggagg	720
30	tggcgggcag cgtgcgccgc ttccagacac caatgggaat cccaatgggg aagtctgatgc	780
	tgggtgttct caccttcttg gccttcgcct cgtgctgcat tgctgcttac cgtcccagtg	840
35	agaccctgtg cggcgggggag ctgggtggaca ccctccagtt cgtctgtggg gaccgcggct	900
	tctacttcag caggcccgca agccgtgtga gccgtcgag ccgtggcatc gttgaggagt	960
	gctgtttccg cagctgtgac ctggccctcc tggagacgta ctgtgctacc cccgccaagt	1020
40	ccgagagggga cgtgtcgacc cctccgaccg tgcttccgga caacttcccc agataccccg	1080
	tgggcaagtt cttccaatat gacacctgga agcagtccac ccagcgcctg cgcaggggcc	1140
	tgctgccct cctgcgtgcc cgccggggtc acgtgctcgc caaggagctc gaggcgttca	1200
45	gggaggccaa acgtcaccgt cccctgattg ctctaccac ccaagacccc gccacgggg	1260
	gcgccccccc agagatggcc agcaatcgga agtgagcaaa actgcccga gctctcagcc	1320
	cggcgccacc atcctgcagc ctccctctga ccacggacgt ttccatcagg ttccatcccg	1380
50	aaaatctctc ggttccacgt ccccctgggg cttctcctga ccagtcccc gtgccccgcc	1440
	tccccgaaac aggctactct cctcgcccc ctccatcggg ctgaggaagc acagcagcat	1500
55	cttcaaacat gtacaaaatc gattggcttt aaacaccctt cacataccct cccccaaat	1560
	tatccccaat tatccccaca cataaaaaat caaaacatta aactaaccoc cttccccccc	1620
	ccccacaaca accctcttaa aactaattgg ctttttagaa acaccacaca aaagctcaga	1680
60	aattggcttt aaaaaaaca accaccaaaa aaaatcaatt ggctaaaaaa aaaaagtatt	1740

65

ES 2 619 032 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55

```

aaaaacgaat tggctgagaa acaattggca aaataaagga atttggcact cccaccccc 1800
ctctttctct tctcccttgg actttgagtc aaattggcct ggacttgagt ccctgaacca 1860
gcaaagagaa aagaaggacc ccagaaatca caggtgggca cgtcgtgct accgccatct 1920
cccttctcac gggaaatctc agggtaaaact ggccatccga aaatagcaac aaccagact 1980
ggctcctcac tcccttttcc atcactaaaa atcacagagc agtcagaggg acccagtaag 2040
accaaaggag gggaggacag agcatgaaaa ccaaaatcca tgcaaatgaa atgtaattgg 2100
cacgaccctc acccccaaat cttacatctc aattccatc ctaaaaagca ctcatacttt 2160
atgcatcccc gcagctacac acacacaaca cacagcacac gcatgaacac agcacacaca 2220
cgagcacagc acacacacaa acgcacagca cacacagcac acagatgagc acacagcaca 2280
cacacaaaag cacagcacac acacgcacac acatgcacac acagcacaca aacgcacggc 2340
acacacacgc acacacatgc acacacagca cacacacaaa cgcacagcac acacaaacgc 2400
acagcacaca cgcacacaca gcacacacac gagcacacag cacacaaaag cacagcacac 2460
gcacacacat gcacacacag cacacacact agcacacagc acacacacaa agacacagca 2520
cacacatgca cacacagcac acacacgcca acacagcaca cacgaacaca gcacacacag 2580
cacacacaca aacacagcac acacatgcac acagcacacg cacacacagc acacacatga 2640
acacagcaca cagcacacac atgcacacac agcacacacg catgcacagc acacatgaac 2700
acagcacaca cacaacacaca cagcacacac atgcacacac agcacacaca ctcatgcca 2760
gcacatacat gaacacagct cacagcacac aaacacgcag cacacacggt gcacacgcaa 2820
gcacccacct gcacacacac atgcccacac acacgcacac cccacacaaa ttggatgaaa 2880
acaataagca tatctaagca actacgatat ctgtatggat caggcctaaag tcccgctaag 2940
attctccaat gttttcatgg totgagcccc gctcctgttc ccatctccac tgcccctcgg 3000
ccctgtctgt gccctgcctc tcagaggagg gggctcagat ggtgcggcct gagtgtgcgg 3060
ccggcggcat ttgggataca cccgtagggg gggcgggggtg tgtcccaggc ctaattccat 3120
ctttccacca tgacagagat gcccttgtga ggtggcctc cttggcgcct gtcccacgg 3180
ccccgcagc gtgagccacg atgctcccca taccacacc attcccata caccttactt 3240
actgtgtggt gggccagcca gagtgaggaa ggagtttggc cacattggag atggcggtag 3300
ctgagcagac atgccccac gagtagcctg actccctggt gtgctcctgg aaggaagatc 3360
ttggggaccc ccccaccgga gcacacctag ggatcatctt tgcccgtctc ctggggaccc 3420
cccaagaaat gtggagtcct cgggggcccgt gactgatgc ggggagtggt ggaagtctgg 3480
cggttgagg ggtgggtggg gggcagtggt ggctgggagg ggggagttct ggggtaggaa 3540
gtgggtcccgg gagatcttgg atggaaaagt caggaggatt gacagcagac ttgcagaatt 3600
  
