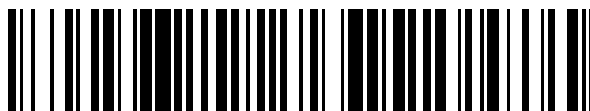


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 710**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2014** **PCT/EP2014/074892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15075027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2014** **E 14802846 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 3071708**

54 Título: **Métodos para la vigilancia, el diagnóstico y la exploración de cáncer de vejiga (vesical)**

30 Prioridad:

**19.11.2013 EP 13306580**

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

**12.11.2019**

73 Titular/es:

**ONCODIAG (100.0%)  
9 rue de Pacy  
27930 Miserey, FR**

72 Inventor/es:

**ROPERCH, JEAN-PIERRE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 730 710 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

Métodos para la vigilancia, el diagnóstico y la exploración de cáncer de vejiga (vesical)

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para el pronóstico, diagnóstico y exploración de cáncer de vejiga. La invención es muy útil para la vigilancia de recidivas y el seguimiento del paciente que padece o que ha padecido cáncer de vejiga.

10

**Estado de la técnica**

El cáncer de vejiga ocupa el quinto lugar en cuanto al diagnóstico de cáncer más común a nivel mundial, con más de 330 000 casos nuevos cada año y más de 130 000 muertes al año, con una relación hombre: mujer estimada de 3,0:1,0. El cáncer de vejiga es una enfermedad de personas mayores con más del 90 % de los diagnósticos en pacientes mayores de 55 años; aunque poco común, el cáncer de vejiga puede aparecer en adultos jóvenes e incluso en niños. En cualquier momento, 2,7 millones de personas tienen antecedentes de cáncer de vejiga urinaria. De los recientes casos de cáncer de vejiga diagnosticados, aproximadamente el 70 %-80 % se presentará en un estadio temprano, pero el 70 % de estos serán recidivantes y el 10 %-30 % progresarán a enfermedad avanzada. Para la mayoría de los pacientes que presentan enfermedad invasiva no muscular en estadio temprano (denominada "superficial"), la atención médica generalmente incluye la resección endoscópica, terapias intravesicales, y cistoscopia de vigilancia. En conjunto, este enfoque apunta a minimizar los riesgos de recidiva y progresión. Por el contrario, para aquellos pacientes con enfermedad avanzada (invasiva muscular), las estrategias suelen ser multidisciplinarias y se dirigen tanto a la enfermedad local (cistectomía radical, radioterapia) como a la sistémica (quimioterapia). En las últimas décadas, la incidencia general del cáncer de vejiga parece estar aumentando y esto puede deberse a los efectos latentes del abuso del tabaco y a los carcinógenos industriales.

En el caso del cáncer de vejiga, el desarrollo de marcadores tumorales vesicales precisos y no invasivos, podría ser importante en la exploración, diagnóstico inicial, vigilancia de recidiva, detección de la progresión temprana y predicción del pronóstico, sin aumentar la frecuencia de procedimientos diagnósticos actuales invasivos y relativamente costosos. Un programa de exploración de vejiga debería ser factible además de promover la detección temprana. Sin embargo, debido a la baja prevalencia de cáncer de vejiga en la población general (0,001 %) y en personas mayores de 50 años (de 0,67 % a 1,13 %), la exploración del cáncer de vejiga en toda la población aumentaría la posibilidad de demasiados resultados falsos positivos y no sería rentable. La exploración del cáncer de vejiga puede ser rentable entre las personas que tienen un mayor riesgo de padecer este cáncer (fumadores, exposición laboral a aminas aromáticas, esquistosomiasis). El riesgo de cáncer de vejiga es aún mayor cuando fumar se combina con otros carcinógenos o polimorfismos genéticos conocidos de la vejiga.

El cáncer de vejiga se puede diagnosticar casualmente o por síntomas. El principal síntoma del cáncer de vejiga es la hematuria. La citología de orina no es una prueba de laboratorio; es una interpretación de un patólogo de las características morfológicas de las células uroteliales. Las muestras de orina no siempre contienen una muestra representativa de la vejiga y puede que no contengan células tumorales, incluso cuando existe un tumor. La sensibilidad y especificidad de la citología de orina es baja para detectar tumores de grado bajo. El diagnóstico clínico del cáncer de vejiga generalmente se realiza mediante cistoscopia rígida o flexible. Se considera que la cistoscopia es el método de referencia para el diagnóstico de cáncer de vejiga y ofrece la capacidad de encontrar y extirpar lesiones pequeñas, pero se asocia con un coste elevado, con molestias importantes para el paciente y con sensibilidad variable.

Debido a la frecuencia de recidiva, el tratamiento de referencia para la vigilancia del cáncer de vejiga consiste en realizar cistoscopias periódicas después de la resección del tumor. La exploración de hematuria puede detectar no solo el cáncer de vejiga, aunque también pueden detectarse precozmente otras neoplasias urológicas y enfermedades benignas (hiperplasia prostática benigna) que requieren atención médica, y muchas otras afecciones que producen sangrado en el tracto urinario. La hematuria asociada con el cáncer de vejiga también es independiente del grado del tumor. Actualmente, no se pueden recomendar pruebas de marcadores tumorales para su uso en el diagnóstico y atención clínica médica del cáncer de vejiga con una eficacia aceptable. Los pocos métodos disponibles determinan el pronóstico del cáncer de vejiga y seleccionan a los pacientes para la terapia adecuada según parámetros tales como el tamaño del tumor, el grado del tumor, la edad del paciente.

Sin embargo, la precisión predictiva de esas estrategias de diagnóstico/estadificación sigue siendo limitada, ya que pueden no reflejar la complejidad de los eventos moleculares que impulsan el inicio y la progresión del cáncer de vejiga.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad no satisfecha de un método para diagnosticar con precisión el cáncer de vejiga que pueda diferenciar tumores asociados con buen pronóstico, incluida una baja probabilidad de metástasis, progresión tardía de la enfermedad, disminución de la recidiva de la enfermedad o aumento de la supervivencia del paciente, de los otros.

Utilizando dicho método, el profesional sanitario podría predecir con precisión el pronóstico del paciente y podría dirigirse de manera eficaz a las personas que probablemente se beneficiarían de la terapia o que necesitarían un control más exhaustivo.

5 La solicitud de patente estadounidense publicada con la referencia US2012/252019 se refiere a la detección de cáncer de vejiga utilizando una combinación de marcadores de proteínas y ADN. Los marcadores de ADN pueden ser FGFR3, TWIST 1 y NID2 y los marcadores de proteínas pueden ser MMP2 o MMP9.

10 Karmes et al (Mayo Clinic Proceedings, vol. 87, no.9, 2012, páginas 835-842) desvelan un ensayo de diagnóstico para el cáncer urotelial de la vejiga basado en 4 biomarcadores: TWIST1, NID2, FGFR3 y MMP-2.

Kandimalla et al (Clinical Cancer Research, vol.19, no.17, 2013, páginas 4760-4769) desvelan la detección de cáncer de vejiga recidivante combinando el ensayo de mutación de FGFR3 con un ensayo de metilación 3-Plex de los genes OTX1, ONETCUT2 y OSR1.

15 Fernandez et al (Genome Research, vol.22, no.2, 2012, páginas 407-419) desvelan un patrón de metilación de ADN de cáncer humano.

### Objeto de la invención

20 Los inventores han establecido que la medición de la combinación de dos ensayos basados, por un lado en la identificación de mutaciones específicas de FGFR3 y, por otro lado, en la medida del grado de metilación de marcadores específicos, proporcionaría una predicción y/o detección precisa del cáncer de vejiga.

25 Por tanto, la invención se refiere a un método para la vigilancia, el diagnóstico y la exploración de un cáncer de vejiga, o riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga en un sujeto, comprendiendo dicho método:

30 a) una etapa de detección de una mutación en el gen FGFR3 en una primera muestra biológica; y  
b) una etapa de medición del grado de metilación de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto,

donde dicha etapa a) se realiza:

35 - detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 742C→T, 746C→G, 1114G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o  
- detectando una mutación en el grupo que consiste en las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

40 Preferentemente, dicha primera y segunda muestra biológica es una muestra de orina. Normalmente, tanto la etapa a) como la b) se realizan en la misma muestra de orina.

45 Preferentemente, dicho método comprende, después de la etapa b), una etapa b') adicional que consiste en comparar el grado de metilación medido en la etapa b) con un valor umbral, donde dicho valor umbral discrimina entre pacientes que padecen, o corren el riesgo de desarrollar, un cáncer de vejiga y pacientes que no padecen cáncer de vejiga.

50 Preferentemente, la presencia de dicha mutación en el gen FGFR3, y la comparación del grado de metilación de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos de los mismos con un valor umbral, son indicativos de un cáncer de vejiga o de un riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga.

Preferentemente, la etapa a) del método de la invención comprende además la detección de una mutación en el gen *TERT*, realizándose dicha detección:

55 - detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 77C→T y 99C→T por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32.

Preferentemente, la etapa b) del método de la invención consiste en:

60 - medir el grado de metilación de un fragmento de SEPTINA 9, como se muestra en la SEQ ID NO: 3;  
- medir el grado de metilación de un fragmento de SLIT 2, como se muestra en la SEQ ID NO: 4;  
- medir el grado de metilación de un fragmento de TWIST 1, como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y  
- medir el grado de metilación de un fragmento de HS3ST2, como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

65 Preferentemente, la etapa b) del método de la invención comprende además la medida del grado de metilación del

gen DDR1 y de fragmentos o variantes del mismo. Preferentemente, dicho fragmento se muestra en la SEQ ID NO: 7.

Preferentemente, dichas primeras y segundas muestras biológicas son orina.

Preferentemente, la etapa a) del método de la invención se realiza mediante PCR específica de alelo (AS-PCR, del inglés *allele specific PCR*). Normalmente, la etapa a) se realiza utilizando los cebadores como se muestra en las SEQ ID NO: 8 a 13.

Preferentemente, la etapa b) del método de la invención se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en tiempo real, multiplex, específica de metilación (Qm-PCR). Normalmente, dicha etapa b) comprende además una etapa de medición del grado de metilación de un gen constitutivo, que normalmente se selecciona entre el gen de albúmina,  $\beta$ -Actina y  $\beta$ -Globina, preferentemente el gen de albúmina o un fragmento o variante del mismo.

### Descripción detallada de la invención

Los inventores demostraron que la combinación de dos ensayos, basados respectivamente:

- en la detección de mutaciones específicas de FGFR3; y
- en la cuantificación del grado de metilación de los genes diana,

proporciona una estrategia prometedora para la detección del cáncer de vejiga, con una sensibilidad y especificidad extremadamente altas.

