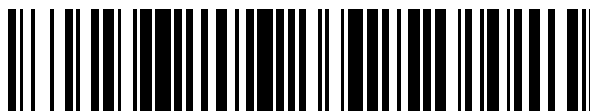


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 404**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2013 PCT/EP2013/051899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2013 E 13701662 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2809801**

54 Título: **Diagnóstico no invasivo del cáncer**

30 Prioridad:

31.01.2012 EP 12153340

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

27.11.2018

73 Titular/es:

**SPEISER, PAUL (100.0%)
Hameastr. 39B1
1190 Wien, AT**

72 Inventor/es:

ZEILLINGER, ROBERT

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 691 404 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico no invasivo del cáncer

La invención se refiere a un método no invasivo para el diagnóstico del adenocarcinoma o sus lesiones precursoras, en particular el cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (EC), en un sujeto de sexo femenino mediante el análisis de las células de dicho sujeto, a un kit para el diagnóstico del cáncer ovárico o endometrial o sus lesiones precursoras, y a un método de selección.

Antecedentes

Epidemiología, clasificación, patogénesis, prognosis de CO y CE

El CO es la principal causa de muerte por malignidades ginecológicas en los países civilizados occidentales, con una frecuencia calculada en Europa y EE. UU. de 752.600 en 2007 y 59.828 muertes anuales. El tratamiento y la supervivencia de los pacientes dependen principalmente del estadio de la enfermedad. De todos los pacientes con CO, solo 25% son diagnosticados en un estadio temprano cuando el tumor está confinado a la pelvis. En estos casos, la tasa de supervivencia a cinco años es del 80% al 90% y, a menudo, la enfermedad puede curarse mediante la combinación de cirugía y quimioterapia, y cada vez con más frecuencia se denomina CO de tipo I. Por desgracia, casi 75% de la mujeres afectadas presentan la enfermedad en un estadio avanzado con una propagación metastásica a través de la cavidad abdominal o hacia los nódulos linfáticos retroperitoneales en el momento del diagnóstico; las tasas de supervivencia a cinco años descienden hasta 19%-32% para la enfermedad avanzada, a pesar del esfuerzo quirúrgico y la quimioterapia de combinación. Este denominado CO de tipo II es el cáncer más letal en mujeres, incluso más agresivo que el cáncer de pulmón. (Altekruze S.F. *et al.*, 2007, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, basado en la presentación de los datos de SEER de noviembre de 2009, subido al sitio web de SEER, 2010; GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer, subido al sitio web de Globocan, 2010, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.asp>; Goff B. *et al.*, 2010, www.uptodate.com.)

En la actualidad, los patólogos emplean un sistema de clasificación basado en la morfología para dividir el CO y el CE en subgrupos generales basándose en el grado de diferenciación (grado del tumor) y el subtipo histológico (por ejemplo, seroso, endometriode, de células claras o mucinoso).

Cho (Arch. Pathol. Lab. Med., 2009, 133(11):1775-1781) describe un nuevo modelo para clasificar tumores de ovario, en el que los tumores epiteliales superficiales se dividen en dos categorías amplias denominadas tumores de tipo I y de tipo II basándose en su patrón de avance del tumor y en cambios genéticos moleculares. Los tumores de tipo I incluyen el carcinoma seroso de grado bajo, el carcinoma endometriode de grado bajo y un subconjunto de carcinomas de células claras y carcinomas mucinosos que se desarrollan de modo discontinuo a partir de precursores reconocidos. Los tumores de tipo II son de grado alto y casi siempre se han propagado más allá de los ovarios en la presentación. Los carcinomas de tipo II incluyen el carcinoma seroso de grado alto, el carcinoma endometriode de grado alto, el carcinoma indiferenciado, posiblemente algunos carcinomas de células claras y carcinomas mucinosos, y el tumor mesodérmico mixto maligno (carcinosarcoma). Los carcinomas de tipo II supuestamente evolucionan con rapidez, se propagan en un estadio temprano de su desarrollo clínico, no avanzan de una manera discontinua (estadio I a IV) y son muy agresivos. Por contraste con los tumores de tipo I, se cree que los tumores de tipo II no presentan lesiones precursoras morfológicamente reconocibles antes de ser detectados en las trompas de Falopio.

Gross *et al.* (Journal of Oncology, 2010, artículo ID 126295, doi: 10.1155/2010/126295) describen un estudio para identificar lesiones precursoras de CO y CE y apoyan la idea de un origen para el CO seroso en las trompas de Falopio. La lesión precursora del CO en las trompas de Falopio se denomina carcinoma intraepitelial tubárico seroso ("serous tubal intraepithelial carcinoma", STIC). Gross *et al.* también descubrieron lesiones precursoras muy similares en el endometrio y, en analogía a las trompas de Falopio, las describen como carcinoma intraepitelial endometrial seroso ("serous endometrial intraepithelial carcinoma", SEIC).

Dubeau (Lancet Oncol., 2008, 9(12):1191-1197) sostiene que una gran proporción de tumores epiteliales ováricos, carcinomas de las trompas de Falopio y carcinomas peritoneales tienen la misma naturaleza y pueden considerarse como una única entidad de enfermedad.

El CE (carcinoma del revestimiento del útero) es la malignidad ginecológica más habitual en los países civilizados occidentales; en EE. UU. se diagnostican aproximadamente 42.160 casos anuales y se producen 7780 muertes. Por fortuna, la mayoría de los casos se diagnostican en un estadio temprano cuando pueden curarse simplemente con cirugía. Las tasas de supervivencia a cinco años para la enfermedad localizada, regional y metastásica son de 96, 66 y 24%, respectivamente (Jemal A. *et al.*, Cancer statistics, 2009, CA Cancer J. Clin., 2009, 59:225).

El CE de tipo I depende del estrógeno y está asociado con trastornos que elevan los niveles de estrógeno. La lesión precursora, la hiperplasia endometrial atípica, ha sido bien descrita. Tiene una histología endometriode, está bien diferenciada en la mayoría de los casos y habitualmente se diagnostica en un estadio temprano debido a un sangrado irregular y, por tanto, presente una buena prognosis. El EC de tipo II no depende del estrógeno y tiene una

histología endometriode o serosa o de células clara de alto grado. Por contraste con los cánceres de tipo I, la inmensa mayoría, en especial de cánceres serosos, son de alto grado, afectan a mujeres postmenopáusicas, no presentan síntomas tempranos, se diagnostican en un estadio avanzado, se comportan más como el CO y tienen una prognosis muy mala.

5 *Presentación clínica y tratamiento diagnóstico de CO y CE sospechado*

Por desgracia, la mayoría de los pacientes con CO o CE epitelial, en particular los carcinomas serosos o carcinomas de tipo II, no tienen síntomas o tienen pocos síntomas hasta que la enfermedad se ha metastatizado extensamente. La falta de síntomas tempranos y la ausencia de un ensayo de selección fiable para detectar la enfermedad de forma temprana provocan que la mujer recibe el diagnóstico después de que la enfermedad se haya propagado más allá del ovario o del útero y tiene una prognosis mala. Por estas razones, existe una necesidad médica evidente de contar con un diagnóstico más temprano para CE y CO de tipo II seroso de alto grado. Además, la detección de STIC y SEIC podría incluso prevenir el CE y CO de tipo II seroso de alto grado.

El sangrado irregular como principal síntoma del CE se investiga habitualmente mediante la toma de muestras endometriales y el posterior examen del tejido de la muestra al microscopio. La biopsia endometrial puede realizarse como un procedimiento realizado en consulta, en el que un espéculo se inserta en la vagina, y un pequeño tubo de plástico flexible se inserta a través de la cervix y hacia el interior del útero. A través del tubo puede succionarse una pequeña cantidad de endometrio para el examen histológico. Como alternativa, una mujer puede someterse a un procedimiento más invasivo denominado "dilatación y legrado" que implica una toma de muestras extensa del endometrio. Esto permite el diagnóstico del estadio temprano de tipo I y habitualmente del carcinoma endometriode. El sangrado del CE de tipo II seroso se examina de la misma manera, pero la enfermedad en el momento del diagnóstico habitualmente ya se encuentra en un estadio avanzado. En la actualidad no existe ningún método para el diagnóstico temprano del CE de tipo II por la falta de síntomas tempranos.