```

60

65

ES 2 619 032 T3

5 acatagagaa attaggaacc cccaaatttc atgtcaattg atctattccc cctctttggt 3660
 tcttggggca tttttccttt tttttttttt tttgtttttt ttttaccctt ccttagcttt 3720
 atgcgctcag aaaccaaatt aaaccccccc cccatgtaac aggggggacg tgacaaaagc 3780
 10 aagaacgcac gaagccagcc tggagaccac cacgtcctgc cccccgcat ttatcgcct 3840
 gattggattt tgtttttcat ctgtccctgt tgcttgggtt gagttgaggg tggagcctcc 3900
 tggggggcac tggccactga gcccccttg agaatcaga ggggagtga gaagccact 3960
 15 gtccggcctg gcttctgggg acagtggctg gtccccagaa gtcctgaggg cggagggggg 4020
 ggttgggcag ggtctcctca ggtgtcagga ggtgtctcgg aggccacagg agggggctcc 4080
 tggctggcct gaggctggcc ggagggaag gggctagcag gtgtgtaaac agagggttcc 4140
 20 atcaggctgg ggcagggtgg ccgccttcg cacacttgag gaacctccc ctctccctcg 4200
 gtgacatctt gcccgccct cagcaccctg ccttgtctcc aggaggtccg aagctctgtg 4260
 ggacctctt ggggcaaggt ggggtgaggc cggggagtag ggaggtcagg cgggtctgag 4320
 25 cccacagagc aggagagctg ccaggtctgc ccatcgacca ggttgccttg gccccggagc 4380
 ccacgggtct ggtgatcca tagcagccac caccgcggcg cctagggctg cggcagggac 4440
 30 tcggcctctg ggaggtttac ctgccccca cttgtgccc cagctcagcc ccctgcacg 4500
 cagcccgact agcagtctag aggcctgagg cttctgggtc ctgggtgacgg ggctggcatg 4560
 accccgggg tegtccatgc cagtcgcct cagtgcaga gggtcctcg gcaagcggcc 4620
 35 tgtgagtggg ccattcggaa cattggacag aagcccaaag agccaaattg tcacaattgt 4680
 ggaaccaca ttggcctgag atccaaaacg cttcgaggca ccccaaatta cctgccatt 4740
 cgtcaggaca cccaccacc cagtgtata ttctgcctcg ccggagtggg tgttcccggg 4800
 40 ggcacttgcc gaccagcccc ttgcgtccc aggtttgcag ctctcccctg ggccactaac 4860
 catcctggcc cgggctgcct gtctgacctc cgtgcctagt cgtggctctc catcttgtct 4920
 cctccccgtg tccccaatgt cttcagtggg gggccccctc ttgggtccc tctctgcga 4980
 45 tcacctgaag acccccacgc caaacactga atgtcacctg tgcctgccgc ctcggtccac 5040
 cttgcgccc gtgttgact caactcaact cctttaacgc taatatttcc ggcaaaatcc 5100
 50 catgcttggg ttttgtctt aacctgtaa cgttgcaat cccaataaag cattaagaat 5160
 catgaaaaaa aaaaaaaaa aa 5182

55 <210> 4
 <211> 4856
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 4

ggccgcgccc cctcaggacg tggacagga gggcttccc gtgtccagga aagcgaccgg 60

65

ES 2 619 032 T3

gcattgcccc cagtctcccc caaatttggg cattgtcccc gggctttcca acggactggg 120
cgttgtcccc ggacactgag gactggcccc ggggtctcgc tcaccttcag cagcgtccac 180
5 cgctgcccac agagcgttcg atcgtctcgt gctgagctc ctggtgcgcc cgcggacgca 240
gcctccagct tcgaggagat ggtttcccca gacccccaaa ttatcgtggt ggcccccgag 300
accgaaactcg cgtctatgca agtccaacgc actgaggacg gggtaacctat tatccagata 360
10 ttttggtggg gccgcaaagg cgagctactt agacgcaccc cggtgagctc ggccatgcag 420
acaccaatgg gaatcccaat ggggaagtcg atgctggtgc ttctcacctt cttggccttc 480
gcctcgtgct gcattgtgct ttaccgcccc agtgagaccc tgtgcggcgg ggagctgggtg 540
15 gacaccctcc agttcgtctg tggggaccgc ggcttctact tcagcaggcc cgcaagccgt 600
gtgagccgct gcagccgtgg catcgttgag gagtgtgtt tccgcagctg tgacctggcc 660
ctcctggaga cgtactgtgc tcccccgcc aagtcgaga gggacgtgtc gaccctccg 720
20 accgtgcttc cggacaactt ccccagatac cccgtgggca agttcttcca atatgacacc 780
tggaagcagt ccaccagcg cctgcgcagg ggctgcctg ccctcctcg tgcccgcgg 840
ggtcacgtgc tcgccaagga gctcagggcg ttcagggagg ccaaactca ccgtcccctg 900
25 attgctctac ccaccaaga ccccgcccac gggggcgccc ccccagagat ggccagcaat 960
cggaaagtgag caaaactgcc gcaagtctgc agccggcgc caccatcctg cagcctcctc 1020
ctgaccacgg acgtttccat caggttccat cccgaaaatc tctcgttcc acgtcccct 1080
30 ggggcttctc ctgaccagat ccccggtccc cgcctccccg aaacaggcta ctctcctcg 1140
ccccctccat cgggctgagg aagcacagca gcattctcaa acatgtacaa aatcgattgg 1200
ctttaaacac ccttcacata ccctccccc aaattatccc caattatccc cacacataaa 1260
35 aatcaaaaac attaaactaa cccccttccc cccccccac aacaaccctc ttaaaactaa 1320
ttggcttttt agaaacaccc cacaaaagct cagaaattgg ctttaaaaaa aacaaccacc 1380
aaaaaaaatc aattggctaa aaaaaaaaaag tattaaaaac gaattggctg agaaacaatt 1440
40 ggcaaaaata aggaatttgg cactccccac cccctcttt ctctctccc ttggactttg 1500
agtcaaattg gcctggactt gagtccctga accagcaaag agaaaagaag gaccccagaa 1560
45 atcacaggtg ggcacgtcgc tgctaccgcc atctccctc tcacgggaat tttcagggtg 1620
aactggccat ccgaaaatag caacaacca gactggctcc tcactccctt ttccatcact 1680
aaaaatcaca gagcagtcag agggaccag taagaccaa ggaggggagg acagagcatg 1740
50 aaaacaaaaa tccatgcaaa tgaaatgtaa ttggcacgac cctcaccccc aaatcttaca 1800
tctcaattcc catcctaaaa agcactcata ctttatgcat ccccgagct acacacacac 1860
aacacacagc acacgcatga acacagcaca cacacgagca cagcacacac acaaacgcac 1920
55 agcacacaca gcacacagat gagcacacag cacacacaca aacgcacagc acacacacgc 1980