Por tanto, por consiguiente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la vigilancia, el diagnóstico y la exploración de un cáncer de vejiga, o riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga en un sujeto, donde dicho método comprende:

- a) una etapa de detección de una mutación en el gen FGFR3 en una primera muestra biológica; y
- b) una etapa de medición del grado de metilación de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto,

donde dicha etapa a) se realiza:

- detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 742C→T, 746C→G, 1114G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o
- detectando una mutación en el grupo que consiste en las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Preferentemente, donde dicho método comprende, después de la etapa b), una etapa b') adicional que consiste en comparar el grado de metilación medido en la etapa b) con un valor umbral, donde dicho valor umbral discrimina entre un paciente que padece o corre el riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga y un paciente que no padece cáncer de vejiga.

Por tanto, el método de la invención es un método que predice eficazmente el pronóstico del cáncer de vejiga en un paciente. Por tanto, dicho método puede adaptarse fácilmente a la atención médica del cáncer de vejiga, así como a la asignación de pacientes en ensayos clínicos con nuevos fármacos. De hecho, dicho método permite:

- la vigilancia de recidivas, es decir, el seguimiento de pacientes ya diagnosticados que padecen cáncer de vejiga,
- el diagnóstico inicial de cáncer de vejiga en un paciente,
- la exploración, es decir, la identificación de una población en riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga.

Como se usa en el presente documento, una población en riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga incluye:

- personas que fuman,
- personas expuestas a diversos productos químicos, especialmente en refinerías o en la industria de petróleo y gas,
- personas que padecen infección urinaria crónica,
- personas que padecen cistitis permanente, tal como esquistosomiasis

El método proporciona información crucial al profesional sanitario para que pueda determinar la estrategia terapéutica adecuada para implementar y/o decidir si el paciente debe ser tratado con terapia adyuvante, es decir, terapia adicional.

## Definiciones

El término "**FGFR3**" se refiere al gen del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos. Dicho gen codifica un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR, del inglés *fibroblast growth factor receptor*), estando su secuencia de aminoácidos muy conservada entre miembros y entre especies divergentes. Los miembros de la familia FGFR difieren entre sí en sus afinidades por ligando y distribución tisular. Una proteína representativa de longitud completa consistiría en una región extracelular, compuesta por tres dominios de tipo inmunoglobulina, un solo segmento que abarca la membrana hidrófoba y un dominio citoplasmático de tirosina cinasa. La parte extracelular de la proteína interacciona con factores de crecimiento de fibroblastos, poniendo en movimiento una cascada de señales en sentido descendente, influyendo en última instancia en la mitogénesis y la diferenciación. Este miembro particular de la familia se une a la hormona de crecimiento fibroblástico ácido y básico y desempeña un papel en el desarrollo y mantenimiento de los huesos. Las mutaciones en este gen conducen a craneosinostosis y a múltiples tipos de displasia ósea. Se han descrito tres variantes transcritas de corte y empalme alternativo que codifican diferentes isoformas de proteínas.

Los términos "**mutante**" y "**mutación**" significan cualquier cambio detectable en material genético, por ejemplo, ADN, ARN, ADNc, o cualquier proceso, mecanismo, o resultado de dicho cambio. Esto incluye mutaciones génicas, en las que se altera la estructura (por ejemplo, la secuencia de ADN) de un gen, cualquier gen o ADN que surja de cualquier proceso de mutación, y cualquier producto de expresión (por ejemplo, proteína o enzima) expresado por un gen o secuencia de ADN modificado. En general, una mutación se identifica en un sujeto comparando la secuencia de un ácido nucleico o polipéptido expresado por dicho sujeto con el correspondiente ácido nucleico o polipéptido expresado en una población de control. En el material genético una mutación también puede ser "silenciosa", es decir, la mutación no produce una alteración de la secuencia de aminoácidos del producto de expresión.

En el contexto de la presente solicitud, las mutaciones identificadas en el gen FGFR3 se indican de acuerdo con la nomenclatura de Dunnen y Antonarakis (2000). Según lo definido por Dunnen y Antonarakis a nivel de ácido nucleico, las sustituciones se indican con ">", por ejemplo, "1463T> C" indica que en el nucleótido 1463 de la secuencia de referencia una T se cambia por una C. Cuando se conoce la secuencia genómica completa, la mutación se indica mejor por el número de nucleótido de las referencias genómicas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**mutaciones diana**" se refiere a mutaciones específicas en el gen FGFR3, definidas de la siguiente manera:

- mutaciones 742C→T, 746C→G, 1114G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o
- mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Como se usa en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a una persona con síntomas y/o sospecha de tener cáncer de vejiga.

El término "**cáncer**" o "**tumor**", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de células que poseen características típicas de las células que causan cáncer, tales como proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento rápido y tasa de proliferación, y ciertos rasgos morfológicos característicos. Preferentemente el cáncer es un cáncer de vejiga.

Como se usa en el presente documento, el término "**paciente**" significa un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

La expresión "**terapia adyuvante**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de tratamiento de cáncer dado como tratamiento adicional, generalmente después de la resección quirúrgica del tumor primario, en un paciente afectado con un cáncer que está en riesgo de metastatizar y/o que es probable que recidive. El objetivo de dicho tratamiento adyuvante es mejorar el pronóstico. Las terapias adyuvantes comprenden radioterapia y terapia, preferentemente terapia sistémica, tal como hormonoterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia con anticuerpos monoclonales.

Como se usa en el presente documento, el término "**gen**" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa una proteína específica, incluyendo secuencias reguladoras precedentes (secuencias no codificantes 5') y posteriores (secuencias no codificantes 3') de la secuencia codificante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**genes de interés**" se refiere a genes de SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y a fragmentos o variantes de los mismos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**nivel de expresión génica**" o "**el nivel de expresión de un gen**", se refieren a una cantidad o a una concentración de un producto de transcripción, por ejemplo, ARNm, o de un producto de traducción, por ejemplo, una proteína o polipéptido. Normalmente, un nivel de expresión de

ARNm puede expresarse en unidades tales como transcritos por célula o nanogramos por microgramo de tejido. Un nivel de una proteína puede expresarse como nanogramos por microgramo de tejido o nanogramos por mililitro de un medio de cultivo, por ejemplo. Como alternativa, pueden emplearse unidades relativas para describir un nivel de expresión.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión **"transcrito de ARNm"** se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por la ARN polimerasa de una secuencia de ADN sin intrones y que la célula puede traducir a polipéptidos.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión **"muestra biológica"**, como se usa en este documento, se refiere a cualquier muestra biológica obtenida con el propósito de realizar una evaluación *in vitro*. Normalmente, dicha muestra biológica puede obtenerse a partir de tejidos sólidos y tejidos tumorales. Los ejemplos de muestras de ensayo adicionales incluyen orina, sangre, suero, plasma, líquido de aspirado de pezón, saliva, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo (LCR). Preferentemente, dicha muestra biológica es orina. Normalmente, la orina puede  
15 comprender material derivado de tumor tal como células tumorales o proteínas y/o ácidos nucleicos de tumor recidivante. Normalmente, dichas primera y segunda muestras biológicas son las mismas o diferentes muestras biológicas.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión **"medición del nivel de expresión de un gen"** incluye la etapa de medición de la cantidad de un producto de transcripción, preferentemente ARNm obtenido a través de la transcripción de dicho gen, y/o de la etapa de medición de la cantidad de producto de traducción, preferentemente la proteína obtenida a través de la traducción de dicho gen. Preferentemente, la etapa de medición de la expresión de un gen, se refiere a la etapa de medición de la cantidad de ARNm obtenida a través de la transcripción de dicho gen. Normalmente, la etapa a) de medición del nivel de expresión génica de dicho gen o genes, puede realizarse de  
25 acuerdo con las técnicas establecidas, bien conocidas por el experto en la materia.

**"Exploración de cáncer de vejiga"** significa la detección de una predisposición a desarrollar cáncer de vejiga, así como la detección de cáncer de vejiga ya presente en un sujeto.

30 **"Metilación"** significa la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de una citosina en un dinucleótido CpG. Estos dinucleótidos no ocurren con frecuencia en la estructura de ADN, excepto en las "islas" CpG. Normalmente, estas islas están representadas a nivel de la región promotora de los genes. Por tanto, cuando hablamos de metilación de un gen, nos referimos a la metilación de la región promotora de dicho gen. La presencia de un grupo metilo en un sitio preciso impide la interacción entre el gen y los factores de transcripción. Normalmente, los grupos metilo  
35 impiden que los factores de transcripción se unan al sitio de amplificación y al promotor, e impiden que la ARN polimerasa se una al sitio de inicio. Por tanto, la metilación de la región promotora conduce a la represión de la transcripción del ADN.

40 La expresión **"metilación de un gen"** incluye la metilación de las islas CpG de la secuencia de nucleótidos del gen aunque también la metilación de las secuencias de nucleótidos del promotor del gen al que se aplica dicha expresión.

**"Fragmento de un gen"** significa una secuencia de dicho gen con una longitud de al menos 50 pares de bases, preferentemente con una longitud de entre 60 y 120 pares de bases.

#### 45 **Detección de mutaciones específicas en el gen FGFR3**

El método de la invención comprende una etapa a) de detección de una mutación en el gen FGFR3 en una primera muestra biológica donde dicha etapa a) se realiza:

- 50
- detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 742C→T, 746C→G, 1114G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o
  - detectando una mutación en el grupo que consiste en las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

55 Preferentemente, dicha etapa b) es una etapa de medición del grado de metilación de al menos dos genes, preferentemente al menos tres genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos o variantes de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

60 Más preferentemente, dicha etapa b) es una etapa de medición del grado de metilación de todos los genes SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos o variantes de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto.

65 Preferentemente, dicha primera y segunda muestra biológica son la misma muestra biológica. Preferentemente, la etapa a) es una etapa de detección de una mutación seleccionada del grupo que consiste en 746C→G, 1114 G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o las mutaciones Ser249Cys, Gly372Cys

y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Normalmente, la detección de la mutación diana puede realizarse en secuencias de ADN, en transcritos de ARNm, o en secuencias de proteínas. Más preferentemente, la detección de la mutación diana puede realizarse en secuencias de ADN que se trataron con bisulfito.