Stirling (J. Clin. Oncol., 2005, 23(24):5588-5596) resume los ensayos de diagnóstico más novedosos para el CO. Estos incluyen una ultrasonografía transvaginal y mediciones del antígeno de cáncer en suero (CA-125). El ultrasonido transvaginal implica la inserción de una sonda en la vagina que emplea ultrasonidos para crear una imagen. Sin embargo, la especificidad de ambos ensayos, con ultrasonidos y con mediciones de CA-125 en suero, es muy baja, y ambos ensayos no son eficaces para detectar el CO con la suficiente antelación como para mejorar los resultados clínicos. El diagnóstico definitivo del CO sigue confiando en la confirmación histológica o citológica. Estos descubrimientos subrayan la importancia de un ensayo eficaz para la detección temprana del CO.

El documento WO01/75177A2 describe marcadores tumorales en el cáncer ovario y métodos para diagnosticar y pronosticar tumores ováricos empleando muestras, por ejemplo, seleccionadas del grupo que consiste en una biopsia de tejido, legrados epiteliales ováricos, fluido peritoneal, sangre, orina y suero.

El documento WO99/24620A1 describe selecciones primarias para la displasia cervical mediante la medición de un marcador bioquímico de la apoptosis y/o la angiogénesis en cada célula de una población de células obtenidas a partir de una toma de muestras conveniente con torunda, esponja, legrado o lavado de células epiteliales superficiales de la cervix.

El documento US20030165831A1 describe métodos para detectar cánceres ováricos determinando una diversidad de marcadores. Las células malignas se detectan en una muestra de un paciente, por ejemplo, en un fluido corporal asociado al ovario.

40 *Cambios genéticos en CO y CE*

Unos estudios patológicos detallados de ovarios y trompas de Falopio retirados profilácticamente de mujeres asintomáticas con mutaciones de la línea germinal BRCA 1 o BRCA2 (BRCA+) han conducido al descubrimiento de un cambio maligno temprano en las trompas de Falopio denominado STIC. Los STIC han relacionado muchos carcinomas serosos ováricos y peritoneales con las trompas de Falopio. En más del 90% de STIC y carcinomas serosos de alto grado, pero también en CO endometriode y CE seroso, se pueden encontrar mutaciones en el gen supresor de tumor TP53. Se ha demostrado que estas mutaciones representan alteraciones clonales, porque se han encontrado las mismas mutaciones en STIC de pacientes con CO seroso de tipo II avanzado y SEIC en pacientes con CE seroso (Karishma M. *et al.*, 2011, *Frontiers in Biosciences* E3, 1 de enero, 625-634; Kuhn *et al.*, *J. Pathol.*, 2011, doi: 10.1002/path.3023). El análisis de las mutaciones del gen TP53 y las alteraciones en la expresión de p53 incluyen el análisis de la secuencia y la tinción inmunohistoquímica. TP53 codifica una proteína (p53) que actúa como mediador central de la respuesta celular al estrés genotóxico y no genotóxico.

La vía de PI3K/Akt es otra vía de señalización que se encuentra alterada con frecuencia en los cánceres humanos, incluyendo los adenocarcinomas endometrioides ováricos y endometriales. Esta vía de señalización desempeña papeles importantes en el avance del ciclo celular, la supervivencia celular, la respuesta a la disponibilidad de nutrientes, la motilidad celular y la angiogénesis. La señalización a través de la vía de PI3K se inicia mediante la interacción de ligandos específicos con receptores de tirosina quinasa que abarcan la membrana plasmática, tales como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico, "epidermal growth factor receptor"), c-kit, y el receptor 1 del factor de crecimiento similar a insulina. La interacción del ligando/receptor conduce al reclutamiento y la

activación de PI3K, que convierte PIP2 (fosfatidilinositol-4,5 bifosfato) en PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato). A su vez, PIP3 transmite señales de crecimiento y supervivencia mediante el reclutamiento de ciertas quinasas, tales como la familia de quinasas de proteína quinasas B/Akt y la quinasa 1 dependiente de fosfoinositida (PDK1) a la membrana. En parte a través de la fosforilación por PDK1, Akt es activado y fosforila dianas corriente abajo específicas, muchas de las cuales desempeñan papeles clave en la regulación de importantes funciones celulares, tales como la proliferación, el tamaño de las células, la apoptosis, la respuesta a nutrientes y los daños en el ADN. La fosfatasa de lípidos Pten elimina el D3 fosfato de PIP3, con lo que inactiva la cascada de señalización y regenera PIP2. En los adenocarcinomas endometrioides, la vía de PI3K/Akt a menudo está desregulada debido a mutaciones inactivantes de PTEN o a través de mutaciones activantes de PIK3CA, que codifica la subunidad catalítica de PI3K (véase Cho (2009), Arch. Pathol. Lab. Med., noviembre, 133(11):1775-1781).

Se ha indicado que las mujeres con una mutación en la línea germinal BRCA1 o BRCA2 tienen un riesgo sustancial de padecer CO (Pruthi *et al.*, Mayo Clin. Proc., 2010, 85(12), 1111-1120).

Histerosonografía de contraste con disolución salina

El criterio de referencia para la investigación de una patología endometrial benigna sospechada es el ultrasonido transvaginal. El diagnóstico diferencial del endometrio con un espesor anómalo puede ser difícil, puesto que los revestimientos endometriales de la pared anterior y posterior del útero se tocan. Esta circunstancia dificulta la visualización de los tumores endometriales benignos, tales como pólipos. Para separar los revestimientos endometriales, se ha desarrollado un método denominado histerosonografía de contraste con disolución salina. Durante esta exploración se introduce un catéter fino en la cavidad uterina a través del cuello del útero y se instila disolución salina, con lo que se separan los revestimientos endometriales y se puede lograr una mejor visualización. La histerosonografía de contraste con disolución salina es una exploración no invasiva que puede realizarse en la consulta, es muy bien tolerada y permite una aplicación habitual (de Kroon *et al.*, 2003, BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 110, 938-947). Durante la histerosonografía de contraste con disolución salina, aproximadamente 10 ml de disolución salina normal se introducen lentamente con jeringa en la cavidad uterina y las trompas de Falopio.

El dispositivo preferido para realizar un enjuagado y/o lavado del útero y las trompas de Falopio es un catéter, por ejemplo, un catéter de tres vías. Puede insertarse en el canal cervical y se infla el globo, por ejemplo, con disolución salina normal, para sellar el canal cervical. Si el canal cervical es demasiado estrecho para que pase el catéter, puede dilatarse opcionalmente, por ejemplo, con dilatadores Hegar después de la aplicación de un pulverizado de xilocaína.

Según un ejemplo específico, dos jeringas de 10 ml (una contiene 10 ml de disolución salina normal) se conectan a los dos canales. Con la ayuda de una silla ginecológica, el paciente se coloca en posición erguida (posición anti-Trendellenbur). Mediante el desplazamiento del émbolo de la jeringa que contiene la disolución salina normal, el fluido lentamente se introduce en la cavidad uterina y las trompas. Simultáneamente, el émbolo de la jeringa vacía se extrae lentamente, succionando el fluido de la cavidad uterina y las trompas. Cuando un tubo lentamente se vacía, el otro lentamente se llena. Después de terminar el lavado se tapa la jeringa llena y se envía al laboratorio.

Es muy importante el desarrollo de un ensayo nuevo y alternativo para detectar el CO o CE y sus lesiones precursoras, en particular el CO o CE seroso o la enfermedad en estadios tempranos. Así, un objeto es proporcionar una tecnología que solucione la actual falta de un ensayo conveniente, seguro y barato que pueda utilizarse para el diagnóstico temprano o en un programa de selección para la búsqueda de cánceres o lesiones precancerosas en mujeres que no presentan síntomas de la enfermedad.

Sumario de la invención

El objeto se resuelve por medio del contenido de la presente según se reivindica.