60

65

ES 2 619 032 T3

	acacacatgc acacacagca cacaaacgca cggcacacac acgcacacac atgcacacac	2040
	agcacacaca caaacgcaca gcacacacaa acgcacagca cacacgcaca cacagcacac	2100
5	acacgagcac acagcacaca aacgcacagc acacgcacac acatgcacac acagcacaca	2160
	cactagcaca cagcacacac aaaaagacac agcacacaca tgacacacaca gcacacacac	2220
	gcgaacacag cacacacgaa cacagcacac acagcacaca cacaaacaca gcacacacat	2280
10	gcacacagca cacgcacaca cagcacacac atgaacacag cacacagcac acacatgcac	2340
	acacagcaca cacgcatgca cagcacacat gaacacagca cacacacaaa cacacagcac	2400
	acacatgcac acacagcaca cacactcatg cgcagcacat acatgaacac agctcacagc	2460
15	acacaaacac gcagcacaca cgttgcacac gcaagcaccc acctgcacac acacatgcgc	2520
	acacacacgc acacccccac aaaattggat gaaaacaata agcatatcta agcaactacg	2580
	atatctgtat ggatcaggcc aaagtcccgc taagattctc caatgttttc atggtctgag	2640
20	ccccgtcct gttcccatct ccactgcccc tcggccctgt ctgtgcctg cctctcagag	2700
	gagggggctc agatggtgcg gcctgagtgt gcggccggcg gcatttggga tacacccgta	2760
	gggtggggcg ggtgtgtccc aggcctaatt ccatctttcc accatgacag agatgccctt	2820
25	gtgaggctgg cctccttggc gcctgtcccc acggcccccg cagcgtgagc cacgatgctc	2880
	cccatacccc acccattccc gatacacctt acttactgtg tgttggccca gccagagtga	2940
30	ggaaggagtt tggccacatt ggagatggcg gtagctgagc agacatgccc ccacgagtag	3000
	cctgactccc tgggtgtgctc ctggaaggaa gatcttgggg accccccac cggagcacac	3060
	ctagggatca tctttgcccg tctcctgggg accccccaa aatgtggag tcctcggggg	3120
35	ccgtgcactg atgcggggag tgtggaagt ctggcggttg gaggggtggg tggggggcag	3180
	tgggggctgg gcggggggag ttctgggta ggaagtgtc ccgggagatt ttggatggaa	3240
	aagtcaaggag gattgacagc agacttgacg aattacatag agaaattagg aacccccaaa	3300
40	tttcatgtca attgatctat tccccctctt tgtttcttgg ggcatttttc cttttttttt	3360
	tttttttgtt ttttttttac ccctccttag ctttatgcgc tcagaaacca aattaaacct	3420
	ccccccatg taacaggggg gcagtgacaa aagcaagaac gcacgaagcc agcctggaga	3480
45	ccaccacgtc ctgccccccg ccatttatcg ccctgattgg attttgttt tcatctgtcc	3540
	ctggtgcttg ggttgagttg agggtgagc ctctggggg gcaactggcca ctgagcccc	3600
	ttgagaagt cagaggggag tggagaaggc cactgtccgg cctggcttct ggggacagtg	3660
50	gctggtcccc agaagtcctg agggcggagg ggggggttg gcaggtctc ctcaggtgtc	3720
	aggaggtgct tcggaggcca caggaggggg ctctggctg gcctgaggct ggccggaggg	3780
55	gaaggggcta gcaggtgtgt aaacagaggg ttccatcagc ctggggcagg gtggccgcct	3840
60		
65		

ES 2 619 032 T3

tccgcacact tgaggaacct tcccctctcc ctcggtgaca tcttgcccgc ccctcagcac 3900
 cctgccttgt ctccaggagg tccgaagctc tgtgggacct ctgggggca aggtggggtg 3960
 5 aggccgggga gtagggaggt caggcgggtc tgagcccaca gagcaggaga gctgccaggt 4020
 ctgcccacg accaggttgc ttgggccccg gagcccacgg gtctggtgat gccatagcag 4080
 ccaccaccgc ggcgcctagg gctgcggcag ggactcggcc tctgggaggt ttacctgcc 4140
 10 cccacttgtg ccccagctc agccccctg cacgcagccc gactagcagt ctagaggcct 4200
 gaggttctg ggtcctggtg acggggtgg catgaccccg ggggtcgtcc atgccagtcc 4260
 gcctcagtcg cagaggggtcc ctcgcaagc gccctgtgag tgggccattc ggaacattgg 4320
 15 acagaagccc aaagagccaa attgtcaca ttgtggaacc cacattggcc tgagatccaa 4380
 aacgcttga ggcaccccaa attacctgcc cattcgtcag gacaccacc caccagtgt 4440
 20 tataattctg ctgcccggag tgggtgttcc cgggggcaact tgccgaccag ccccttgcgt 4500
 ccccaggttt gcagctctcc cctgggccac taaccatcct ggcccgggct gcctgtctga 4560
 cctccgtgcc tagtcgtggc tctccatctt gtctcctccc cgtgtcccca atgtcttcag 4620
 25 tggggggccc cctcttgggt cccctcctct gccatcacct gaagaccccc acgccaaca 4680
 ctgaatgtca cctgtgcctg ccgcctcggc ccacctgag gcccggttt gactcaactc 4740
 aactccttta acgtaatat ttccggcaaa atcccatgct tgggttttgt ctttaacctt 4800
 30 gtaacgcttg caatcccaat aaagcattaa aagtcatgaa aaaaaaaaa aaaaaa 4856