Preferentemente, la mutación de FGFR3 a detectar se selecciona del grupo que consiste en las mutaciones:

- 742C→T,
- 746C→G,
- 1114G→T y
- 1124A→G,

por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, que se refiere a la secuencia de ADN que codifica la proteína FGFR3. La SEQ ID NO: 1 es un fragmento de la secuencia disponible en línea con el número de registro NM\_001163213.1 (Secuencia de referencia del NCBI). La SEQ ID NO: 1 codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

En la SEQ ID NO: 1, el nucleótido en la posición 742 es una citosina. La mutación 742C → T consiste en la sustitución de dicha citosina en la posición 742 por una timina. Dicha mutación conduce a una proteína que comprende una cisteína en la posición 248 en lugar de una arginina, por referencia a la SEQ ID NO: 1.

En la SEQ ID NO: 1, el nucleótido en la posición 746 es una citosina. La mutación 746C → G consiste en la sustitución de dicha citosina en la posición 746 por una guanina. Dicha mutación conduce a una proteína que tiene una cisteína en la posición 248 en lugar de una serina por referencia a la SEQ ID NO: 1.

En la SEQ ID NO: 1, el nucleótido en la posición 1114 es una guanina. La mutación 1114G → T consiste en una sustitución de dicha guanina por una timina. Dicha mutación conduce a una proteína que tiene cisteína en la posición 372 en lugar de una glicina por referencia a la SEQ ID NO: 1.

En la SEQ ID NO: 1, el nucleótido en la posición 1124 es una adenina. La mutación 1124A → G consiste en una sustitución de dicha adenina por una guanina. Dicha mutación conduce a una proteína que tiene una cisteína en la posición 375 en lugar de una tirosina por referencia a la SEQ ID NO: 1.

Según una primera realización, dicha mutación puede detectarse analizando una molécula de ácido nucleico de FGFR3.

En el contexto de la invención, las **"moléculas de ácido nucleico de FGFR3"** incluyen ARNm, ADN genómico y ADNc derivado de ARNm. Las mutaciones de FGFR3 pueden detectarse en una muestra de ARN o ADN, preferentemente después de la amplificación.

El ADN o ARN puede ser monocatenario o bicatenario. Estos pueden utilizarse para la detección por amplificación y/o hibridación con una sonda, por ejemplo. La muestra de ácido nucleico puede obtenerse de cualquier fuente celular o biopsia tisular.

Los ejemplos no limitantes de fuentes celulares disponibles incluyen, sin limitación, células sanguíneas, células bucales, células epiteliales, fibroblastos, o cualquier célula presente en un tejido obtenido por biopsia. Las células también pueden obtenerse a partir de líquidos corporales, tales como orina, sangre, plasma, suero, linfa, etc. Preferentemente, las células se obtienen de muestras de orina.

El ADN puede extraerse utilizando cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe en Sambrook et al., 1989. ARN también puede aislarse, por ejemplo de biopsia tisular, utilizando métodos estándar bien conocidos por los expertos en la materia, tales como extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.

El ARN aislado puede someterse a transcripción inversa y amplificación acopladas, tal como transcripción inversa y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos que son específicos para un sitio mutado o que permiten la amplificación de una región que contiene el sitio mutado.

Normalmente, para garantizar la transcripción inversa (cuando sea apropiado) y la amplificación específicas, pueden elegirse condiciones de emparejamiento con cebadores; de manera que la aparición de un producto de amplificación sea un diagnóstico de la presencia de una mutación FGFR3 particular. De otro modo, el ARN puede retrotranscribirse y amplificarse, o el ADN puede amplificarse, después de lo cual puede detectarse un sitio mutado en la secuencia amplificada mediante hibridación con una sonda adecuada o mediante secuenciación directa, o mediante cualquier otro método apropiado conocido en la materia. Por ejemplo, un ADNc obtenido a partir de ARN puede clonarse y secuenciarse para identificar una mutación en la secuencia de FGFR3.

Se dispone de numerosas estrategias para el análisis de genotipos (Antonarakis et al., 1989; Cooper et al., 1991; Grompe, 1993). Resumiendo, la molécula de ácido nucleico puede analizarse para determinar la presencia o ausencia de un sitio de restricción. Cuando una mutación por sustitución de bases crea o anula el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, esto permite un análisis de PCR directa simple para la mutación. Otras estrategias incluyen, aunque sin limitación, secuenciación directa, polimorfismos en la longitud de fragmentos de

restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*); hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO, del inglés *allele-specific oligonucleotides*) que son sondas sintéticas cortas que hibridan solo con una secuencia perfectamente emparejada en condiciones de hibridación adecuadamente rigurosas; PCR específica de alelo; PCR utilizando cebadores mutagénicos; PCR-ligasa, escisión HOT; electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE, del inglés *denaturing gradient gel electrophoresis*), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización y temperatura (TGGE, del inglés *temperature denaturing gradient gel electrophoresis*), polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP, del inglés *single-stranded conformational polymorphism*) y cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (Kuklin et al., 1997). La secuenciación directa también puede realizarse mediante cualquier método, incluyendo sin limitación, secuenciación química, utilizando el método de Maxam-Gilbert; secuenciación enzimática, utilizando el método de Sanger; secuenciación de espectrometría de masas; secuenciación utilizando una tecnología basada en microplacas; y PCR cuantitativa en tiempo real. Preferentemente, el ADN de un sujeto se somete primero a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de amplificación específicos.

Sin embargo, se dispone de otros métodos diversos, que permiten estudiar el ADN independientemente de la PCR, tal como la amplificación de círculo rodante (RCA, del inglés *rolling circle amplification*), el ensayo Invader™ o el ensayo de ligamiento de oligonucleótidos (OLA, *oligonucleotide ligation assay*). El OLA puede utilizarse para revelar mutaciones por sustitución de bases. De acuerdo con este método, se construyen dos oligonucleótidos que hibridan con secuencias adyacentes en el ácido nucleico diana, situándose la unión en la posición de la mutación. La ADN ligasa se unirá de manera covalente a los dos oligonucleótidos solo si están perfectamente hibridados.

Preferentemente, la etapa a) del método de la invención puede realizarse mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR, del inglés *allele specific Polymerase Chain Reaction*).

Como se usa en el presente documento, **"Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo"** (AS-PCR) se refiere a una realización específica de la reacción en cadena de la polimerasa que permite la detección directa de cualquier mutación puntual en el ADN humano analizando los productos de la PCR en un gel de agarosa o poliacrilamida teñido con bromuro de etidio. La AS-PCR surte efecto porque un cebador oligonucleotídico que forma un emparejamiento erróneo en 3' con el molde de ADN, será resistente a la extensión del cebador por la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*. Por lo tanto, para detectar los alelos en los ADN de genotipo desconocido, pueden sintetizarse y utilizarse cebadores oligonucleotídicos específicos para todos los alelos conocidos.

Básicamente, el principio general subyacente en las técnicas de AS-PCR es, por tanto, diseñar un cebador específico de mutación que produzca la amplificación preferencial de un alelo mutante específico.

Para la implementación del método AS-PCR, pueden utilizarse los cebadores definidos a continuación:

- un cebador directo (SEQ ID NO: 8 y 11) etiquetado en 5' con un colorante fluorescente específico tal como 6FAM, HEX y TET y
- un cebador inverso (SEQ ID NO: 9, 10, 12 y 13) que presenta un nucleótido modificado en 3' con tecnología de ácido nucleico bloqueado (LNA, *Locked Nucleic Acid*).

Como se usa en el presente documento, las expresiones **"nucleótido modificado mediante tecnología de ácido nucleico bloqueado"** o **"nucleótido modificado con LNA"**, se refieren a oligonucleótidos que son idóneos cuando se estudian secuencias cortas o muy similares. La alta afinidad de un oligonucleótido de LNA por su secuencia complementaria produce una especificidad drásticamente mejorada en comparación con un oligonucleótido de ADN tradicional y se utiliza para diferenciar entre secuencias que difieren en un solo nucleótido, lo cual puede ser crítico para el éxito de muchos experimentos. De hecho, cuando se utiliza con cualquier base estándar (A, C, G, T o U), las sondas sintetizadas utilizando LNA tienen mayor estabilidad térmica que el ADN o ARN convencional y, por lo tanto, forman un enlace más fuerte con la secuencia complementaria. Normalmente, cuando se detectan las mutaciones FGFR3, pueden utilizarse los cebadores directo e inverso desvelados en la tabla 1.

**Tabla 1: Cebadores utilizados para detectar las mutaciones diana en el gen FGFR3**

| Mutación a detectar | Nombre del cebador | SEQ ID NO | Secuencia central                   | Secuencia utilizada                                                                                              |
|---------------------|--------------------|-----------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 742C→T              | F1 directo         | 8         | 5' CAG TGG CGG TGG TGG<br>TGA GG 3' | 5' 6FAM-CAG TGG CGG TGG TGA GG3'<br>(SEQ ID NO: 8 etiquetada en 5' con FAM)                                      |
|                     | R2 inverso         | 9         | 5' ATG GGC CGG TGC<br>GGG GAG CA 3' | 5' ATG GGC CGG TGC GGG GAG C* A3'<br>(SEQ ID NO: 9 con citosina en la posición 19 modificada con tecnología LNA) |
| 746 C→G             | F1 directo         | 8         | 5' CAG TGG CGG TGG TGG<br>TGA GG 3' | 5' 6FAM-CAG TGG CGG TGG TGA GG3'<br>(SEQ ID NO: 8 etiquetada en 5' con FAM)                                      |



(continuación)

| Mutación a detectar | Nombre del cebador | SEQ ID NO | Secuencia central                           | Secuencia utilizada                                                                                                       |
|---------------------|--------------------|-----------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | R1 inverso         | 10        | 5' CAG GAT GGG CCG GTG CGG GC 3'            | 5' CAG GAT GGG CCG GTG CGG G* C 3' (SEQ ID NO: 10 con guanina en la posición 19 modificada con tecnología LNA)            |
| 1114 G→T            | F2 directo         | 11        | 5' ATG TCT TTG CAG CCG AGG AGG AG 3'        | 5' HEX-ATG TCT TTG CAG CCG AGG AG3' (SEQ ID NO: 11 etiquetado en 5' con HEX)                                              |
|                     | R3 inverso         | 12        | 5' AGC TGA GGA TGC CTG CAT ACA CAC TGC A 3' | 5' AGC TGA GGA TGC CTG CAT ACA CAC TGC* A 3' (SEQ ID NO: 12 con citosina en la posición 27 modificada con tecnología LNA) |
| 1124 A→G            | F2 directo         | 11        | 5' ATG TCT TTG CAG CCG AGG AGG AG 3'        | 5' HEX-ATG TCT TTG CAG CCG AGG AG 3' (SEQ ID NO: 11 etiquetado en 5' con HEX)                                             |
|                     | R4 inverso         | 13        | 5' ACC CCG TAG CTG AGG ATG CCT GCT C 3'     | 5' ACC CCG TAG CTG AGG ATG CCT GCT C* 3' (SEQ ID NO: 13 con citosina en la posición 25 modificada con tecnología LNA)     |

Los nucleótidos que en la tabla 1 están marcados con un asterisco, son nucleótidos modificados con tecnología LNA. Las SEQ ID NO: 8 a 13, mostradas en el listado de secuencias adjunto, están etiquetadas en 5' con un colorante fluorescente específico, tal como 6FAM, HEX y TET o presentan un nucleótido modificado en 3' con tecnología de ácido nucleico bloqueado, como se muestra en la tabla 1.