Según la invención, se proporciona un método no invasivo para el diagnóstico *ex vivo* del cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (EC), o sus lesiones precursoras, en un sujeto de sexo femenino mediante el análisis de las células de dicho sujeto, en particular una mutación genética, que comprende:

- preparar células epiteliales de una muestra de dicho sujeto obtenida a partir de un enjuagado de la cavidad uterina, y

- realizar el análisis de dichas células para determinar mutaciones, alteraciones en los niveles de expresión o en la metilación de promotores y/o cambios cromosómicos de un biomarcador, en el que dichas mutaciones, alteraciones o cambios están asociados con el cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (CE) o sus lesiones precursoras, y que se determinan mediante al menos uno de:

- genotipificar al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,

- realizar un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 5 - detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 10 - detectar la hipermetilación del promotor de un gen seleccionado del grupo de p16(INK4a), BRCA1, hMLH1 y TUSC3 o sus combinaciones, o
- realizar un análisis al nivel celular empleando inmunocitoquímica o hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) sobre un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones.
- 15
- Preferiblemente, el análisis comprende un análisis molecular, por ejemplo, para determinar mutaciones de biomarcadores o células. De modo específico, la anomalía es una anomalía relacionada con la genética, por ejemplo, la expresión diferencial de uno o más biomarcadores de dichas células.
- De modo específico, dicha muestra se obtiene a partir del enjuagado de las trompas de Falopio, por ejemplo, el enjuagado de la cavidad uterina y las trompas de Falopio.
- 20
- Según una realización específica, dicha muestra se obtiene mediante un enjuagado no invasivo con disolución salina normal (NISR), en particular la empleada en la sonohisterografía o histerosonografía de contraste con disolución salina. Tras el enjuagado puede extraerse una muestra del enjuagado o efluente para su posterior análisis.
- De modo específico, dichas células pueden separarse de dicha muestra y/o puede extraerse el ácido nucleico, por ejemplo, empleando medios y tampones convencionales.
- 25
- Un método de análisis específico puede emplear un método basado en la amplificación, tal como el empleo de una PCR, o un método de secuenciación, para determinar una secuencia de ácido nucleico, en particular para determinar mutaciones en regiones codificadoras o no codificadoras.
- La anomalía específicamente determinada es indicativa de CO o CE, tal como cáncer seroso o carcinoma de tipo II, o una neoplasia precursora de estos, tal como carcinoma intraepitelial de las trompas de Falopio y/o del revestimiento endometrial, que incluye el carcinoma intraepitelial seroso.
- 30
- Según una realización específica, el método según la invención se proporciona para el diagnóstico del CO y CE de estadio temprano.
- Según otra realización específica, el método según la invención se proporciona para el diagnóstico diferencial del CO y CE en sujetos con sospecha de padecer CO y CE. Se entiende que el diagnóstico diferencial es, en particular, la determinación de cuál es la enfermedad entre dos o más enfermedades (en la presente CO y CE) con síntomas similares que padece el paciente mediante una comparación y contraste sistemático de los descubrimientos clínicos.
- 35
- La anomalía puede ser específicamente determinada mediante la genotipificación de al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones.
- 40
- En particular, la anomalía se determina mediante un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo.
- 45
- La anomalía puede ser específicamente determinada mediante la detección de la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos (por ejemplo, variaciones en el número de copias, CNV) de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones, o de regiones en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 y 20 (principalmente ganancias) y los cromosomas 4, 8, 11, 13, 14, 15, 17 y 22 (principalmente pérdidas). Las redistribuciones estructurales principalmente implican deleciones y translocaciones no equilibradas que implican a 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 10q, 11p, 11q y 12q.
- 50
- La anomalía puede determinarse específicamente detectando la metilación aberrante del ADN. La metilación aberrante del ADN, específicamente la hipermetilación del ADN, es la lesión molecular más habitual de las células

- del cáncer, por ejemplo, un cambio en la metilación del ADN en neoplasmas es el silenciamiento de los genes supresores de tumor por la hipermetilación del promotor de islas de CpG, que se dirige a genes tales como p16(INK4a), BRCA1, y hMLH1. También se han indicado acontecimientos epigenéticos en una región delecionada con frecuencia en el cromosoma 8p22 que influye en la expresión del candidato 3 a supresor de tumor 3 (TUSC3), un gen supresor de tumor putativo en el cáncer ovárico (Pils *et al.*, Cancer, 2012, 23 de octubre, doi: 10.1002/cncr.27850). Los resultados indican que la expresión de TUSC3 disminuye significativamente debido a la metilación del promotor en tumores ováricos malignos, comparado con controles benignos. El estado de metilación del promotor de TUSC3 tiene una influencia significativa e independiente sobre la supervivencia sin avance y global. Por tanto, la anomalía puede determinarse específicamente detectando la hipermetilación de TUSC3.
- 5
- 10 Además, la anomalía puede determinarse específicamente mediante un análisis al nivel celular empleando la inmunocitoquímica o la hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH).
- Según una realización específica, la anomalía se determina mediante al menos uno de:
- genotipificar al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGRF α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
 - realizar un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo.
 - detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos (por ejemplo, variaciones en el número de copias, CNV) de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGRF α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones, o de regiones en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 y 20 (principalmente ganancias) y los cromosomas 4, 8, 11, 13, 14, 15, 17 y 22 (principalmente pérdidas). Las reorganizaciones estructurales principalmente implican deleciones y translocaciones no equilibradas que implican a 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 10q, 11p, 11q y 12q,
 - detectar la metilación aberrante del ADN, y
 - realizar un análisis al nivel celular empleando inmunocitoquímica o hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), en particular de cualquiera de los productos de expresión polipeptídicos de los genes pertinentes, tales como los listados anteriormente.
- 20
- 25
- 30 Según un aspecto específico de la invención, se proporciona un kit para diagnosticar el adenocarcinoma en un sujeto de sexo femenino basándose en una anomalía en una muestra de células de dicho sujeto, tal como se emplea en un método según la invención, comprendiendo dicho kit:
- un catéter uterino diseñado para el enjuagado no invasivo de la cavidad uterina y para recolectar una muestra del enjuagado,
 - un medio para preparar una fracción de células epiteliales de dicha muestra, en el que el medio se selecciona de filtración, centrifugación, separación de células asociada a esferas magnéticas, separación de células por medios no magnéticos, manipulación de células basada en micromatrices de células, o FACS; y
 - reactivos para analizar dichas células para determinar una anomalía asociada con CO o CE, en el que los reactivos se seleccionan de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y sondas de ácidos nucleicos.
- 35
- 40 De modo específico, dicho catéter se diseña para su uso en NISR, en particular es como el empleado en la sonohisterografía o histerosonografía de contraste con disolución salina.
- El kit puede comprender específicamente reactivos adecuados para realizar dichos análisis, preferiblemente todos los reactivos necesarios proporcionados en la forma de kit convenientes para el manipulador, por ejemplo, los reactivos fundamentales que se emplean específicamente para realizar el análisis según la invención, tales como para:
- genotipificar al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGRF α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
 - realizar un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo,
 - detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos (por ejemplo, variaciones en el número de copias, CNV) de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGRF α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4,
- 45
- 50

RNASET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones, o de regiones en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 y 20 (principalmente ganancias) y los cromosomas 4, 8, 11, 13, 14, 15, 17 y 22 (principalmente pérdidas). Las redistribuciones estructurales principalmente implican deleciones y translocaciones no equilibradas que implican a 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 10q, 11p, 11q y 12q,

- detectar la metilación aberrante del ADN, y

- realizar un análisis al nivel celular empleando inmunocitoquímica o hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), en particular de cualquiera de los productos de expresión polipeptídicos de los genes pertinentes, tales como los listados anteriormente.

10 Según un aspecto específico, el kit según la invención puede utilizarse para seleccionar una población de sexo femenino en riesgo de padecer CO y CE, en particular incluye la selección de CO y/o CE.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método no invasivo para preparar una muestra para objetivos de diagnóstico *ex vivo* mediante el enjuagado de la cavidad uterina, y opcionalmente las trompas de Falopio de un sujeto, con una disolución salina normal fisiológicamente aceptada y extraer una muestra de células del enjuagado.

15 Descripción detallada de la invención

Los términos y expresiones específicos empleados a lo largo de la memoria descriptiva tienen el siguiente significado.

20 Tal como se emplea en la presente, una "anomalía" con respecto a analizar células epiteliales en la presente se refiere específicamente a una anomalía con respecto a la naturaleza y la cantidad de un biomarcador, en particular su secuencia (de nucleótidos o de aminoácidos) y su expresión, incluyendo las mutaciones, tales como polimorfismos en secuencias codificadoras y no codificadoras, o el nivel de expresión génica. También se refiere a una anomalía con respecto a uno cualquiera de heterocigosidad, cambios cromosómicos (por ejemplo, amplificaciones, deleciones, redistribuciones) o citoquímica.