<210> 5
 <211> 1805
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

40 gagacacact ctgcccacac catcctgaag ctacaggtgc tccctcctgg aatctccaat 60
 ggatttcagt cgcagaagct tccacagaag cctgagctcc tcttgcagg cccctgtagt 120
 cagtacagtg ggcatgcagc gcctcgggac gacaccacg gtttatggg gtgctggagg 180
 45 ccggggcatc cgcactctca actccagaca cacggtgaac tatgggagcg atctcacagg 240
 cggcggggac ctgtttgttg gcaatgagaa aatggccatg cagaacctaa atgaccgtct 300
 agcgagctac ctagaaaagg tgcggacct ggagcagtc aactccaaac ttgaagtgca 360
 50 aatcaagcag tggtagcaaa ccaacgcccc gagggctggt cgcgactaca gtgcatatta 420
 cagacaaatt gaagagctgc gaagtcagat taaggatgct caactgcaa atgctcggtg 480
 55 tgtcctgcaa attgataatg ctaaactggc tgctgaggac ttcagactga agtatgagac 540
 tgagagagga atacgtctaa cagtggaagc tgatctccaa ggccctgaata aggtcttga 600
 tgacctaac ctacataaaa cagatttga gattcaaatt gaagaactga ataaagacct 660

60

65

ES 2 619 032 T3

5 agctctcctc aaaaaggagc atcaggagga agtcgatggc ctacacaagc atctgggcaa 720
 cactgtcaat gtggaggttg atgctgctcc aggctgaac cttggcgtca tcatgaatga 780
 aatgaggcag aagtatgaag tcatggccca gaagaacctt caagaggcca aagaacagtt 840
 10 tgagagacag actgcagttc tgcagcaaca ggtcacagtg aatactgaag aattaaagg 900
 aactgaggtt caactaacgg agctgagacg cacctcccag agccttgaga tagaactcca 960
 15 gtcccattc agcatgaaag agtctttgga gcacactcta gaggagacca aggcccgtta 1020
 cagcagccag ttagccaacc tccagtcgct gttgagctct ctggaggccc aactgatgca 1080
 gattcggagt aacatggaac gccagaacaa cgaataccat atccttcttg acataaagac 1140
 20 tcgacttgaa caggaaattg ctacttaccg ccgcttctg gaaggagaag acgtaaaaac 1200
 tacagaatat cagttaagca ccctggaaga gagagatata aagaaaacca ggaagattaa 1260
 gacagtcgtg caagaagtag tggatggcaa ggtcgtgtca tctgaagtca aagaggtgga 1320
 25 agaaaaatc taaatagcta ccagaaggag atgctgctga ggttttgaaa gaaatttggc 1380
 tataatctta tctttgctcc ctgcaagaaa tcagccataa gaaagcacta ttaatactct 1440
 gcagtgatta gaaggggttg ggtggcggga atcctattta tcagactctg taattgaata 1500
 30 taaatgtttt actcagagga gctgcaaatt gcctgcaaaa atgaaatcca gtgagcacta 1560
 gaatatttaa aacatcatta ctgccatctt tatcatgaag cacatcaatt acaagctgta 1620
 gaccacctaa tatcaatttg taggtaatgt tcctgaaaat tgcaatacat ttcaattata 1680
 35 ctaaacctca caaagtagag gaatccatgt aaattgcaaa taaaccactt tctaattttt 1740
 tcctgtttct gaattgtaaa accccctttg ggagtcctg gtttcttatt gagccaattt 1800
 40 ctggg 1805

<210> 6
 <211> 1447
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

50 atccagattt gcttttacat tttcttgccct gagtctgagg tgaacagtga acatatttac 60
 atttgattta acagtgaacc ttaattcttt ctggcttcac agtgaacaa gtttatgcaa 120
 tcgatcaaat attttcatcc ctgaggttaa caattacat caaaatgttt tgtggagact 180
 55 atgtgcaagg aaccatcttc ccagctccca atttcaatcc cataatggat gcccaaatgc 240
 taggaggagc actccaagga tttgactgtg acaaagacat gctgatcaac attctgactc 300
 agcgctgcaa tgcacaaagg atgatgattg cagaggcata ccagagcatg tatggccggg 360
 60 acctgattgg ggatagagg gagcagcttt cggatcactt caaagatgtg atggctggcc 420
 tcatgtaccc accaccactg tatgatgctc atgagctctg gcatgccatg aagggagtag 480

65

ES 2 619 032 T3

5 gcactgatga gaattgcctc attgaaatac tagcttcaag aacaaatgga gaaatthttcc 540
 agatgcgaga agcctactgc ttgcaataca gcaataacct ccaagaggac atttattcag 600
 10 agacctcagg acacttcaga gatactctca tgaacttggc ccaggggacc agagaggaag 660
 gatatacaga ccctgcatg gctgctcagg atgcaatggc cctatgggaa gcctgtcagc 720
 agaagacggg ggagcacaaa accatgctgc aaatgatcct gtgcaacaag agctaccagc 780
 15 agctgctggc ggttttccag gaatttcaaa atatttctgg gcaagatatg gtagatgcca 840
 ttaatgaatg ttatgatgga tactttcagg agctgctggc tgcaattggt ctctgtgttc 900
 gagacaaacc agcctattht gcttatagat tatatagtc aattcatgac tttggtttcc 960
 20 ataataaac tgtaatcagg attctcattg ccagaagtga aatagacctg ctgaccataa 1020
 ggaacgata caaagagcga tatggaaaat ccctatttca tgatatcaga aatthtgctt 1080
 cagggcatta taagaaagca ctgcttgcca tctgtgctgg tgatgctgag gactactaaa 1140
 atgaagagga cttggagtac tgtgcaactc tctttctaga cacttccaaa tagagattht 1200
 ctcaaaaatt tgtactgttc atggcaactat taacaaaact atacaatcat atthtctctt 1260
 25 ctatctthga aattattcta agccaaagaa aactatgaat gaaagtatat gatactgaat 1320
 ttgcctacta tctgaattht gcctactatc taatcagcaa ttaataaat tgtgcatgat 1380
 ggaataatag aaaaattgca ttggaataga thttatthaa atgtgaacca tcaacaacct 1440
 30 acaacaa 1447