Normalmente, cuando se implementa la AS-PCR en la etapa a) del método de la invención, puede utilizarse un control interno, como un gen constitutivo.

Preferentemente, dicho gen constitutivo se selecciona del grupo que consiste en albúmina,  $\beta$ -actina y  $\beta$ -globina o fragmentos y variantes de los mismos. Preferentemente, dicho gen constitutivo es  $\beta$ -globina o fragmentos y variantes de la misma. Más preferentemente, el control interno es un fragmento de un gen constitutivo, más preferentemente un fragmento de  $\beta$ -globina. Normalmente, dicho fragmento es la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 31.

Para este fin, también pueden utilizarse los siguientes cebadores:

- FGLO directo: 5' HEX-CCT TTG GGG ATC TGT CCA CTC CTG A 3' (SEQ ID NO: 14); y
- RGLO inverso: 5' GTT GTC CAG GTG AGC CAG GCC AT 3' (SEQ ID NO: 15)

Preferentemente, la etapa a) del método de la invención puede realizarse mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR) utilizando dos PCR de la siguiente manera:

- una PCR1 que detecta las mutaciones 742C→T y 1114G→T por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 y la  $\beta$ -globina;
- una PCR2 que detecta las mutaciones 7422C→G y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, y la  $\beta$ -globina.

De acuerdo con una segunda realización, dicha mutación en el gen FGFR3 puede detectarse a nivel de proteína. Por consiguiente, una mutación de FGFR de acuerdo con la invención se selecciona preferentemente del grupo que consiste en las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, y, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Dicha mutación puede detectarse de acuerdo con cualquier método apropiado conocido en la materia. En particular una muestra, tal como una biopsia tisular, obtenida de un sujeto, puede ponerse en contacto con anticuerpos específicos de la forma mutada de FGFR3, es decir, anticuerpos que son capaces de diferenciar entre una forma mutada de FGFR3 y la proteína de tipo silvestre (o cualquier otra proteína), para determinar la presencia o ausencia de un FGFR3 especificado por el anticuerpo. Los anticuerpos que reconocen específicamente un FGFR3 mutado también forman parte de la invención. Los anticuerpos son específicos de FGFR3 mutado, es decir, no reaccionan de forma cruzada con el FGFR3 de tipo silvestre.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, monocatenarios o bicatenarios, quiméricos, humanizados, o partes de una molécula de inmunoglobulina, incluyendo aquellas partes conocidas en la materia como fragmentos de unión a antígeno Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y F(v). También pueden ser inmunoconjugados, por ejemplo, con una toxina, o anticuerpos marcados.

Aunque pueden utilizarse anticuerpos policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales porque a largo plazo son más reproducibles. Se conocen bien procedimientos para suscitar "anticuerpos policlonales". Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse del suero de un animal inmunizado contra el antígeno apropiado, que puede producirse mediante ingeniería genética, por ejemplo, según métodos estándar bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, dichos anticuerpos pueden suscitarse administrando FGFR3 mutado por vía subcutánea a conejos blancos de Nueva Zelanda que primero se han desangrado para obtener suero preinmune. Los antígenos pueden inyectarse a un volumen total de 100 µl por sitio en seis sitios diferentes. Cada material inyectado puede contener adyuvantes con o sin gel de acrilamida pulverizada que contiene la proteína o el polipéptido después de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio). A continuación, la sangre de los conejos se extrae dos semanas después de la primera inyección y periódicamente reciben una inyección de refuerzo con el mismo antígeno tres veces cada seis semanas. A continuación, se recoge una muestra de suero 10 días después de cada inyección de refuerzo. Después, los anticuerpos policlonales se recuperan del suero mediante cromatografía de afinidad utilizando el antígeno correspondiente para capturar el anticuerpo. En el documento de Harlow et al. (1988), incorporado en el presente documento en las referencias, se desvelan este y otros procedimientos para suscitar anticuerpos policlonales.

Un "anticuerpo monoclonal", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen únicamente una especie de sitio de combinación de anticuerpo que puede inmunorreactar con un epítipo particular. Por tanto, normalmente, un anticuerpo monoclonal presenta una sola afinidad de unión por cualquier epítipo con el que inmunorreacciona. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno de ellos inmuno-específico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente se produjo un anticuerpo monoclonal por inmortalización de una línea celular secretora de inmunoglobulina clonalmente pura, a través de los métodos de la presente invención, también puede prepararse una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo. En la materia se conocen muy bien métodos de laboratorio para preparar anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Harlow et al., 1988). Los anticuerpos monoclonales (Acm) pueden prepararse inmunizando FGFR3 mutado purificado en un mamífero, por ejemplo, un ratón, una rata, un ser humano y mamíferos similares. Las células productoras de anticuerpos en el mamífero inmunizado se aíslan y se fusionan con células de mieloma o heteromieloma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método estándar de cultivo de hibridomas se describe en Kohler y Milstein (1975).

Aunque los Acm pueden producirse mediante el cultivo de hibridomas, la invención no debe ser tan limitada. También se contempla el uso de Acm producidos por un ácido nucleico de expresión clonado a partir de un hibridoma de esta invención. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de esta invención puede transferirse a otra línea celular para producir un transformante. Desde el punto de vista genotípico, el transformante es distinto del hibridoma original pero también es capaz de producir moléculas de anticuerpos de esta invención, incluyendo fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpo completas, que corresponden a los secretados por el hibridoma. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4 642 334 de Reading; n.º de publicación PCT; las publicaciones de patente europea n.º 0239400 de Winter et al. y n.º 0125023 de Cabilly et al.

También se contemplan técnicas de generación de anticuerpos que no implican inmunización, tales como, por ejemplo, el uso de tecnología de presentación de fagos para examinar bibliotecas intactas (de animales no inmunizados); véase Barbas et al. (1992) y Waterhouse et al. (1993).

Los anticuerpos suscitados contra FGFR3 mutado pueden reaccionar en cruzado con FGFR3 de tipo silvestre. Por consiguiente, se requiere una selección de anticuerpos específicos para el FGFR3 mutado. Esto puede realizarse agotando el conjunto de anticuerpos de aquellos que son reactivos con el FGFR3 de tipo silvestre, por ejemplo, sometiendo los anticuerpos suscitados a una cromatografía de afinidad contra FGFR3 de tipo silvestre.

Como alternativa, para los fines de la invención, pueden utilizarse agentes de unión que no sean anticuerpos. Estos pueden ser, por ejemplo, aptámeros, que son una clase de moléculas que representan una alternativa a los anticuerpos en cuanto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con elevada afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse a través de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX, del inglés *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, a la larga modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y

ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente restringidas presentadas en una plataforma proteica, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se selecciona de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

5 La sonda, los cebadores, los aptámeros o los anticuerpos de la invención, pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva u otros marcadores conocidos en la materia. En la técnica se conocen marcadores que, en general, proporcionan una señal (ya sea directa o indirectamente). El término "**marcado(a)**", con respecto a la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención, pretende incluir el marcado directo de la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención, mediante acoplamiento (es decir, unión física) de una sustancia detectable con la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención, así como el marcado indirecto de la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Otros ejemplos de sustancias detectables incluyen, aunque sin limitación, agentes radioactivos o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)). Los ejemplos de marcado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcado final de una sonda de ADN con biotina, de manera que pueda detectarse con estreptavidina marcada con fluorescencia. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede estar marcado con una molécula radioactiva por cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero sin limitación, átomos radiactivos para estudios de gammagrafía, tales como <sup>1123</sup>, <sup>1124</sup>, <sup>1111</sup>, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re.

Preferentemente, la etapa a) del método de la invención comprende además la detección de una mutación en el gen *TERT*, realizándose dicha detección:

- 25 - detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 77C→T y 99C→T por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32.

Dichas mutaciones se desvelan en la publicación de Yves Allory et al. "Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Mutations in Bladder Cancer: High Frequency Across Stages, Detection in Urine, and Lack of Association with Outcome", Asociación europea de urología.

El término "**TERT**" se refiere al gen de la telomerasa transcriptasa inversa. Su secuencia está disponible con el número de registro NC\_000005.9.

35 En el contexto de la invención, por razones de claridad, las mutaciones específicas se definen por referencia a un fragmento específico de *TERT*, como se muestra en la SEQ ID NO: 32. Dicho fragmento corresponde a la secuencia inversa complementaria de la posición 1 295 301 a la 1 295 152 de la secuencia disponible con el número de registro NC\_000005.9.

40 La mutación 1 295 228 C→T por referencia al gen *TERT* corresponde a la mutación 77C→T, por referencia a la SEQ ID NO: 32.

La mutación 1 295 250 C→T por referencia al gen *TERT* corresponde a la mutación 99 C→T por referencia a la SEQ ID NO: 32.

45 Estas mutaciones están presentes en el promotor del gen *TERT*. De manera más precisa, las mutaciones 1 295 228 C→T y 1 295 250 C→T, corresponden a mutaciones específicas en las posiciones -124 y -146 desde el sitio de inicio de la traducción en el promotor del gen *TERT*.

50 Normalmente, cuando se detectan las mutaciones *TERT*, en un caso se utilizan los cebadores directo e inverso de la siguiente manera:

*TERT* directo: 5 'CCC TTC ACC TTC CAG CTC 3' (SEQ ID NO: 33)

55 *TERT* inverso: 5' AGC GCT GCC TGA AAC TCG 3' (SEQ ID NO: 34)

Las sondas útiles son oligonucleótidos en dirección inversa. Las secuencias apropiadas para detectar dichas mutaciones específicas en el gen *TERT* se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 2: Secuencias utilizadas para detectar las mutaciones específicas en el gen *TERT***

| <b>Mutación a detectar</b> | <b>SEQ ID NO</b> | <b>Secuencia central</b> | <b>Secuencia utilizada</b>                                                                                                 |
|----------------------------|------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 77C→T                      | 35               | 5'CCCGGAAGGGGCT3'        | 5' FAM/VIC-CCCGGAAGGGGCT-MGB 3' (SEQ ID NO: etiquetada en el extremo 5' con FAM/VIC y acoplada a un MGB en el extremo 3'). |
| 99C→T                      | 36               | 5' CCCGGAAGGGGTC-3'      | 5' FAM/VIC-CCCGGAAGGGGTC-MGB 3' (SEQ ID NO: etiquetada en el extremo 5' con FAM/VIC y acoplada a un MGB en el extremo 3'). |

**Medición del grado de metilación del gen de interés**

- 5 El método de la invención comprende además una etapa b) de medición del grado de metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos o variantes de los mismos, en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto en una segunda muestra biológica.