25 Tal como se emplea en la presente, un "biomarcador" o "marcador" se refiere a una molécula que, con su presencia o expresión (diferencial), por sí solas o en combinación con otros parámetros, indica uno o más aspectos de una anomalía que se encuentra en células precancerosas o cancerosas. El término incluye en particular cualquier polinucleótido que tenga una mutación, por ejemplo, una expresión diferencial o cualquier otra alteración en el nivel de expresión o actividad que esté asociada con una enfermedad o un trastorno. Por ejemplo, el biomarcador puede ser expresado diferencialmente en células precancerosas o cancerosas al nivel de la transcripción o al nivel de la traducción. Así, un biomarcador puede ser cualquier molécula que sea un producto de la expresión de una molécula de ácido nucleico. La detección de un biomarcador, como indicador de uno o más aspectos de una anomalía, puede ser la detección de su expresión diferencial comparada con una referencia o control.

30 Los biomarcadores adecuados que pueden analizarse para su expresión para determinar una anomalía según la invención son de origen humano y están asociados con el adenocarcinoma, en particular con CO y/o CE, y son, por ejemplo, los listados en la tabla 1, que incluyen los números de registro de UniGene y los símbolos de los genes (nomenclatura HUGO).

Tabla 1 - Lista de biomarcadTores

Nombre	Símbolo de gen	Nombre aprobado	ID HGNC	Localización
AKT2	AKT2	homólogo 2 de oncogén vírico de timoma murino v-akt	392	19q13.1-q13.2
ARID1A	ARID1A	dominio 1A interactivo rico en AT (similar a SWI)	11110	1p36.1-p35
BRAF	BRAF	homólogo B1 de oncogén vírico de sarcoma murino v-raf	1097	7q34
BRCA1	BRCA1	cáncer de mama 1, aparición temprana	1100	17q21-q24
CDKN2A	CDKN2A	inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (melanoma, p16, inhibe CDK4)	1787	9p21
CSF1R	CSF1R	receptor 1 del factor estimulante de colonias	2433	5q32
CTNNB1	CTNNB1	catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88 kDa	2514	3p21
DICER	DICER1	dicer 1, ribonucleasa de tipo III	17098	14q32.2

ES 2 691 404 T3

Nombre	Símbolo de gen	Nombre aprobado	ID HGNC	Localización
ECGF1	TYMP	timidina fosforilasa	3148	22q13
EGFR	EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico	3236	7p12
ERBB2	ERBB2	homólogo 2 de oncogén vírico de leucemia eritroblástica v-erb-b2, homólogo de oncogén derivado de neuro/glioblastoma (aviar)	3430	17q11.2-q12
FGF3	FGF3	factor de crecimiento de fibroblastos 3	3681	11q13
GATA4	GATA4	proteína 4 de unión a GATA	4173	8p23.1-p22
KIT	KIT	homólogo de oncogén vírico de sarcoma felino v-kit Hardy-Zuckerman 4	6342	4q11-q12
KRAS	KRAS	homólogo de oncogén vírico de sarcoma de rata v-Ki-ras2 Kirsten	6407	12p12.1
MDM2	MDM2	homólogo de proteína de unión a p53 Mdm2 (ratón)	6973	12q13-q14
MYC	MYC	homólogo de oncogén vírico de mielocitomatosis v-myc (aviar)	7553	8q24
PDGFRA o PDGRF α	PDGFRA	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido alfa	8803	4q12
PIK3CA	PIK3CA	fosfoinositida-3-quinasa, catalítica, polipéptido alfa	8975	3q26.3
PPP2R1 A	PPP2R1A	proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora A, alfa	9302	19q13
PTEN	PTEN	homólogo de tensina y fosfatasa	9588	10q23
RB1	RB1	retinoblastoma 1	9884	13q14.2
RNASET 2	RNASET2	ribonucleasa T2	21686	6q27
SRC	SRC	homólogo de oncogén vírico de sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) v-src (aviar)	11283	20q12-q13
TP53	TP53	proteína tumoral p53	11998	17p13.1
VHL	VHL	supresor de tumor de von Hippel-Lindau	12687	3p25.3
BRIP1	BRIP1	proteína C-terminal helicasa 1 de interacción con BRCA1	20473	17q22.2
BRCA2	BRCA2	cáncer de mama 2, aparición temprana	1101	13q12-q13
PAX2	PAX2	caja apareada 2	8616	10q24.31
WT1	WT1	tumor de Wilms 1	12796	11p13
RUNX3	RUNX3	factor de transcripción 3 relacionado con Runt	10473	1p36
FHIT	FHIT	gen de la tríada de histidina frágil	3701	3p14.2

5 "Cáncer" y "canceroso" significa un trastorno fisiológico en mamíferos que generalmente se caracteriza por un crecimiento celular anómalo. Se incluye en esta definición los cánceres malignos, así como los tumores latentes o las micrometástasis. Los ejemplos de cánceres incluyen CO y/o CE, que en la presente siempre incluyen adenocarcinoma seroso, enfermedad de tipo II o lesiones precursoras. El cáncer generalmente se diferencia de los neoplasmas o tumores benignos, por ejemplo, mediante un diagnóstico diferencial.

10 Un "control" o "muestra control" significa una muestra biológica representativa u obtenida de un sujeto sano que no ha sido diagnosticado con un trastorno proliferativo celular. Un control o muestra control puede haber sido previamente establecida basándose en mediciones procedentes de sujetos sanos que no han sido diagnosticados con un trastorno proliferativo celular. Además, una muestra control puede ser definida según una edad, sexo o

etnicidad definidos u otros parámetros demográficos.

La "expresión" significa la detección de un producto que es expresado o producido por una molécula de ácido nucleico mediante métodos convencionales, cuyo producto se refiere, por ejemplo, a un ARN sin romper, un ARNm, un ARNm variante de corte y empalme, un polipéptido, un polipéptido modificado de modo postraduccional, un polipéptido variante de corte y empalme, etc., y productos fabricados específicamente empleando un producto de gen de ARN como molde, por ejemplo, ADNc del ARN. Los métodos de diagnóstico típicos que se centran en ácidos nucleicos incluyen las técnicas de amplificación, tales como PCR y RT-PCR (que incluyen las variantes cuantitativas), las técnicas de hibridación, tales como la hibridación *in situ*, las micromatrices, las transferencias y otros, y las técnicas de secuenciación de alta capacidad de procesamiento, tales como Next Generation Sequencing (Illumina, Roche Sequencer, Life Technologies SOLID™), secuenciación a tiempo real de una sola molécula (Pacific Biosciences), secuenciación de una sola molécula verdadera (Helicos), o los métodos de secuenciación que emplean tecnologías que no emiten luz sino otros métodos físicos para detectar la reacción de secuenciación o el producto de la secuenciación, tales como Ion Torrent (Life Technologies). Los métodos de diagnóstico típicos que se centran en proteínas o polipéptidos incluyen técnicas de unión, tales como ELISA, inmunohistoquímica, micromatrices y técnicas funcionales, tales como ensayos enzimáticos.

Se pretende detectar una "expresión diferencial" cuando se determina una anomalía en las células según la invención, generalmente con respecto a un gen cuya expresión es activada a un nivel mayor o menor en un sujeto que padece una enfermedad, de modo específico un cáncer, tal como CO o CE, con relación a su expresión en un sujeto normal o control. La expresión diferencial incluye diferencias cuantitativas, así como cualitativas, en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han sufrido diferentes acontecimientos de enfermedad o estadios de enfermedad. Para el objetivo de esta invención, se considera que una expresión de genes diferencial determina una anomalía cuando existe al menos una diferencia en aproximadamente dos veces, preferiblemente al menos aproximadamente cuatro veces, más preferiblemente al menos seis veces, lo más preferiblemente al menos aproximadamente diez veces entre la expresión de un gen concreto en sujetos normales y enfermos, o en diversos estadios de desarrollo de la enfermedad en un sujeto enfermo. Además, los modelos lineales o no lineales (como de regresión, de redes neuronales, de bosques aleatorios) formados por valores de expresión de más de un gen son indicativos del estado de enfermedad.