35 <210> 7
 <211> 5881
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 7
 ggttgggtgac ttccacagga aaagtthctgg aggagtagcc aaagacctc agcgtthtct 60
 ttatgtgtga gaattgaaat gactagcatt attgacctt ttcagcatcc cctgtgaata 120
 45 thttctgttht ggtthttctt cttgaaaaga aattgttatt cagcccgttht aaaacaaatc 180
 aagaaacttht tgggtaacat tgcaattaca tgaaattgat aaccgcgaaa ataattggaa 240
 ctctgcttg caagtgtcaa cctaaaaaaa gtgctthcctt ttgttatgga agatgtcttht 300
 50 ctgtgattga cttcaattgc tgacttgtgg agatgcagcg aatgtgaaat cccacgtata 360
 tgccatthtcc ctctacgctc gctgacctt ctggaagatc ttgaacctc thctggaaag 420
 gggtaacctat tattacttht tggggcagca gcctggaaaa gtacttgggg accaaagaag 480
 55 gccaaagcttg cctgccctgc atthttatcaa aggagcaggg aagaaggaat catcgaggca 540
 tgggggtcca cactgcaatg thtttgtgga acatgaagcc cttcagcggc cagtagcatc 600
 60 tgactthtgag cctcagggtc tgagtgaagc cgctcgttgg aactccaagg aaaaccttht 660

65

ES 2 619 032 T3

5 cgctggaccc agtgaaaatg accccaacct ttctggtgca ctgtatgatt ttgtggccag 720
 tggagataac actctaagca taactaaagg tgaagagctc cgggtccttag gctataatca 780
 caatggggaa tgggtgtgaag cccaaaccaa aaatggccaa ggctgggtcc caagcaacta 840
 10 catcacgccca gtcaacagtc tggagaaaaca ctctggttac catgggctg tgtcccgcaa 900
 tgccgctgag tatctgctga gcagcgggat caatggcagc ttcttgggtgc gtgagagtga 960
 gagcagctct gccacagagt ccatctcgtc gagatacga gggaggggtgt accattacag 1020
 15 gatcaacact gcttctgatg gcaagctcta cgtctcctcc gagagccgct tcaacaccct 1080
 ggccgagttg gttcatcatc attcaacggg gcccgacggg ctcatcacca cgctccatta 1140
 tccagcccca aagcgcaca agcccactgt ctatggtgtg tcccccaact acgacaagtg 1200
 20 ggagatggaa cgcacggaca tcaccatgaa gcacaagctg ggcggggggcc agtacgggga 1260
 ggtgtacgag ggcgtgtgga agaaatacag cctgacgggt gccgtgaaga ccttgaagga 1320
 ggacaccatg gaggtggaag agttctttaa agaagctgca gtcataaaag agatcaaaca 1380
 25 ccctaacctg gtgcagctcc ttggggctctg caccggggag cccccgttct atatcatcac 1440
 tgagtcatg acctacggga acctcctgga ctacctgagg gagtgcacc gccagggagt 1500
 gaacgcctg gtgctgctgt acatggccac tcagatctcg tcagccatgg agtacctgga 1560
 30 gaagaaaaac ttcattccaca gagatcttgc tgcggaaac tgcctggtag gggagaacca 1620
 cttggtgaag gtagctgatt ttggcctgag caggttgatg acaggggaca cctacacagc 1680
 ccattgctgga gccaaagtcc ccatcaaatg gactgcacc gagagcctgg cctacaacaa 1740
 35 gttctccatc aagtcgacg tctgggcatt tggagtattg ctttgggaaa ttgctaccta 1800
 tggcatgtcc ccttaccggg gaattgacct gtcccaggtg tatgagctgc tagagaagga 1860
 ctaccgcatg gagcggccag aaggctgccc agagaaggtc tatgaaactca tgcgagcatg 1920
 40 ttggcagtg aatccctctg accggccctc ctttgctgaa atccaccaag cctttgaaac 1980
 aatgttccag gaatccagta tctcagacga agtggaaga gagctgggga aacaaggcgt 2040
 45 ccgtggggct gtgagtacct tgctgcaggc cccagagctg cccaccaaga cgaggacctc 2100
 caggagagct gcagagcaca gagacaccac tgacgtgcct gagatgcctc actccaaggg 2160
 ccagggagag agcgatcctc tggaccatga gcctgccgtg tctccattgc tccctcgaaa 2220
 50 agagcgaggt cccccggagg gcggcctgaa tgaagatgag cgccttctcc ccaaagacaa 2280
 aaagaccaac ttgttcagcg ccttgatcaa gaagaagaag aagacagccc caaccctcc 2340
 caaacgcagc agctccttcc gggagatgga cggccagccc gagcgcagag gggccggcga 2400
 55 ggaagagggc cgagacatca gcaacggggc actggcttcc acccccttgg acacagctga 2460
 ccagccaag tccccaaagc ccagcaatgg ggetggggtc cccaatggag cctccgggga 2520
 60 gtccgggggc tcaggcttcc ggtctcccca cctgtggaag aagtccagca cgctgaccag 2580