Los inventores investigaron la metilación de 18 genes y su papel en la carcinogénesis, especialmente en el cáncer de vejiga. Descubrieron que la metilación de SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 era muy prometedora para el diagnóstico de cáncer de vejiga. El uso de ambos ensayos de detección de mutaciones específicas de FGFR3 y la determinación de la metilación de los genes de SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1 y HS3ST2, proporciona resultados inesperados en cuanto a la especificidad y sensibilidad del método de diagnóstico.

15 **"SEPTINA 9" o "SEPT9"**, forma parte de un grupo de proteínas denominadas septinas. Las septinas están implicadas en un proceso denominado citocinesis, que, en la división celular, es la etapa cuando el líquido que está dentro de la célula (citoplasma) se divide para formar dos células distintas. La proteína septina 9 también parece actuar como un supresor tumoral, lo que significa que regula el crecimiento celular e impide que las células se dividan demasiado rápido o de manera incontrolada. La secuencia del gen SEPT9 humano está disponible en línea con el número de registro ENSG00000184640 de Ensemble. En el contexto de la invención, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de un fragmento de SEPTINA 9, como se muestra en la SEQ ID NO: 3. Como alternativa, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de una variante de SEPTINA 9 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 98 % con la SEQ ID NO: 3.

25 **"SLIT2"** codifica el homólogo 2 de abertura. La secuencia del gen SLIT2 humano está disponible en línea con el número de registro ENSG00000145147 de Ensemble. En el contexto de la invención, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de un fragmento de SLIT2, como se muestra en la SEQ ID NO: 4. Como alternativa, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de una variante de SLIT2 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 98 % con la SEQ ID NO: 4.

35 **"TWIST1"** codifica el factor de transcripción 1 de hélice-bucle-hélice básico. La secuencia del gen TWIST1 humano está disponible en línea con el número de registro ENSG00000122691 de Ensemble. En el contexto de la invención, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de un fragmento de TWIST1, como se muestra en la SEQ ID NO: 5. Como alternativa, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de una variante de TWIST1 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 98 % con la SEQ ID NO: 5.

40 **"HS3ST2"** codifica sulfato de heparán (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 2. La secuencia del HS3ST2 humano está disponible en línea con el número de registro ENSG00000122254 de Ensemble. En el contexto de la invención, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de un fragmento de HS3ST2, como se muestra en la SEQ ID NO: 6. Como alternativa, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de una variante de HS3ST2 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 98 % con la SEQ ID NO: 6.

50 **"DDR1"** codifica el receptor de tirosina cinasa 1 con dominio discoidina. La secuencia del gen DDR1 humano está disponible en línea con el número de registro ENSG00000204580 de Ensemble. En el contexto de la invención, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de un fragmento de DDR1, como se muestra en la SEQ ID NO: 7. Como alternativa, la etapa b) del método de la invención consiste en detectar la metilación de una variante de DDR1 que tiene un porcentaje de identidad de al menos 80 %, preferentemente de al menos 90 %, más preferentemente de al menos 98 % con la SEQ ID NO: 7.

55 La determinación del grado de metilación de los genes de interés en una muestra, puede determinarse por diferentes medios. Son ejemplos no limitativos de métodos adecuados para medir el grado de metilación de acuerdo con la invención:

- PCR específica de metilación;
- PCR específica de metilación en tiempo real;
- pirosecuenciación;
- PCR utilizando proteína de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa y ensayo en microplaca de ADN;
- 5 - detección de metilación diferencial con endonucleasa de restricción sensible a metilación;
- detección de metilación diferencial - método de secuenciación con bisulfato;
- análisis de conformación de cadena única sensible a metilación (MS-SSCA);
- análisis de fusión de alta resolución (HRM);
- extensión de cebador de un solo nucleótido sensible a metilación (MS-SnuPE);
- 10 - escisión específica de bases; y
- métodos basados en micromatrices.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante PCR específica de metilación. Cuando se utiliza el método específico de PCR específica de metilación en ADN genómico tratado con bisulfito, la citosina en la región 5'-CpG-3' permanece intacta, si está metilada, pero la citosina cambia a uracilo, si no está metilada. Por consiguiente, basándose en la secuencia de bases transformada después del tratamiento con bisulfito, se construyen conjuntos de cebadores de PCR correspondientes a una región que tiene la secuencia de bases 5'-CpG-3'. En el presente documento, los conjuntos de cebadores construidos son dos tipos de conjuntos de cebadores: un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia de bases metiladas, y un conjunto de cebadores correspondiente a la secuencia de bases no metiladas. Cuando el ADN genómico se transforma con bisulfito y después se amplifica por PCR utilizando los dos tipos de conjuntos de cebadores anteriores, el producto de PCR se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia de bases metiladas, si el ADN genómico estaba metilado, pero el ADN genómico se detecta en la mezcla de PCR empleando los cebadores correspondientes a la secuencia de bases no metiladas, si el ADN genómico no estaba metilado. Esta metilación puede analizarse cuantitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante PCR específica de metilación en tiempo real. La PCR específica de metilación en tiempo real es un método de medición en tiempo real modificado del método de PCR específica de metilación y comprende el tratamiento de ADN genómico con bisulfito, el diseño de cebadores de PCR correspondientes a la secuencia de bases metilada y realizar PCR en tiempo real utilizando los cebadores. Los métodos para detectar la metilación del ADN genómico incluyen dos métodos: un método de detección utilizando una sonda TaqMan complementaria a la secuencia de bases amplificada; y un método de detección utilizando Sybergreen. Por tanto, la PCR específica a la metilación en tiempo real permite realizar un análisis cuantitativo selectivo del ADN metilado. En el presente documento, utilizando una muestra de ADN metilado *in vitro* se representa una curva estándar y un gen que no contiene la secuencia 5'-CpG-3' en la secuencia de bases también se amplifica como un grupo de control negativo para la normalización para analizar cuantitativamente el grado de metilación.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante pirosecuenciación. El método de pirosecuenciación es un método de secuenciación cuantitativo en tiempo real modificado del método de secuenciación con bisulfito. Del mismo modo que la secuenciación con bisulfito, el ADN genómico se transforma por tratamiento con bisulfito, y después, se construyen cebadores de PCR correspondientes a una región que no contiene una secuencia de bases 5'-CpG-3'. Específicamente, el ADN genómico se trata con bisulfito, se amplifica utilizando los cebadores de PCR, y después se somete a un análisis de secuencia de bases en tiempo real utilizando un cebador de secuenciación. El grado de metilación se expresa como un índice de metilación analizando las cantidades de citosina y timina en la región 5'-CpG-3'.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante PCR utilizando una proteína de unión específica de ADN metilado, PCR cuantitativa y un ensayo con microplaca de ADN. Cuando una proteína que se une específicamente a ADN metilado se mezcla con ADN, la proteína se une específicamente solo al ADN metilado. Por tanto, la PCR mediante una proteína de unión específica a metilación o un ensayo con microplaca de ADN permiten el aislamiento selectivo de solo ADN metilado. El ADN genómico se mezcla con una proteína de unión específica de metilación, y después solo se aísla selectivamente ADN metilado. El ADN aislado se amplifica utilizando cebadores de PCR correspondientes a la región promotora, y después se mide la metilación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa.

Además, la metilación del ADN también puede medirse mediante un método de PCR cuantitativa, y el ADN metilado aislado con una proteína de unión específica de ADN metilado puede marcarse con una sonda fluorescente e hibridar con una microplaca de ADN que contiene sondas complementarias, midiendo así la metilación del ADN. En el presente documento, la proteína de unión específica de ADN metilado puede ser, pero sin limitación, McrBt.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante una endonucleasa de restricción sensible a metilación. La detección de metilación diferencial puede realizarse poniendo en contacto una muestra de ácido nucleico con una endonucleasa de restricción sensible a metilación que escinde solo los sitios CpG no metilados. En una reacción distinta, la muestra se pone además en contacto con un isoesquímico de la enzima de restricción sensible a metilación que escinde sitios CpG metilados y no metilados, escindiendo por lo tanto el ácido nucleico metilado.

Se añaden cebadores específicos a la muestra de ácido nucleico, y el ácido nucleico se amplifica por cualquier método convencional. La presencia de un producto amplificado en la muestra tratada con la enzima de restricción sensible a metilación, pero la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación, indica que en la región de ácido nucleico ensayada se ha producido metilación. Sin embargo, la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con la enzima de restricción sensible a metilación junto con la ausencia de un producto amplificado en la muestra tratada con el isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación, indica que en la región de ácido nucleico ensayada no se ha producido metilación. Como se usa en el presente documento, la expresión **"enzima de restricción sensible a metilación"** se refiere a una enzima de restricción (por ejemplo, SmaI) que incluye CG como parte de su sitio de reconocimiento y que tiene actividad cuando la C está metilada en comparación con cuando la C no está metilada. Los ejemplos no limitantes de enzimas de restricción sensibles a metilación incluyen MspI, HpaII, BssHII, BstUI y NotI. Dichas enzimas pueden utilizarse solas o en combinación. Los ejemplos de otras enzimas de restricción sensibles a metilación incluyen, pero sin limitación, SacII y EagI.

El isoesquizómero de la enzima de restricción sensible a metilación es una enzima de restricción que reconoce el mismo sitio de reconocimiento que la enzima de restricción sensible a metilación, pero escinde las CG metiladas y no metiladas. Un ejemplo del mismo incluye MspI.

En una realización, la etapa b) se realiza mediante el método de secuenciación con bisulfato. En este método, la detección de un ácido nucleico que contiene CpG metilado comprende las etapas de: poner en contacto una muestra que contiene ácido nucleico, con un agente que modifica citosina no metilada; y amplificar el ácido nucleico que contiene CpG en la muestra utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos de CpG, donde los cebadores oligonucleotídicos discriminan entre ácido nucleico metilado modificado y ácido nucleico no metilado y detectan el ácido nucleico metilado. La etapa de amplificación es opcional y conveniente, pero no es esencial. El método se basa en la reacción PCR para diferenciar entre ADN metilado modificado (por ejemplo, modificado químicamente) y ADN no metilado. Dichos métodos se describen en la patente estadounidense N° 5 786 146 en relación a la secuenciación con bisulfito para la detección de ácido nucleico metilado.