Los términos "diagnóstico" y "diagnosis" se refieren a identificar la presencia o el tipo de un trastorno patológico e incluyen identificar sujetos que están en riesgo de desarrollar una enfermedad específica o que padecen un trastorno. Los métodos de diagnóstico se diferencian en su sensibilidad y especificidad. Aunque un método de diagnóstico concreto puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de un trastorno, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude al diagnóstico.

Los términos "detección", "detectar", "determinar", "analizar" y similares se emplean de modo intercambiable en la presente para indicar cualquier forma de medición, y en la presente se emplean específicamente en el contexto de determinar anomalías, tales como biomarcadores de células y su expresión diferencial, que indican que las células son precancerosas o cancerosas.

Tal como se emplea en la presente, el término "mutación" se refiere a la alteración del genotipo o del fenotipo de una célula, por ejemplo, biomarcadores alterados, que incluyen alteraciones de los polinucleótidos, sus correspondientes productos génicos y productos de expresión, que incluyen ácidos nucleicos y polipéptidos o proteínas, por ejemplo, moléculas con una o más mutaciones puntuales o polimorfismos de un solo nucleótido ("single-nucleotide polymorphism", SNP), fragmentos, variantes, tales como variantes de corte y empalme o isoformas.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "no invasivo" se refiere a métodos que no son quirúrgicos, por ejemplo, que no penetran en el cuerpo, tal como mediante incisión o inyección, o que no invaden tejidos. En particular, se entiende que el lavado del útero interno y, opcionalmente, el área de las trompas es una técnica no invasiva de bajo nivel de estrés, que se emplea específicamente para tomar muestras según la presente invención.

Tal como se emplean en la presente, "células precancerosas" o "lesiones precursoras" se refieren a células de displasias y sus estadios precursores, así como células tumorales diseminadas.

"Referencia" significa una condición convencional o control para fines comparativos. Por ejemplo, una "secuencia de referencia" es una secuencia definida empleada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada, por ejemplo, un segmento de un ADNc de longitud completa o de una secuencia génica, o el ADNc completo o una secuencia génica completa.

Los términos "sujeto", "paciente" o la expresión "sexo femenino" en general se refieren a un ser humano, aunque los métodos de la invención no se limitan a seres humanos y pueden ser útiles en otros mamíferos.

Por tanto, la presente invención proporciona una nueva técnica de toma de muestras específica y un método para diagnosticar el adenocarcinoma o sus lesiones precursoras que comprende dicha técnica de toma de muestras. En particular, la invención proporciona métodos de diagnóstico y kits útiles para determinar anomalías en células originadas de un adenocarcinoma o sus lesiones precursoras, por ejemplo, identificar una expresión diferencial que

5 identifica que un sujeto padece o tiene propensión para desarrollar CO o CE. Estos ensayos se emplean específicamente para realizar un análisis molecular o medir una mutación o una alteración en una secuencia de nucleótidos, su actividad o su nivel de expresión, que incluyen matrices y patrones de secuencias de nucleótidos, proporcionados de modo adecuado en una disposición ordenada de elementos de la matriz. Pueden emplearse específicamente plataformas basadas en micromatrices o tecnologías de secuenciación de alta capacidad de procesamiento, por ejemplo, matrices de SNP.

El kit o los dispositivos según las realizaciones de la presente invención incluyen específicamente un medio y, en particular, uno o más dispositivos para tomar muestras y preparar una fracción de la muestra que incluya las células epiteliales, por ejemplo, enriquecida en células epiteliales, finalmente en forma concentrada.

10 En algunas realizaciones, el kit según la invención contiene un dispositivo capaz de enjuagar la cavidad uterina y tomar muestras del enjuagado. En algunas otras realizaciones, el kit según la invención contiene una combinación de dispositivos para dichos objetivos. En otras realizaciones, el kit incluye instrucciones para tomar una muestra del sujeto y para utilizar el kit para el diagnóstico de la enfermedad precancerosa o cancerosa.

15 De modo específico, las muestras se toman después del enjuagado de la cavidad uterina de una manera adecuada. Una muestra puede comprender una cantidad específica del enjuagado que se toma del efluente o *in situ* cuando se enjuaga la cavidad corporal. Las cantidades adecuadas de la muestra de enjuagado varían, por ejemplo, de 0,5-20 ml, preferiblemente 1-15 ml, más preferiblemente 2-10 ml, tal como aproximadamente 5 ml (concretamente, +/- 1 ml). Los medios para obtener una muestra de enjuagado emplean, por ejemplo, jeringas u otros recipientes conocidos por los expertos en la técnica.

20 Puede prepararse una fracción de la muestra que comprende células epiteliales, tales como una fracción de células separada. De modo adecuado, puede producirse un sedimento de células tras centrifugar la muestra, que proporciona la concentración de densidad celular y la separación del medio. Los medios adecuados son, por ejemplo filtración, centrifugación (con o sin uno o más medios de gradiente de densidad), separación de células asociada a esferas magnéticas (asistida por flujo), separación de células por medios no magnéticos (por ejemplo, PluriSelect), manipulación de células basada en micromatrices de células (por ejemplo, DEPArray, Silicon Biosystems), FACS, o tecnologías equivalentes.

25 Por ejemplo, los dispositivos que integran diversas funciones de laboratorio en un chip ("lab-on-a-chip") microfluídicos proporcionan oportunidades exclusivas para clasificar células y para la detección de células poco frecuentes. La tecnología microfluídica se ha empleado con éxito para la citometría de flujo microfluídica, la separación continua basada en el tamaño y la separación cromatográfica.

30 La preparación de la muestra puede emplear un tampón convencional u otros vehículos, tales como los adecuados para analizar las células, en particular para realizar un análisis molecular de la información genética proporcionada por las células, o para almacenar de otro modo la información genética para el ensayo en un momento posterior. Los vehículos adecuados son, por ejemplo, formaldehído, parafina, RNAlater (QIAGEN), disolución con DMSO del 2,5% al 15%.

En una realización, el kit incluye reactivos que contienen al menos un agente que se une a un biomarcador, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o polinucleotídica cuya secuencia o expresión está alterada en CO o CE, de modo específico en el cáncer seroso o en el cáncer de tipo II.

En realizaciones específicas, el kit comprende un recipiente estéril que contiene el agente de unión.

40 Los biomarcadores útiles para analizar células son generalmente los biomarcadores presentes en células epiteliales y que son indicativos de CO o CE, en particular el carcinoma seroso o de tipo II de las enfermedades, o cualquiera de las respectivas lesiones precursoras, tales como los que incluyen las células precancerosas.

En la técnica se conocen los biomarcadores adecuados y estos incluyen, pero no se limitan a los listados en la tabla 1.

45 Pueden identificarse otros biomarcadores empleando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden identificarse biomarcadores observado la expresión diferencial entre células normales y cancerosas o precancerosas al nivel del ARNm, mediante métodos tales como las micromatrices basadas en ácidos nucleicos, las tecnologías de secuenciación de alta capacidad de procesamiento, los métodos basados en PCR cuantitativa y los métodos de selección diferencial. También pueden identificarse biomarcadores observado la expresión diferencial entre células normales y cancerosas o precancerosas al nivel de proteínas, mediante métodos tales como los métodos proteómicos basados en la espectrometría de masa y micromatrices o chips de proteínas.

50 Para el diagnóstico basado en la expresión diferencial de los biomarcadores y, en particular, los niveles relativos de ácidos nucleicos, un sujeto con una anomalía, tal como una enfermedad de CO o CE, mostrará una alteración, por ejemplo, un aumento del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más en la cantidad de las moléculas expresadas o la presencia o la ausencia de una mutación, que incluye específicamente una mutación en la secuencia, variantes o polimorfismos, tales como SNP, comparado con un control o referencia.

55

En ciertas realizaciones, el número de copias de un ácido nucleico aumenta en al menos dos veces. En algunas realizaciones, el número de copias de un ácido nucleico se determina mediante ensayos de hibridación y/o ensayos basados en la amplificación (por ejemplo, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), hibridación genómica comparativa ("comparative genomic hybridization", CGH), o CGH basada en micromatrices).

- 5 En algunas realizaciones, la anomalía se determina detectando una LOH de un biomarcador o de una región cromosómica específica. La expresión "pérdida de heterocigosidad" o "LOH" ("loss of heterozygosity") indica que una región de un genoma de ensayo ha perdido heterocigosidad con relación a un genoma de origen o a un genoma de referencia diploide, cuya LOH puede ser indicativa de una enfermedad proliferativa.