65

ES 2 619 032 T3

cagccgccta gccaccggcg aggaggaggg cggtaggcagc tccagcaagc gcttcctgcg 2640
 ctcttgctcc gcctcctgcg ttccccatgg ggccaaggac acggagtgga ggtcagtcac 2700
 5 gctgcctcgg gacttgcagt ccacgggaag acagtttgac tctgtccacat ttggagggca 2760
 caaaagtgag aagccggctc tgcctcggaa gagggcaggy gagaacaggt ctgaccaggt 2820
 gacccgaggc acagtaacgc ctccccccag gctggtgaaa aagaatgagg aagctgctga 2880
 10 tgaggtcttc aaagacatca tggagtccag cccgggctcc agcccgccca acctgactcc 2940
 aaaaccctc cggcggcagc tcaccgtggc ccctgcctcg ggcctcccc acaaggaaga 3000
 agctgaaag ggcagtgcct tagggacccc tgtgcagct gagccagtga cccccaccag 3060
 15 caaagcaggc tcaggtgcac cagggggcac cagcaagggc cccgccgagg agtccagagt 3120
 gaggagcac aagcactcct ctgagtcgcc agggagggac aaggggaaat tgtccaggct 3180
 caaacctgcc ccgccgccc caccagcagc ctctgcaggg aaggctggag gaaagccctc 3240
 20 gcagagccc agccaggagc cggccgggga ggcagtcctg ggcgcaaaga caaaagccac 3300
 gagtctggt gatgctgtga acagtgcgc tgccaagccc agccagccgg gagagggcct 3360
 caaaaagccc gtgctcccgg ccaactccaaa gccacagtc gccaaagccgt cggggacccc 3420
 25 catcagccc gcccccgtc cctccacgtt gccatcagca tctcggccc tggcagggga 3480
 ccagccgtct tccaccgcct tcatccctct catatcaacc cgagtgtctc ttoggaaaaac 3540
 ccgccagcct ccagagcggg tgcagcagg cgccatcacc aagggcgtgg tctcggacag 3600
 30 caccgagcgc ctgtgcctcg ccatctctag gaactccag cagatggcca gccacagcgc 3660
 agtgctggag gccggcaaaa acctctacac gttctgcgtg agctatgtgg attccatcca 3720
 35 gcaaatgagg aacaagtttg ccttccgaga ggccatcaac aaactggaga ataatctccg 3780
 ggagcttcag atctgcccgg cgacagcagg cagtgggtcca gggccactc aggacttcag 3840
 caagctcctc agttcgggtga aggaaatcag tgacatagt cagaggtagc agcagtcagg 3900
 40 ggtcaggtgt caggcccgtc ggagctgcct gcagcacatg cgggctcgcc cataccctg 3960
 acagtggtg acaagggact agtgagtcag caccttggcc caggagctct gcgccaggca 4020
 gagctgaggg ccctgtggag tccagctcta ctacctacgt ttgcaccgcc tgcctcccg 4080
 45 caccttctc ctccccgtc cgtctctgtc ctogaatctt atctgtggag ttctgctcc 4140
 gtggactgca gtcggcatgc caggaccgc cagccccgt cccacctagt gcccagact 4200
 50 gagctctcca gccaggtgg gaacggctga tgtggactgt ctttttcatt tttttctctc 4260
 tggagcccct cctccccgg ctgggcctcc ttcttccact tctccaagaa tggagcctg 4320
 aactgagccc ttgtgtgtca ggcctctgc ctgcactccc tggccttggc cgtcgtgtgc 4380
 55 tgaagacatg tttcaagaac cgcatttcgg gaagggcatg cacgggcatg cacacggctg 4440

60

65

ES 2 619 032 T3

5 gtcactctgc cctctgctgc tgcccggggt ggggtgcaact cgccatttcc tcacgtgcag 4500
 gacagctctt gatttgggtg gaaaacaggg tgctaaagcc aaccagcctt tgggtcctgg 4560
 gcaggtggga gctgaaaagg atcgagggcat ggggcatgtc ctttccatct gtccacatcc 4620
 ccagagccca gctcttgctc tcttgtgacg tgcaactgtga atcctggcaa gaaagcttga 4680
 gtctcaaggg tggcaggtca ctgtcaactgc cgacatccct ccccagcag aatggaggca 4740
 10 ggggacaagg gaggcagtgg ctagtggggt gaacagctgg tgccaaatag ccccagactg 4800
 ggcccaggca ggtctgcaag ggcccagagt gaaccgtcct ttcacacatc tgggtgcct 4860
 gaaaggccc tcccctccc cactcctct aagacaaagt agattcttac aaggcccttt 4920
 15 cctttggaac aagacagcct tcacttttct gagtcttga agcatttcaa agccctgcct 4980
 ctgtgtagcc gccctgagag agaatagagc tgccactggg cacctgcgca caggtgggag 5040
 gaaaggcct ggccagtcct ggtcctggct gcaactctga actgggagaa tgtcttattt 5100
 20 aattaccgtg agtgacatag cctcatgttc tgtgggggtc atcaggagg gttaggaaaa 5160
 ccacaaacgg agcccctgaa agcctcacgt atttcacaga gcacgcctgc catcttctcc 5220
 25 ccgaggctgc cccaggccgg agcccagata cgggggctgt gactctgggc agggaccgg 5280
 ggtctcctgg accttgacag agcagctaac tccgagagca gtgggcaggt ggcccctcct 5340
 gaggttcac gccgggagaa gccacctcc cacccttca taccgcctcg tgccagcagc 5400
 30 ctgcacagc ccctagcttt acgctcatca cctaaacttg tactttattt ttctgataga 5460
 aatggtttcc tctggatcgt tttatgggtt tottacagca catcacctct ttgccccga 5520
 35 cggctgtgac gcagccggag ggaggcacta gtcaccgaca gcggccttga agacagagca 5580
 aagcgeccac ccaggtcccc cgactgcctg tctccatgag gtactggtcc cttccttttg 5640
 ttaacgtgat gtgccactat attttacacg tatctcttgg tatgcatctt ttatagacgc 5700
 40 tcttttctaa gtggcgtgtg catagcgtcc tgccctgcc cctcgggggc ctgtggtggc 5760
 tcccctctg cttctcgggg tccagtgcac tttgttctg tatatgattc tctgtggttt 5820
 tttttgaatc caaatctgtc ctctgtagta ttttttaaat aaatcagtgt ttacattaga 5880
 45 a 5881