#### **Método de diagnóstico mejorado**

Preferentemente, las etapas a) y b) se realizan en la misma muestra biológica. Más preferentemente, dichas etapas a) y b) se realizan en el mismo material nucleico, preferentemente en el mismo ADN. Aún más preferentemente, dicho ADN es un ADN tratado con bisulfito. Como consecuencia, en una realización más preferida, dichas etapas a) y b) se realizan en el mismo ADN del paciente, que fue tratado previamente con bisulfito. Normalmente, las etapas a) y b) se realizan simultáneamente.

En esta realización específica, la etapa a) es una etapa para determinar la presencia de:

- una guanina (G) en la posición 746 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito;
- una timina (T) en la posición 1114 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito; y/o
- una guanina (G) en la posición 1124 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito.

Dichas mutaciones corresponden respectivamente a las mutaciones Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Por tanto, en una realización preferida, la etapa a) es una etapa de detección de una mutación en el gen FGFR3 en una versión de la secuencia de ADN tratada con bisulfito como se muestra en la SEQ ID NO: 1.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"versión de la secuencia de ADN tratada con bisulfito como se muestra en la SEQ ID NO: 1"** se refiere a la secuencia del gen FGFR3 que se trató con bisulfito. El tratamiento de ADN con bisulfito transforma los restos de citosina a restos de uracilo, pero no afecta a restos de 5-metilcitosina. Por tanto, el tratamiento con bisulfito introduce cambios específicos en la secuencia de ADN que dependen del estado de metilación de restos de citosina individuales, proporcionando información de resolución de un solo nucleótido sobre el estado de metilación de un segmento de ADN.

Como consecuencia, una versión de la secuencia de ADN tratada con bisulfito mostrada en la SEQ ID NO: 1, es una secuencia en la que todas las citosinas se reemplazan por uracilo, excepto la citosina metilada de un dinucleótido CpG.

En esta realización específica, la etapa a) consiste en determinar la presencia de una guanina (G) en la posición 746; la presencia de una timina (T) en la posición 1114; y/o la presencia de una guanina (G) en la posición 1124; de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 después de tratarse con bisulfito.

En una realización más preferida, las etapas a) y b) se realizan en el mismo ADN tratado con bisulfito obtenido de una sola muestra biológica. Por tanto, la invención proporciona un método eficaz, rápido y rentable para la vigilancia,

el diagnóstico y la exploración de un cáncer de vejiga, o riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga, en un sujeto.

En esta realización específica, la etapa a) es una etapa de detección de una mutación en el gen FRGF3 de la siguiente manera:

5

| Mutación a detectar (por referencia a la SEQ ID NO: 2) | Mutación a detectar por referencia a la SEQ ID NO: 1 sin ningún tratamiento con bisulfito | Mutación a detectar por referencia a la SEQ ID NO: 1 después de un tratamiento con bisulfito |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ser249Cys                                              | TCC $\Rightarrow$ TGC                                                                     | TTT $\Rightarrow$ TGT                                                                        |
| Gly372Cys                                              | GGC $\Rightarrow$ TGC                                                                     | GGT $\Rightarrow$ TGT                                                                        |
| Tyr 375Cys                                             | TAT $\Rightarrow$ TGT                                                                     | TAT $\Rightarrow$ TGT                                                                        |

En una realización preferida, el método de la invención comprende, después de la etapa b), una etapa b') adicional, que consiste en comparar el grado de metilación medido en la etapa b) con un valor umbral, donde dicho valor umbral discrimina entre pacientes que padecen, o corren el riesgo de desarrollar, un cáncer de vejiga y pacientes que no padecen cáncer de vejiga.

10

En algunas realizaciones, el grado de metilación de al menos una citosina se compara con el grado de metilación de un locus de control. En algunas realizaciones, el locus de control es un control endógeno. En algunas realizaciones, el locus de control es un control exógeno. Normalmente, dicho locus de control se encuentra en un gen constitutivo.

15

Como se usa en el presente documento, un **"valor umbral que discrimina entre pacientes que padecen, o corren el riesgo de desarrollar, un cáncer de vejiga y pacientes que no padecen cáncer de vejiga"** se refiere a un valor o a un intervalo de valores de una medida particular que puede utilizarse para discriminar entre muestras de personas que tienen cáncer de vejiga y muestras de personas que no tienen dicho cáncer. En el mejor de los casos, hay un valor o valores umbral que discriminan completamente entre los dos grupos (es decir, los valores del grupo de personas que tiene la enfermedad siempre están en un lado (por ejemplo, más alto) del valor umbral y los valores del grupo de personas sanas, que no tienen la enfermedad, están en el otro lado (por ejemplo, más bajo) del valor umbral). Normalmente, dicho valor umbral se obtiene empíricamente.

20

Preferentemente, la etapa b) se realiza mediante PCR específica de metilación (MSP, *methylation-specific PCR*) en modo multiplex (MSPM, *methylation-specific PCR multiplex*). La ventaja principal de la MSPM es que disminuye el número de PCR necesario en relación con el modo monoplex. Por tanto, el modo multiplex ofrece un ahorro de tiempo, ya que es más rápido que varios monoplex y desde el punto de vista económico resulta ventajoso.

25

**"PCR multiplex"** significa una forma de PCR, generalmente PCR cuantitativa, que permite la amplificación simultánea de varias dianas de interés en una sola etapa, utilizando uno o más cebadores específicos. Esta técnica es muy ventajosa para determinar la presencia de delecciones, mutaciones, polimorfismos o hipermetilaciones de varios marcadores.

30

Por el contrario, la expresión **"PCR monoplex"** se refiere a una forma de PCR, generalmente una PCR cuantitativa, que permite la amplificación de una sola diana de interés.

35

**"PCR específica de metilación"** o **"MSP"** se refieren a una técnica para medir el grado de metilación de un gen. Esta técnica se basa en el principio de la PCR cuantitativa. Normalmente, esta técnica se basa en el tratamiento de la muestra de ADN que se investigará con bisulfito de sodio. Este tratamiento hace posible transformar cada una de las citosinas no metiladas en uracilos en el ADN tratado. La muestra así tratada se somete luego a una PCR con cebadores específicos para los genes a tratar. La determinación de la naturaleza de los cebadores específicos depende de la secuencia de nucleótidos que se va a amplificar. En el contexto de la presente invención, la PCR específica de metilación se emplea preferentemente en modo multiplex, y por tanto se denomina PCR específica de metilación en modo multiplex, o MSPM.

40

45

Para determinar el grado de metilación de los genes diana mediante MSP, los inventores modificaron los ADN mediante el kit de metilación EZ DNA (Zymo Research) o con el kit Epitect bisulfito (Qiagen) para que fuesen compatibles con los rendimientos de la QM-MSP.

50

De manera más específica, para la QM-MSP, utilizaron Tecnología TaqMan. Dicho método se adapta a los fines de la invención, ya que puede determinar con precisión el porcentaje de copias metiladas de cada gen diana en una sola PCR.

Normalmente, las sondas TaqMan-MGB comprenden:

55

- un fluoróforo en el extremo 5', tal como 6FAM, VIC, TET, NED, y
- un inactivador acoplado en el extremo 3' a la molécula MGB (*Minor Groove Binder*, aglutinante del surco menor)

no fluorescente.

El MGB permite que la molécula se inserte por sí misma en la doble hélice de ADN para aumentar la especificidad de la hibridación. Normalmente, los cebadores y las sondas TaqMan-MGB se generan teniendo en cuenta la modificación del ADN por tratamiento con bisulfito de sodio. Por tanto, para amplificar solo los alelos metilados, deben diseñarse los cebadores y las sondas de los genes diana que contienen sitios CpG.

Normalmente, el gen constitutivo (albúmina,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -globina) se utiliza para normalizar las cantidades de ADN utilizando un conjunto de cebadores/sondas que no contienen sitios CpG.

Normalmente, las secuencias diana para la amplificación tienen un tamaño de aproximadamente 100 bases.

El grado de metilación se calcula mediante las técnicas de cuantificación que son muy conocidas por un experto en la materia. Esta cuantificación puede ser absoluta o relativa. Preferentemente, se calcula mediante la técnica denominada  $\Delta\Delta Ct$ . Este método emplea una fórmula aritmética para expresar el grado de metilación de un gen diana, normalizándolo con un gen de referencia. En primer lugar, se determinan las diferencias  $\Delta Ct$  entre los valores de  $Ct$  del gen diana y del gen de referencia, para la muestra que se va a analizar y el ADN estándar. Normalmente, el ADN estándar es un ADN globalmente metilado. Permite la normalización de los grados de metilación de los genes. Por ejemplo, la empresa Zymo Research, comercializa un ADN de este tipo con la referencia comercial D5011. Después de la modificación utilizando un kit adecuado, tal como el kit comercial EZ de metilación de ADN (ref. D5002, Zymo Research), este ADN estándar se utiliza como referencia.

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct(\text{diana}_{\text{muestra}}) - Ct(\text{referencia}_{\text{muestra}})$$

$$\Delta Ct_{\text{estándar}} = Ct(\text{diana}_{\text{estándar}}) - Ct(\text{referencia}_{\text{estándar}})$$

Después, se calcula el valor de  $\Delta\Delta Ct$  entre el estándar y la muestra:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{estándar}} - \Delta Ct_{\text{muestra}}$$

El método de cálculo de los valores de  $\Delta\Delta Ct$  supone que las eficacias de la amplificación por PCR de los 2 genes son iguales al 100 %. Por tanto, en otras palabras, este método de cálculo supone que la concentración de productos se duplica en cada ciclo de la fase exponencial de la PCR. Por lo tanto, de esto se deduce que el grado normalizado de metilación de un gen diana está determinado por la fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{(Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{referencia}})_{\text{estándar}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{referencia}})_{\text{muestra}}}$$

Este método proporciona un grado relativo de metilación en función del control positivo utilizado (ADN estándar). Por otra parte, tiene en cuenta las variaciones en el número de copias del gen de referencia utilizado. Estas variaciones se deben necesariamente a las variaciones en la cantidad de ADN que se utilizó para llevar a cabo la PCR. Por tanto, los resultados no están distorsionados por la naturaleza del gen de referencia. Preferentemente, el gen de referencia es un gen constitutivo. Más preferentemente, es el gen de la albúmina o un fragmento del mismo.