- 10 Para algunas realizaciones, las células preparadas o separadas de la muestra o las células cultivadas derivadas de la muestra pueden emplearse para determinar anomalías celulares.

- 15 En algunas realizaciones, las células aisladas empleando los métodos y dispositivos de la presente invención pueden lisarse y puede medirse una o más propiedades de las células o sus porciones. Los ejemplos no limitantes de propiedades biológicas que pueden medirse en células lisadas incluyen la expresión del ARNm, la expresión de proteínas y la cuantificación del ADN. Además, en algunas realizaciones, el ADN celular puede secuenciarse o pueden identificarse ciertas características de la secuencia (por ejemplo, polimorfismos y anomalías cromosómicas) empleando técnicas convencionales, por ejemplo, FISH o PCR. En algunas realizaciones de la presente invención, la información que puede obtenerse de las células aisladas incluye la identificación o enumeración de secuencias de ADN genómico, ADNc o ARNm concretas.

- 20 En algunas realizaciones, las células aisladas empleando los métodos y dispositivos de la presente invención se someten a un análisis inmunocitoquímico mediante citometría de flujo u otras plataformas analíticas.

En algunas realizaciones específicas, los ensayos celulares pueden emplear específicamente la determinación visual de anomalías morfológicas u otras técnicas empleadas generalmente para detectar biomarcadores, en particular polipéptidos, por ejemplo, en un inmunoensayo, un ELISA, un análisis de inmunocitoquímica, de inmunohistoquímica, de citometría de flujo, radioinmunoensayos, transferencias Western, etc.

- 25 Los métodos inmunológicos son particularmente adecuados para detectar la expresión de los marcadores según la presente invención. Por tanto, se emplean agentes de unión, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que son específicos para cada marcador para detectar la expresión. Los marcadores pueden detectarse mediante marcaje directo o indirecto de los agentes de unión, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de haptenos, tales como biotina, o una enzima, tal como peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina.
- 30

En algunas realizaciones, el biomarcador determinado para el objetivo de la invención es cualquiera que los expertos en la técnica sepan que se expresa específicamente en células a ciertos niveles de malignidad. Por ejemplo, puede determinarse cualquier subgrupo de marcadores particularmente pertinentes para CO/CE o lesiones precursoras.

- 35 En algunas realizaciones, el método según la invención comprende un análisis multiparamétrico de células en una muestra, en el que estos múltiples parámetros comprenden preferiblemente al menos TP53.

- 40 Aunque los marcadores individuales son útiles como marcadores de diagnóstico, en algunos casos una combinación de marcadores proporciona un valor predictivo mayor que los marcadores individuales por sí solos. La detección de una pluralidad de marcadores en una muestra puede aumentar el porcentaje de diagnósticos positivos verdaderos y negativos verdaderos y disminuir el porcentaje de diagnósticos de falsos positivos o falsos negativos. Así, los métodos preferidos de la presente invención comprenden la medición de más de un marcador.

El análisis se realiza específicamente empleando técnicas convencionales (por ejemplo, temperatura, pH, concentración de proteínas y fuerza iónica) conocidas por los expertos en la técnica.

- 45 Generalmente, una muestra se pone en contacto con uno o más agentes de sonda que reconocen biomarcadores expresados diferencialmente sobre células precancerosas o cancerosas. Los agentes de sonda se marcan antes o después de ponerse en contacto con la muestra. La muestra teñida después se analiza en un instrumento de detección, en donde se toman mediciones del marcador, tales como las intensidades de fluorescencia y la dispersión de la luz, de las células examinadas. Mediante el análisis de uno o más parámetros puede evaluarse el trastorno de las células examinadas, por ejemplo, cuando se comparan con un control o referencia, y clasificarse como normales,
- 50 precancerosas o cancerosas, y se puede determinar si la muestra es negativa o positiva para una o más anomalías celulares o para adenocarcinomas, tales como CO o CE.

- 55 Para algunas aplicaciones se emplean sondas de moléculas de ácidos nucleicos para determinar los biomarcadores en una muestra. Por ejemplo, el ARNm puede aislarse de dicha muestra según métodos convencionales, y puede producirse ADNc y emplearse como molde para fabricar un ARN complementario adecuado para la hibridación con una sonda adecuada mediante métodos conocidos en la técnica.

Las sondas pueden incluir ácidos nucleicos, que se acaban hibridando con la secuencia del biomarcador para determinar o excluir una mutación específica en dicha secuencia. Las condiciones de hibridación y de incubación habitualmente se ajustan de modo que la hibridación se produzca con apareamientos complementarios precisos o con diversos grados de menos complementariedad, dependiendo del grado de rigurosidad empleado. Las sondas unidas específicamente pueden detectarse, por ejemplo, empleando un marcador, tal como un marcador para detectar la fluorescencia, o cualquier otro método detectable adecuado conocido por los expertos en la técnica.

Como método de análisis molecular basado en la amplificación, puede emplearse específicamente un ensayo basado en la PCR. Por ejemplo, puede usarse un ensayo basado en TaqMan para cuantificar polinucleótidos. Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a reacción en cadena de ligasa, amplificación de la transcripción, replicación de secuencias autónomas, PCR de puntos, y PCR de adaptador conector.

La invención proporciona específicamente métodos y kits para diagnosticar y, en último término, controlar el CO o CE, por ejemplo, para detectar la recurrencia de una enfermedad, para realizar el diagnóstico diferencial en sujetos que padecen un tumor, o para la estadificación de una enfermedad, que incluye el estadio temprano, pero también el estadio tardío y la enfermedad metastásica.

La presente invención se refiere específicamente a métodos y kits para seleccionar sujetos empleando una toma de muestras mediante el método no invasivo según la invención, por ejemplo, mediante el uso del kit según la invención, para proporcionar información que apoye el diagnóstico del cáncer. Puede seleccionarse específicamente una población de sujetos que tenga un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad proliferativa.

La detección de la amplificación, la sobreexpresión o la superproducción, por ejemplo, de un gen de biomarcador o un producto de la expresión también puede emplearse para proporcionar información de pronóstico o para guiar un tratamiento terapéutico. Estos ensayos de pronóstico o predictivos pueden emplearse para determinar un tratamiento temprano de un sujeto antes de la aparición de los síntomas del cáncer.

Los métodos de diagnóstico descritos en la presente pueden emplearse de modo individual o en combinación con cualquier otro método de diagnóstico descrito en la presente para lograr un diagnóstico más preciso de la presencia de un adenocarcinoma o sus lesiones precursoras. Los ejemplos de otros métodos para diagnosticar dichos trastornos incluyen, por ejemplo, estudiar la historia de salud del sujeto, la tinción inmunohistoquímica de tejidos, barridos con tomografía computerizada (CT), o cultivos.

La anterior descripción se entenderá mejor remitiéndose a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo ejemplos de métodos de la práctica de una o más realizaciones de la presente invención y no deben considerarse limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

1. Histerosonografía con disolución salina y toma de muestras

Se realizó una histerosonografía con disolución salina según Kroon *et al.* (2003, BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 110, 938-947). Durante la histerosonografía de contraste con disolución salina, se introducen lentamente con jeringa 10 ml de disolución salina normal en la cavidad uterina y las trompas de Falopio. Se extraen 5 ml succionando la disolución salina de nuevo hacia la jeringa y se emplea como disolución de toma de muestra para la posterior preparación de las células y el análisis molecular.

No se requiere analgesia ni la anestesia habitual para un enjuagado con disolución salina no invasivo ("non-invasive saline rinse", NISR). La inserción del catéter intrauterino a menudo es indolora. Una minoría de mujeres notarán ciertas sensaciones de contracción muscular que pueden evitarse recetando un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, tal como ácido mefenámico (500 mg), 30 minutos antes del examen. Tras haber descartado el embarazo, las pacientes deben dar su consentimiento al procedimiento. Se aseguran las condiciones estériles y la paciente se coloca en posición de litotomía y se coloca un espéculo en la vagina.