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 55 <400> 8
 gatcaacact gcttctgat gcaa 24
 <210> 9
 <211> 25
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 65 <400> 9

ccaccgttga atgatgatga accaa 25

5 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 10
 cctccgagag cgcctcaac 20

15 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 11
 cctccgagag cgcctcaac 20

25 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 12
 cctccgagag cgcctcaac 20

35 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintética

45 <400> 13
 ttgaagagct gcgaagtcaag at 22

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

55 <400> 14
 tgaagtcctc agcagccagt t 21

<210> 15
 <211> 26
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

65 <400> 15

tcaactgcaa aatgctcggg ggtgcc 26

5 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

<400> 16
 cgcggtctct actcagcag 20

15 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

<400> 17
 gcggaacag cactcctcaa 20

25 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 18
 tgtgagccgt cgcagccgtg 20

35 <210> 19
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintética

<400> 19
 acccggtca cctgcgaa 18

45 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintética

<400> 20
 ggactcccgc ggacacaa 18

55 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 21

tcctggaag cgagtgcccc taa 23
 <210> 22
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 10 <400> 22
 cctggaagc gagtgcccct aa 22
 <210> 23
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Sintética
 <400> 23
 ggctattctc ctctggcag at 22
 25 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintética
 <400> 24
 35 tgcttgagct ccagtccta ag 22
 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sintética
 <400> 25
 45 agccgagaag gcgagctcg gc 22
 <210> 26
 <211> 27
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 55 <400> 26
 gtgaaacaag ttatgcaat cgatcaa 27
 <210> 27
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 65 <400> 27

gattgaaatt gggagctggg aa 22

<210> 28
 <211> 29
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 28
 tcatccctga ggtaacaat tacatcaa 29

<210> 29
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Sintética

<400> 29
 cgactacagt gcatattaca gacaa 25

25 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

<400> 30
 35 cagcagccag ttagcatta tcaa 24

<210> 31
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintética

<400> 31
 45 tcaactgcaa aatgctcggg gtgtcc 26

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

55 <400> 32
 ggaccgcggc ttctactca 20

<210> 33
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

65 <400> 33

ccaggtcaca gctgcgaa 19

5 <210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 34
tgtgagccgt cgagccgtg 20

15 <210> 35
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 35
tgcgaagcgc ctgggaagc 19

25 <210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 36
ggactcccgc ggacacaa 18

35 <210> 37
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sintética

<400> 37
tgcccctaac atcggtgc c 21

45 <210> 38
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sintética

<400> 38
tcagcgctgc aatgcacaa 19

55 <210> 39
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sintética

65 <400> 39

ggccagccat cacatcttg aa 22

5 <210> 40
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética

tagagcatgt atggccggga cct 23

15 <400> 40
 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética

gatcaacact gcttctgatg gcaa 24

25 <400> 41
 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

ccaccgttga atgatgatga accaa 25

35 <400> 42
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sintética

cctccgagag cgcgttcaac 20

45 <400> 43
 <210> 44
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sintética

ggctattctc ctcttggcag at 22

55 <400> 44
 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 45

ES 2 619 032 T3

tgcttgagct ccagtccta ag 22

<210> 46
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

10 <400> 46
 agccgagaag gcgagctctg gc 22

<210> 47
 15 <211> 500
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Sintética

<400> 47

25 gaugcucacu ucaucuaugg uuaccucggg acuuuuacac caacagaacu agcaucaucc 60
 ucugcauggu caggucaugg aucggcaucc ugacaguuuc gggaaauagg caucugcagu 120
 cuuacugcuc aucggcugau gaugcugcug uaaucuccau ccaagcaagc uugugauccu 180
 30 ccgccauuau cccaaauggu auaacauuaa ggacuuaaag cuaugcaauu aucaccuugu 240
 uuuucaacag caagaccuaa uauuuucuuu ucaucauuua ugccuuuuga uggaucaggc 300
 aaccuuuuau aaauauguuc accagccgaa gucaguagug auuggguggu uccuggcuug 360
 35 ggaucaugcc gcugcagagg cuauucuccu cuuggcagau ugucuguagc cgagaaggcg 420
 gagucuggca augaugaugc auacagugua cgacagccuu agggacugga gcucaagcag 480
 uguuuccuca accagucaca 500