Preferentemente, la etapa b) del método de la invención comprende la medición simultánea de los grados de metilación:

- de los genes de SEPTINA9, SLIT2 y albúmina o fragmentos de los mismos,
- de los genes de SEPTINA, SLIT 2 o fragmentos de los mismos,
- de los genes de SEPTINA9 y albúmina o fragmentos de los mismos,
- de los genes de SLIT2 y albúmina o fragmentos de los mismos,
- de los genes de TWIST1, HS3ST2 y albúmina o fragmentos de los mismos,
- de los genes de TWIST1 y HS3ST2 o fragmentos de los mismos,
- de los genes de TWIST1 y albúmina o fragmentos de los mismos,
- de los genes de HS3ST2 y albúmina o fragmentos de los mismos.

Más preferentemente, la etapa b) del método de la invención comprende la medición simultánea de los grados de metilación de todos los genes de SEPTINA9, SLIT2, TWIST1 y HS3ST2 o fragmentos de los mismos. Más preferentemente, dichos fragmentos son las SEQ ID NO: 3, 4, 5 y 6.

Normalmente, para determinar el grado de metilación, pueden utilizarse los cebadores directos e inversos y las sondas que se han definido anteriormente. Los sitios de metilación se indican subrayados y en negrita.



Tabla 2: Cebadores y sondas para medir el grado de metilación de los genes diana de la invención

| Detección de metilación | Nombre  | SEQ ID NO |                                                       | Número de sitios CgG diana |
|-------------------------|---------|-----------|-------------------------------------------------------|----------------------------|
| SEPTINA9                | Directo | 16        | 5' TTT TTT <b>CGT CGT</b> TGT TTT <b>TCG C</b> 3'     | 4                          |
|                         | Inverso | 17        | 5' ATC <b>CGA</b> AAT AAT CCC ATC CAA CTA C 3'        | 1                          |
|                         | Sonda   | 18        | 5' FL- ATT ATG <b>TCG</b> GAT TTC <b>GC</b> 3'-MGB    | 3                          |
| SLIT2                   | Directo | 19        | 5' TAG TTT <b>CGT CGG</b> GTA TTG GGT TT 3'           | 2                          |
|                         | Inverso | 20        | 5' <b>TCG CCG</b> ACA CTA AAA ACT TTC TTT AA 3'       | 2                          |
|                         | Sonda   | 21        | 5' FL- AGA TAT TGC <b>GCG</b> GTT TT 3'-MGB           | 2                          |
| TWIST1                  | Directo | 22        | 5' GAC GGT GTG GAT GGT TTC <b>GA</b> 3'               | 2                          |
|                         | Inverso | 23        | 5' ACT CTA CAA CAC CGA CAC CGT TTC 3'                 | 2                          |
|                         | Sonda   | 24        | 5' FL- AGC <b>GTT TAA CGG</b> TTG GAC 3'-MGB          | 3                          |
| HS3ST2                  | Directo | 25        | 5' <b>GCG CGG</b> GGT TAT TTT AGT <b>CG</b> 3'        | 3                          |
|                         | Inverso | 26        | 5' CAA ATC <b>GTC GCA</b> ACA ACA CAA A 3'            | 2                          |
|                         | Sonda   | 27        | 5' FL- <b>CGT</b> AAA AAC <b>GAA</b> AAA CAA C 3'-MGB | 2                          |
| DDR1                    | Directo | 28        | 5' AGG TTT GTT TTG AGG ATT TTT GAG TTT 3'             | 0                          |
|                         | Inverso | 29        | 5' CCT TCT CCT CTC AAT TCC TCT CTC TAA 3'             | 0                          |
|                         | Sonda   | 30        | 5' <b>CGT</b> TTG GAT TTT <b>CGG</b> GTT T 3'-MGB     | 2                          |

El método de la invención muestra resultados inesperados con respecto a la sensibilidad y la especificidad del método para diagnosticar cáncer de vejiga.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "**positivo verdadero**" o "**PV**" se refiere a un paciente que padece la enfermedad diana y cuyo resultado de la prueba es positivo.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "**positivo falso**" o "**PF**" se refiere a un paciente que no padece la enfermedad diana pero cuyo resultado de la prueba es positivo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**negativo verdadero**" o "**NV**" se refiere a un paciente que padece la enfermedad diana pero cuyo resultado de la prueba es negativo.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "**negativo falso**" o "**NF**" se refiere a un paciente que padece la enfermedad diana pero cuyo resultado de la prueba es negativo.

Cuando se evalúa la eficacia de un método de diagnóstico para una enfermedad diana, se determina la sensibilidad y especificidad de la prueba.

20 La sensibilidad y la especificidad de una prueba cuantitativa dependen del valor de corte por encima o por debajo del cual la prueba ha dado un valor positivo.

Como se usa en el presente documento, el término "**sensibilidad**" se refiere a la capacidad de un método de diagnóstico para identificar correctamente a los pacientes que padecen la enfermedad diana.

La sensibilidad de un método de diagnóstico se determina de la siguiente manera:

$$25 \quad \text{Sensibilidad} = (\text{PV})/(\text{PV}+\text{NF})$$

Como se usa en el presente documento, el término "**especificidad**" se refiere a la capacidad de un método de diagnóstico para identificar correctamente a los pacientes que no padecen la enfermedad diana.

30 La especificidad de un método de diagnóstico se determina de la siguiente manera:

$$\text{Especificidad} = (\text{NV})/(\text{NV}+\text{PF})$$

35 En algunas realizaciones, los valores umbral proporcionan una sensibilidad y especificidad específicas para la detección de un cáncer de vejiga. Normalmente, el valor umbral permite al menos un 50 %, 60 %, 70 % u 80 % de sensibilidad y especificidad para la detección de un cáncer de vejiga en un sujeto.

Los inventores han demostrado que la combinación de dos ensayos con el objetivo de:

- por un lado, identificar mutaciones específicas de FGFR3, y
- 40 - por otro lado, medir el grado de metilación de genes de interés específicos

proporcionar un método preciso para diagnosticar el cáncer de vejiga, mostrando una alta especificidad, así como una alta sensibilidad.

La selección de una especificidad y sensibilidad específicas depende del valor umbral elegido.

5 Normalmente, los valores umbral se expresan como índice de metilación acumulativa (IMA), que consiste en la suma de uno, dos, tres y cuatro valores de metilación para cada muestra analizada.

Normalmente, dicho umbral se obtiene sumando los valores de metilación de los cuatro genes mencionados (índice de metilación acumulativa o IMA) y se utiliza en un algoritmo que selecciona al paciente como positivo si la mutación está presente o si la mutación no está presente y el valor de IMA es más alto que un umbral dado, obteniendo así la combinación deseada de valores de sensibilidad/especificidad/umbral IMA. Dichas combinaciones se desvelan en la tabla 5.

Normalmente, el valor umbral está comprendido entre 1 y 54 IMA, preferentemente dicho umbral se selecciona en la tabla 5 a continuación:

**Tabla 5: Combinación de sensibilidad/especificidad/umbral IMA**

| Umbral (IMA) | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|--------------|--------------|---------------|--------------------------|
| 1,39         | 91           | 70            | Exploración              |
| 1,61         | 89           | 75            |                          |
| 2,38         | 85           | 80            |                          |
| 3,53         | 85           | 85            |                          |
| 5,05         | 83           | 90            |                          |
| 10,17        | 83           | 95            |                          |
| 12,52        | 83           | 98            |                          |
| 22,27        | 78           | 100           |                          |
| 53,99        | 70           | 100           | Vigilancia y Diagnóstico |
| 16,12        | 80           | 99            |                          |
| 3,53         | 85           | 85            |                          |
| 1,59         | 90           | 74            |                          |
| 0,98         | 95           | 64            |                          |
| 0,96         | 98           | 64            |                          |
| 0,44         | 98           | 50            |                          |

La tabla anterior proporciona información valiosa sobre la especificidad y la sensibilidad de la prueba de la invención, dependiendo del umbral elegido.

El experto en la materia sabría cómo elegir el valor umbral, dependiendo de la aplicación diana, tal como la exploración o la vigilancia y el diagnóstico.

#### **Medición del nivel de expresión de un gen**

En una realización, el método de la invención comprende además una etapa c) de medición del nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en BCLA-4, BCAR-1. Preferentemente, el método comprende además una etapa c') de comparación del nivel de expresión con el nivel de expresión obtenido en un sujeto sano o en un sujeto que superó cáncer de vejiga.

BLCA-4 se desvela en la publicación de Van Le et al., Functional Characterization of the Bladder Cancer Marker, BLCA-4, Clinical Cancer Research, vol.10, 1384-1391, 15 de febrero de 2004.

BCAR-1 se refiere al gen de la proteína 1 de resistencia antiestrógeno del cáncer de mama. Se dispone de varias isoformas de dicha proteína. Como se usa en el presente documento, BCAR-1 se refiere a una cualquiera de las siguientes proteínas:

- Isoforma 1: disponible con el número de registro NP\_001164185.1;
- Isoforma 2: disponible con el número de registro NP\_001164186.1;
- Isoforma 3: disponible con el número de registro NP\_001164187.1;
- Isoforma 4: disponible con el número de registro NP\_001164188.1;
- Isoforma 5: disponible con el número de registro NP\_001164189.1;
- Isoforma 6: disponible con el número de registro NP\_055382.2;
- Isoforma 7: disponible con el número de registro NP\_001164190.1;
- Isoforma 8: disponible con el número de registro NP\_001164191.1; e
- Isoforma 9: disponible con el número de registro NP\_001164192.1.

En una realización, la etapa c) de medición del nivel de expresión de dicho gen o genes es una etapa de medición del nivel de expresión de los productos de traducción de dicho gen o genes, preferentemente proteínas.

5 Para medir la cantidad de proteína en una muestra biológica pueden utilizarse técnicas de inmunodiagnóstico estándar, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o de tipo sándwich. En dichas realizaciones, las células cancerosas se purifican de la muestra biológica aislada. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados con enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación.

10 Las reacciones generalmente incluyen marcadores reveladores tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, enzimáticos o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos con los que reacciona.

15 Más preferentemente, puede utilizarse un método ELISA, donde los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos contra la proteína diana de la invención. Las células cancerosas de la muestra biológica que se sospecha que contiene una proteína diana, se añaden después a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, las placas pueden lavarse para retirar los residuos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de manera detectable. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora  
20 capturada en la muestra, se lava la placa, y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria utilizando métodos bien conocidos en la materia.

25 Se dispone de un kit Elisa BLCA-4 de ser humano y lo comercializa la compañía CUSABIO. Por lo tanto, la etapa c) de medición del nivel de expresión de BLCA-4 puede realizarse mediante un ensayo ELISA, más preferentemente con el kit de CUSABIO. Preferentemente, la etapa c) de medición del nivel de expresión de dicho gen o genes, es una etapa de medición del nivel de expresión de productos de traducción por ELISA de un gen seleccionado del grupo que consiste en BCLA-4, BCAR-1.