Después se emplea una disolución de povidona yodo o gluconato de clorhexidina para limpiar el orificio cervical, y se inserta un catéter de sonohisterografía francés 5 o 7 a través del canal cervical. Antes de la inserción, el catéter debe enjuagarse con disolución salina normal para que salga el aire. Después de la inserción, el globo en la punta del catéter se infla con 1-2 ml de disolución salina para ayudar a mantenerlo en su sitio. Debido a que el catéter tiene una longitud de aproximadamente 25 cm, se extenderá más allá de la entrada vaginal incluso después de retirar cuidadosamente el espéculo, que no siempre es necesario. El espéculo solo debe retirarse si se realiza una histerosonografía con disolución salina además del NISR.

Las dificultades que pudiesen producirse para insertar el catéter pueden solucionarse cambiando la posición del espéculo, dilatando el canal cervical o mediante el uso de un alambre de guía. No es imprescindible el uso de un catéter de globo, porque la distensión adecuada y el enjuagado de la cavidad uterina y de las trompas de Falopio también pueden lograrse con otro tipo de catéteres, aunque con algo más de dificultad.

En circunstancias en las que no es posible introducir el catéter en la cavidad uterina, a menudo sigue siendo posible

realizar un enjuagado colocando la punta en el canal cervical lo más lejos posible y después inflando el globo. Si se va a realizar una histerosonografía con disolución salina en paralelo al NISR, se inserta la sonda de ultrasonidos vaginal. Se conecta al catéter una jeringa de 10 ml rellena con disolución salina estéril. La cantidad de fluido instilado varía, dependiendo de la comodidad de la paciente (pueden producirse contracciones musculares), pero habitualmente 10 ml de disolución salina no son problemáticos. Mediante la extracción lenta del émbolo, la disolución salina se succiona de nuevo hacia la jeringa, que representa el enjuagado. Por último, el globo se desinfla y el catéter se extrae o se desliza pasivamente hacia afuera del útero.

2. Preparación de las células

Las células de la disolución de toma de muestras se recogen mediante filtración, centrifugación (con o sin uno o más medios de gradiente de densidad), separación de células asociada a esferas magnéticas (asistida por flujo), separación de células por medios no magnéticos (por ejemplo, PluriSelect), manipulación de células basada en micromatrices de células (por ejemplo, DEPArray, Silicon Biosystems), FACS, o tecnologías equivalentes. Se preparan las moléculas de ADN, proteínas y ARN empleando tecnologías conocidas adecuadas para las posteriores tecnologías de análisis. Para los análisis de inmunohistoquímica o FISH, las células pueden fijarse (por ejemplo, con formaldehído) e introducirse en un medio adecuado, tal como parafina.

3. Análisis molecular

El análisis de las mutaciones, el análisis de variación del número de copias (CNV, "copy number variation"), el análisis de variantes de un solo nucleótido (SNV, "single nucleotide variants"), o el análisis del transcriptoma completo (expresión) se realizan utilizando tecnologías de secuenciación de alta capacidad de procesamiento. Brevemente, para el análisis basado en el ADN (mutaciones, CNV, SNV) se emplea el ADN total (secuenciación del ADN genómico completo) o preenriquecido para exones (secuenciación de exones) o genes diana o regiones cromosómicas específicas (secuenciación de ADN diana, por ejemplo, kit Fluidigm's Access Array BRCA1, BRCA2 and TP53 Kit), los ADN se rompen y se preparan bancos según la marca utilizada de tecnología de secuenciación de alta capacidad de procesamiento y se secuencian hasta una profundidad apropiada. Después del control de calidad, de retirar las secuencias de adaptador, los duplicados de la PCR y las lecturas de baja calidad y, por último, después de recortar las bases de baja calidad 3', las lecturas se cartografían en el genoma (es decir, en la secuencia del genoma humano más recientemente ensamblada, por ejemplo, hg19 o GRCh37) empleando programas de alineamiento competentes para indel, tales como Stampy, Novoalign, o BWA. Se realiza el llamamiento y la interpretación de SNP/SNV con el kit de herramientas de análisis del genoma ("genome analysis toolkit", GATK) fundamentalmente según la publicación de DePristo *et al.* (Nature Genetics, volumen: 43, pp.: 491-498 (2011)) e incluyendo realineamientos locales alrededor de los índices.

Para la detección de CNV, los datos de secuenciación de alta capacidad de procesamiento para dianas (regiones favorecidas, véase a continuación) o para enriquecimiento de exones se analizan mediante BreakDancer (Nat. Methods., 2009, septiembre, 6(9):6776-81, Epub, 9 de agosto de 2009) y/o secuenciación de CNV (BMC Bioinformatics, 2009, 6 de marzo, 10:80.). Los cambios numéricos predominantes son ganancias de los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 9, 12 y 20, y pérdidas de los cromosomas 4, 8, 11, 13, 14, 15, 17 y 22. Las redistribuciones estructurales principalmente implican deleciones y translocaciones no equilibradas que implican a 1p, 1q, 3p, 3q, 6q, 7p, 10q, 11p, 11q y 12q.

Se realiza el análisis de expresión del genoma completa mediante secuenciación de ARN de ARN enriquecido en poli A (enriquecimiento basado en oligo-dT) o mermado en ARNr (RiboMinus (Invitrogen), Ribo-Zero (Epicentre)). El ARN o ADNc se corta de modo enzimático, químico o físico (ultrasonidos, nebulización) y se producen bancos según la marca utilizada de tecnología de secuenciación de alta capacidad de procesamiento y se secuencian hasta una profundidad apropiada. Para los múltiplex se añaden índices a los adaptadores. Las lecturas se cartografían con un programa de alineamiento compatible con la secuenciación de ARN (por ejemplo, RNA-Seq Unified Mapper (RUM), STAR, TopHat). Después de contar las lecturas alineadas (Cufflinks, recuento de HTseq), se determina la expresión génica diferencial o absoluta (Cufflinks, Cuffdiff, DESeq, DESeq, SAMseq, edgeR, NOISeq).

Empleando métodos estadísticos para la construcción de modelos de múltiples variables (Lasso, red elástica, PCA supervisada, redes neuronales, máquinas de vectores de soporte, bosques aleatorios) se determinan los genes expresado de modo discriminativo, las mutaciones/SNP, SNV, CNV y las aberraciones cromosómicas y se validan mediante métodos que constituyen criterios de referencia (por ejemplo, basados en qPCR o PCR digital, pirosecuenciación).

4. Ejemplos de procesos para determinar un biomarcador indicativo de CO y/o CE, o una de sus malignidades precursoras, en una muestra de un paciente

Toma de muestras

La paciente se coloca en la silla ginecológica. El examen con ultrasonidos ofrece información acerca de la posición exacta del útero y la cervix. Se inserta un espéculo ginecológico en la vagina y se visualiza la cervix. La cervix se limpia con una loción antiséptica. Empleando un fórceps con punta se fija la cervix en la posición de las 12 h en punto. Se inserta un catéter de tres vías en el canal cervical y el globo se infla con disolución salina normal. El canal

ya está sellado. Si el canal cervical es demasiado estrecho para que pase el catéter, se dilata con dilatadores Hegar después de la aplicación de un pulverizado de xilocaína.

5 Se conectaron dos jeringas de 10 ml (una contiene 10 ml de disolución salina normal) a los dos canales. Con la ayuda de una silla ginecológica, el paciente se coloca en posición erguida (posición anti-Trendellenbur). Mediante el desplazamiento del émbolo de la jeringa que contiene la disolución salina normal, el fluido lentamente se introduce en la cavidad uterina y las trompas. Simultáneamente, el émbolo de la jeringa vacía se extrae lentamente, succionando el fluido de la cavidad uterina y las trompas. Cuando un tubo lentamente se vacía, el otro lentamente se llena. Después de terminar el lavado se tapa la jeringa llena y se envía al laboratorio.

10 El aspirado se centrifuga durante 10 minutos a 15000 rpm. Se retira el sobrenadante y el sedimento celular remanente se congela a -80 °C.

Después se aísla el ADN del sedimento celular resuspendido en 250 µl. Para el aislamiento del ADN se emplea el kit QIAamp MinElute Media Kit (QIAgen) según el protocolo del fabricante.