40

<210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

50 <400> 48
 ctgcaatgca caaaggatga 20

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia de cáncer de vejiga en un sujeto, que comprende la detección de los niveles de cada marcador de un conjunto de marcadores de cáncer de vejiga en una muestra del sujeto, en el que el conjunto de marcadores de cáncer de vejiga consiste en ARNm de hormona liberadora de corticotropina (CRH), ARNm del factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), ARNm de queratina 20 (KRT20) y ARNm de anexina 10 (ANXA10), en el que el nivel de cada uno de los marcadores se compara con un nivel normal o de control del marcador, en el que un nivel normal o de control se determina como un nivel promedio o intervalo que es característico de las células uroteliales normales o de otros materiales de referencia, y en el que la detección de un nivel elevado de al menos un marcador indica la presencia de cáncer de vejiga en el sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además detectar un control endógeno y/o un control exógeno.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el control endógeno se selecciona de ABL, GUSB, GAPDH, TUBB y UPK1; y/o en el que el control exógeno es un ARN.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la detección comprende RT-PCR, en la que la RT-PCR es, opcionalmente, RT-PCR cuantitativa.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la reacción de RT-PCR tarda menos de 2 horas desde una etapa de desnaturalización inicial hasta una etapa de extensión final.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el método comprende poner en contacto el ARN de la muestra con un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para detectar CRH, un segundo par de cebadores para detectar IGF2, un tercer par de cebadores para detectar KRT20 y un cuarto par de cebadores para detectar ANXA10; en el que cada par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga produce un amplicón que tiene de 50 a 500 nucleótidos de longitud, de 50 a 400 nucleótidos de longitud, de 50 a 300 nucleótidos de longitud, de 50 a 200 nucleótidos de longitud o de 50 a 150 nucleótidos de longitud; en el que cada par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga abarca, opcionalmente, un intrón en la secuencia genómica.
7. El método de la reivindicación 6, en el que:
- (a) el primer par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 20, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 36, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (b) el segundo par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 16 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 17, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 32 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 33, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (c) el tercer par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 14, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 30, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (d) el cuarto par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que

- comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 26 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 27, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 38 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (iii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 48 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.
8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que el método comprende además poner en contacto el ARN de la muestra con: (a) un par de cebadores de control endógeno, en el que el par de cebadores de control endógeno es, opcionalmente, para detectar ABL; y/o (b) un par de cebadores de control exógeno, en el que el par de cebadores de control exógenos es, opcionalmente, para detectar un ARN exógeno.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el método comprende además la formación de un conjunto de amplicones de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de amplicones de marcadores de cáncer de vejiga consiste en un amplicón de CRH, un amplicón de IGF2, un amplicón de KRT20 y un amplicón de ANXA10, y poner en contacto los amplicones de marcadores de cáncer de vejiga con un conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga consiste en una primera sonda para detectar el amplicón de CRH, una segunda sonda para detectar el amplicón de IGF2, una tercera sonda para detectar el amplicón de KRT20 y una cuarta sonda para detectar el amplicón de ANXA10.
10. El método de la reivindicación 9, en el que:
- (a) la primera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 21 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 37, en el que la primera sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (b) la segunda sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 34 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 18, en el que la segunda sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (c) la tercera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 15 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 31, en el que la tercera sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- (d) la cuarta sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 28 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 40, en el que la cuarta sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
11. El método de la reivindicación 10, en el que cada sonda marcadora de cáncer de vejiga comprende un colorante, y en el que cada colorante es diferente de forma detectable de los otros tres colorantes; y en el que cada sonda comprende un colorante fluorescente y una molécula inactivadora.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el método comprende además formar un amplicón de control endógeno y/o un amplicón de control exógeno y poner en contacto el amplicón de control endógeno con una sonda de control endógena y/o poner en contacto el amplicón de control exógeno con una sonda de control exógena, en el que la sonda de control endógena comprende un colorante que es diferente de forma detectable de los colorantes de las sondas marcadoras de cáncer de vejiga y la sonda de control exógena comprende un colorante que es diferente de forma detectable de los colorantes de las sondas marcadoras de cáncer de vejiga y la sonda de control endógena.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el conjunto de marcadores de cáncer de vejiga se detecta en una única reacción multiplex.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra comprende células uroteliales y en el que la muestra se selecciona, opcionalmente, de una muestra de orina y una muestra de lavado de la vejiga.
- 5 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene al menos un síntoma de cáncer de vejiga, en el que al menos un síntoma se selecciona de entre dolor abdominal, sangre en la orina, micción dolorosa, micción frecuente, urgencia urinaria e incontinencia.
- 10 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sujeto tiene antecedentes de cáncer de vejiga y está siendo controlado para detectar la recurrencia del cáncer de vejiga, y en el que el sujeto se ha tratado, opcionalmente, con el bacilo de Calmette - Guerin (BCG) en los últimos tres meses.
- 15 17. Una composición que comprende un conjunto de pares de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de pares de cebadores de marcadores del cáncer de vejiga consiste en un primer par de cebadores para la detección de CRH, un segundo par de cebadores para la detección de IGF2, un tercer par de cebadores para la detección de KRT20 y un cuarto par de cebadores para la detección de ANXA10.
18. La composición de la reivindicación 17, en la que:
- 20 (a) el primer par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 19 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 20, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 35 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 36, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 25 30 (b) el segundo par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 16 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 17, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 32 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 33, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 35 40 (c) el tercer par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 14, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 29 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 30, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 45 50 (d) el cuarto par de cebadores de marcadores de cáncer de vejiga comprende (i) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 26 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 27, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35, o menos de 30 nucleótidos de longitud; o (ii) un primer cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 38 y un segundo cebador que comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; o
- 55 60 (iii) un primer cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 48 y un segundo cebador que comprende al menos 12, al menos 13, al menos 14, o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 39, en el que cada cebador tiene una longitud de menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos.
- 65 19. La composición de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en la que la composición comprende

adicionalmente un conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga, en el que el conjunto de sondas marcadoras de cáncer de vejiga consiste en una primera sonda para detectar un amplicón de CRH, una segunda sonda para detectar un amplicón de IGF2, una tercera sonda para detectar un amplicón de KRT20 y una cuarta sonda para detectar un amplicón de ANXA10, y, opcionalmente, en la que:

- 5
- (a) la primera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 21 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 37, en el que la primera sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 10
- (b) la segunda sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 34 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 18, en el que la segunda sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 15
- (c) la tercera sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 15 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 31, en el que la tercera sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 20
- (d) la cuarta sonda comprende al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17, o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 28 o al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 o al menos 15, al menos 16, al menos 17 o al menos 18 nucleótidos de SEQ ID NO: 40, en el que la cuarta sonda tiene menos de 50, menos de 45, menos de 40, menos de 35 o menos de 30 nucleótidos de longitud; y
- 25

30

35

40

45

50

55

60

65