Determinación de TP53 como ejemplo de marcador tumoral

15 Para la detección de células tumorales, se aprovecha el hecho de que en estadios muy tempranos del avance del cáncer de ovario, es probable que en la mayoría de las pacientes se haya producido la mutación del gen TP53. La mutación se detecta, por ejemplo, mediante PCR digital, empleando el sistema de PCR QX100™ Droplet Digital™ de Bio-RAD. El tipo de mutación de TP53 presente en el tejido del tumor primario se verifica en el ADN aislado del lavado. Así, se diseña un ensayo dirigido a esta mutación de TP53 específica. Este emplea un cebador directo y un cebador inverso, que se unen cadena arriba y cadena abajo de la región diana. Se produce un producto de la PCR de aproximadamente 100 pb. Se usan sondas que son específicas para la mutación de TP53 concreta, respectivamente de tipo salvaje. Estas sondas deben tener una temperatura de fusión, Tf, 5-10 °C más alta que la Tf del cebador. Las sondas consisten en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' para la sonda específica de mutación FAM (6-carboxifluoresceína), para VIC de tipo salvaje, y un extintor en el extremo 3' de MGB ("minor groove binder", grupo de unión al surco menor). Se mezclan los componentes de la PCR (mezcla maestra, cebadores, sondas, ADN) y se emplean 20 µl de esta mezcla para la generación de gotas empleando el generador de gotas QX100™ de Bio-RAD, según el protocolo del fabricante. Con esto, el ensayo de PCR se reparte en 20.000 gotas de agua en aceite. La emulsión después se traslada a una placa de PCR de 96 pocillos, se sella con calor y se realiza la PCR. La temperatura de asociación se adapta a una temperatura previamente optimizada, dependiendo del tipo de mutación de TP53 que se va a detectar. Mediante el lector de gotas QX100™ (Bio-RAD), cada gota se cuenta como negativa o positiva para el ADN diana específico y, si está presente una célula que porta una mutación en TP53 en el lavado, se detecta una señal fluorescente.

La expresión del gen TP53, de modo específico la mutación y sobreexpresión de p53, es indicativa de una enfermedad, de modo específico CO y/o CE, o una de sus malignidades precursoras.

35 Según el ejemplo, se determina la siguiente mutación de p53 empleando los cebadores y las sondas descritos en la presente:

Mutación en el codón 248 (g.14070G>A, p.Arg248Gln)

Cebador de PCR directo: tgtaacagttcctgcatgggc (SEQ ID NO:1)

Cebador de PCR inverso: acagcaggccagtggtgca (SEQ ID NO:2)

Sonda 1: 5'-FAM-catgaaccagaggcc-MGB-3' (SEQ ID NO:3)

40 Sonda 2: 5'-VIC-catgaaccggaggcc-MGB-3'(SEQ ID NO:4)

Gen TP53: UniProtKB: P04637

45 Este gen codifica la proteína tumoral p53, que actúa como supresor de tumor en muchos tipos de tumores, induce la detención del crecimiento o la apoptosis dependiendo de las circunstancias fisiológicas y del tipo de célula. Está implicado en la regulación del ciclo celular como transactivador que actúa para regular negativamente la división celular por medio del control de un conjunto de genes necesarios para este proceso. Uno de los genes activados es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina. La inducción de la apoptosis parecer ser mediada por la estimulación de BAX y la expresión del antígeno FAS, o por la represión de la expresión de Bcl-2. Está implicado en el entrecruzamiento señalado por mella. Evita la actividad CDK7 quinasa cuando está asociado al complejo CAK en respuesta a daños en el ADN, deteniendo con ello el avance del ciclo celular. La isoforma 2 potencia la actividad de transactivación de la isoforma 1 de algunos, pero no todos los promotores inducibles por TP53. La isoforma 4 suprime la actividad de transactivación y dificulta la supresión del crecimiento mediada por la isoforma 1. La isoforma 7 inhibe la apoptosis mediada por la isoforma 1.

Como alternativa, puede emplearse un método de secuenciación profunda dirigida de alteraciones genéticas, por ejemplo, las que se sabe que aparecen con frecuencia en el cáncer ovárico, endometrial y de trompas de Falopio.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SPEISER, Paul
 <120> Diagnóstico no invasivo del cáncer
 5 <130> MU003P
 <160> 4
 10 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 1
 tgtaacagtt cctgcatggg c 21
 <210> 2
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 2
 35 acagcaggcc agtgtgca 18
 <210> 3
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Sonda
 <400> 3
 45 catgaaccag aggcc 15
 <210> 4
 <211> 15
 50 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda
 55 <400> 4
 catgaaccgg aggcc 15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método no invasivo para el diagnóstico *ex vivo* del cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (EC), o sus lesiones precursoras, en un sujeto de sexo femenino mediante el análisis de las células de dicho sujeto, que comprende:
- 5 - preparar células epiteliales de una muestra de dicho sujeto obtenida a partir de un enjuagado de la cavidad uterina y las trompas de Falopio, y
- realizar el análisis de dichas células para determinar mutaciones, alteraciones en los niveles de expresión o en la metilación de promotores y/o cambios cromosómicos de un biomarcador, en el que dichas mutaciones, alteraciones o cambios están asociados con el cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (CE) o sus lesiones precursoras, y
- 10 que se determinan mediante al menos uno de:
- genotipificar al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 15 - realizar un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 20 - detectar la hipermetilación del promotor de un gen seleccionado del grupo de p16(INK4a), BRCA1, hMLH1 y TUSC3 o sus combinaciones, o
- 25 - realizar un análisis al nivel celular empleando inmunocitoquímica o hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) sobre un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones.
- 30 2.- Un método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra se obtiene mediante un enjuagado no invasivo con disolución salina normal (NISR).
- 3.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichas células se separan de dicha muestra y se extrae el ácido nucleico.
- 35 4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el análisis es un análisis molecular que emplea un método basado en la amplificación o un método de secuenciación para determinar la secuencia de un ácido nucleico.
- 5.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la anomalía es indicativa de CO o CE, o una de sus malignidades precursoras, tales como el carcinoma intraepitelial de las trompas de Falopio o del revestimiento endometrial.
- 40 6.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para el diagnóstico del CO o CE de estadio temprano.
- 7.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el diagnóstico diferencial del CO o CE en sujetos con sospecha de padecer CO y CE.
- 8.- Un kit para diagnosticar el cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (EC), o sus lesiones precursoras, en un sujeto de sexo femenino basándose en una anomalía relacionada con la genética asociada con el cáncer ovárico (CO) o el cáncer endometrial (EC) en una muestra de células de dicho sujeto, que comprende:
- 45 - un catéter uterino diseñado para el enjuagado no invasivo de la cavidad uterina y las trompas de Falopio y para recolectar una muestra del enjuagado,
- un medio para preparar una fracción de células epiteliales de dicha muestra, y
- reactivos para analizar dichas células para determinar una anomalía asociada con CO o CE, en el que dichos son
- 50 para:

- genotipificar al menos una mutación de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 5 - realizar un perfil de expresión génica empleando un análisis cualitativo y/o cuantitativo de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 10 - detectar la pérdida de heterocigosidad (LOH) u otros cambios cromosómicos (por ejemplo, variaciones en el número de copias, CNV) de un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones,
- 15 - detectar la hipermetilación del promotor de un gen seleccionado del grupo de p16(INK4a), BRCA1, hMLH1 y TUSC3 o sus combinaciones, o
- 20 - realizar un análisis al nivel celular empleando inmunocitoquímica o hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) sobre un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en TP53, EGFR, PDGFR α , KIT, KRAS, BRAF, PIK3CA, PTEN, ARID1A, PPP2R1A, RB1, VHL, DICER, β -catenina (CTNNB1), CDKN2A, GATA4, RNASSET2, BRCA1, BRCA2, BRIP1, PAX2, WT1, MYC, ERBB2, CSF1R, ECGF1, SRC, AKT2, RUNX3, FHIT, FGF3 y MDM2, o sus combinaciones, y en el que:
- el medio se selecciona de filtración, centrifugación, separación de células asociada a esferas magnéticas, separación de células por medios no magnéticos, manipulación de células basada en micromatrices de células, o FACS;
- y los reactivos se seleccionan de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y sondas de ácidos nucleicos.
- 25 9.- Un kit según la reivindicación 8, en el que dicho catéter se diseña para su uso en NISR.
- 10.- El uso de un kit según la reivindicación 8 o 9 para seleccionar una población de sexo femenino en riesgo de padecer CO o CE.