30 En una realización particular, los métodos de la invención comprenden poner en contacto las células cancerosas de la muestra biológica con un compañero de unión capaz de interactuar de manera selectiva con al menos una de las proteínas codificadas por uno de los genes seleccionados entre BCLA-4, BCAR-1 presentes en la muestra biológica. El compañero de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. En otra realización, el compañero de unión puede ser un aptámero.

35 En una realización preferida, el método de la invención comprende, además de la etapa c), una etapa c') de comparación del perfil de expresión obtenido en la etapa c) sin valor o valores de corte.

40 Como alternativa, el método de la invención comprende, además de la etapa c), una etapa c'') de comparación del perfil de expresión obtenido en la etapa c) con el perfil de expresión de dicho gen o genes obtenido para al menos un control seleccionado del grupo que consiste en un control positivo y un control negativo.

Esta etapa de comparación del perfil de expresión obtenido en la etapa c) con un **valor de corte** o con los perfiles de expresión de un control, es útil para identificar sujetos que presentan cáncer de vejiga.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "**perfil de expresión**" se refiere a la expresión cuantitativa y cualitativa de uno o más genes en una muestra. El perfil de expresión de un solo gen corresponde al nivel de expresión de dicho gen. El perfil de expresión es un depósito de los datos de nivel de expresión que pueden utilizarse para comparar los niveles de expresión de diferentes genes, en cualquier unidad que se elija. El término "perfil" también pretende abarcar manipulaciones de los datos de nivel de expresión procedentes de una célula,  
50 tejido o individuo. Por ejemplo, una vez que se determinan los niveles de expresión relativos para un conjunto determinado de genes, los niveles de expresión relativos para esa célula, tejido o individuo, pueden compararse con los de un estándar para determinar si los niveles de expresión son más altos o más bajos en relación con los mismos genes en un estándar. Los estándares pueden incluir cualquier dato que un experto en la materia considere relevante para la comparación, por ejemplo, un valor umbral o un perfil de expresión determinado de un control  
55 positivo y/o negativo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**comparar el perfil de expresión**" en todas sus formas gramaticales, se refiere a la evaluación de la diferencia cuantitativa y/o cualitativa en la expresión de un gen. Normalmente, el experto en la materia puede comparar el nivel de expresión de un gen con un **valor de corte**.

60 Normalmente, un "**valor de corte**" puede determinarse experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocerán los expertos en la materia. Preferentemente, el experto en la materia puede comparar el perfil de expresión de un gen dado de acuerdo con la invención con un **valor de corte** para dicho gen. Para  
65 comparar cada gen con un **valor de corte**, el experto en la materia comparará el nivel de expresión de dicho gen con un **valor de corte**.

En otra realización, le etapa c") es una etapa de comparación del perfil de expresión obtenido en la etapa c) con el perfil de expresión de al menos un control elegido en el grupo que consiste en un control positivo y un control negativo.

- 5 En esta realización particular, dicho control positivo es el perfil de expresión de un sujeto que padece cáncer de vejiga o de un sujeto que falleció por cáncer de vejiga.

Preferentemente, dicho control negativo es el perfil de expresión de un sujeto sano o de un sujeto que superó cáncer de vejiga.

10 El perfil de expresión del gen o genes de interés de la presente invención, se establece para dichos controles positivos y negativos. El experto en la materia puede así comparar el perfil de expresión del gen o los genes de interés en la muestra biológica de dicho sujeto con el perfil de expresión de un control positivo y/o negativo. Dicha comparación conducirá al experto en la materia a determinar el pronóstico de un sujeto.

### 15 **Métodos terapéuticos**

La divulgación se refiere a un método de tratamiento de un paciente que padece cáncer de vejiga que comprende las siguientes etapas:

- 20 1) predecir el pronóstico de un sujeto

25 a) detectando una mutación en el gen FGFR3 en una primera muestra biológica detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en mutaciones NM\_001163213.1 por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o detectando una mutación en el grupo que consiste en mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

30 b) midiendo el grado de metilación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos o variantes de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto; y después

35 2) si dicha etapa 1)a) muestra la presencia de una mutación y si la etapa 1)b) muestra una metilación de uno de dichos genes, entonces el método de la divulgación comprende una etapa 3) de proporcionar la terapia apropiada a dicho paciente.

Todas las características técnicas desveladas anteriormente son aplicables.

40 En el contexto de la divulgación, los términos "tratar" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, significan invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección, al que se aplica dicho término, o invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir uno o más síntomas del trastorno o afección, al que se aplica dicho término.

### **Kit según la invención**

45 La invención también se refiere al uso de un kit que comprende:

(i) al menos un cebador adecuado para detectar una mutación en el gen FGFR3 seleccionado entre las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

50 (ii) al menos un cebador y al menos una sonda para medir el grado de metilación de un gen seleccionado del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y un fragmento o variante de los mismos para realizar los métodos mencionados anteriormente.

Dicho kit comprende:

- 55 (a) al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8 a 13; y  
(b) al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 a 30.

Un kit de la divulgación comprende además:

60 (c) al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO 33 a 36.

Dicho kit es para el diagnóstico de cáncer de vejiga.

### **Descripción de las figuras**

65 **Figura 1:** Ilustración de la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa, en tiempo

real, multiplex, específica de Metilación (QM-MSP).

**Figura 2:** Detección de la mutación S249C en pacientes con cáncer de vejiga (+) frente a un individuo sin la mutación S249C (-).

**Figura 3:** Determinación de la especificidad y la sensibilidad del método de la invención utilizando curvas ROC.

**Figura 4:** Ilustración de la implementación de la PCR TaqMan competitiva específica de alelo (Cast-PCR, del inglés *competitive Allele-Specific TaqMan PCR*).

**Figura 5:** Ilustración de la implementación de sonda con tecnología de ácido nucleico bloqueado (LNA)

**Figura 6:** Ilustración de la implementación que combina la sonda de tecnología de ácido nucleico bloqueado (LNA) con un bloqueador de oligonucleótidos MGB que suprime el alelo de tipo silvestre

**Figura 7:** Ilustración de la implementación que combina QM-MSP con un bloqueador de oligonucleótidos MGB que suprime el alelo no metilado

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Evaluación de la sensibilidad y sensibilidad del método de diagnóstico y kits de la técnica anterior.

Actualmente, para diagnosticar el cáncer de vejiga, se comercializan varias pruebas autorizadas por la FDA. Dichas pruebas autorizadas incluyen:

- la prueba BTA TRAK de antígeno tumoral vesical (Polymedco, Cortlandt Manor, NY, EE.UU.),
- los ensayos con la proteína de la matriz nuclear (NMP, del inglés *nuclear matrix protein*) 22 y NMP22 BladderChek (Matritech, Newton, MA, Estados Unidos),
- la prueba de ImmunoCyt (Diagnocure Inc, ciudad de Quebec, Quebec, Canadá), y
- análisis de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridization*) (Urovysion Systems Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, EE. UU.) [16].

El ensayo BTA-TRAK es un ELISA estándar que mide cuantitativamente las cantidades en orina de una proteína relacionada con el factor H del complemento y el factor H del complemento. Se utiliza como ayuda en la atención médica del cáncer de vejiga en combinación con la cistoscopia.

El ensayo NMP-22 es un ELISA de tipo sándwich de microtitulación cuantitativa que utiliza dos anticuerpos, cada uno de los cuales reconoce un epítipo diferente del aparato mitótico nuclear. La FDA ha autorizado esta prueba para su uso como ayuda en el diagnóstico de pacientes con riesgo o con síntomas de cáncer de vejiga.

CYFRA 21-1 es un fragmento soluble de citoqueratina 19 que se mide mediante un ensayo inmunoradiométrico de tipo sándwich en fase sólida (Cis-Bio) o mediante un electroinmunoensayo quimioluminiscente (Roche Diagnostic).

Los telómeros son secuencias repetitivas que tapan los extremos de los cromosomas. Protegen los extremos cromosómicos y, por lo tanto, mantienen la estabilidad genómica. La actividad de la telomerasa se mide con el ensayo TRAP (del inglés *Telomere Repeat Amplification Protocol*, protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas, lo que implica la amplificación por PCR de productos de reacción de la telomerasa *in vitro*. La telomerasa no era sensible al grado, pero se obtuvieron resultados falsos positivos en casos de inflamación crónica o grave de la vejiga debido a la presencia de linfocitos.

ImmunoCyt. La inmunocitología se basa en la visualización de antígenos asociados a tumor en células de carcinoma urotelial utilizando anticuerpos monoclonales. ImmunoCyt es un ensayo inmunocitológico disponible en el comercio que utiliza anticuerpos monoclonales M344 y LDQ10 marcados con fluoresceína dirigidos contra la glucoproteína mucina sulfatada y un anticuerpo monoclonal 19A211 ligado a rojo de Texas contra formas glucosiladas de antígenos carcinoembrionarios de alto peso molecular para detectar células de cáncer de vejiga. El lento examen microscópico de los portaobjetos sigue siendo una desventaja y la reproducibilidad depende del citólogo.

Prueba UroVysion o ensayo fluorescente multicolor de hibridación *in situ* (FISH) multidiana. Los estudios citogenéticos revelan alteraciones frecuentes en muchos cromosomas. Las anomalías cromosómicas pueden detectarse mediante FISH. La prueba UroVysion es un ensayo fluorescente multicolor FISH multidiana que implica la tinción de células exfoliadas de muestras de orina con la sonda centromérica, fluorescente, desnaturalizada, de enumeración de cromosomas para los cromosomas 3, 7, 17, y la sonda identificadora específica de locus para el 9p21, y la observación de las células con un microscopio de fluorescencia. Basada en estudios de casos y controles y de cohortes, la prueba UroVysion parece ser una prueba prometedora para detectar el cáncer de vejiga. Puede tener una capacidad para detectar recidiva de tumor vesical antes de su detección clínica. Sin embargo, la prueba

también tiene baja sensibilidad para detectar tumores vesicales de grado bajo.

El ensayo de cáncer de vejiga CertNDx™ de Predictive Biosciences, ofrece una solución de control que analiza una muestra de orina para detectar la recidiva del cáncer de vejiga. La prueba utiliza una combinación de biomarcadores de ADN y proteínas.

Tomadas en conjunto, como se muestra en la tabla 6, estas pruebas carecen de precisión (la relación entre sensibilidad/especificidad es baja) de un marcador en el diagnóstico de cáncer de vejiga para impedir demasiados positivos falsos y negativos falsos. Estos resultados confirman por tanto que existe una necesidad no satisfecha de biomarcadores precisos adicionales. Por tanto, el desarrollo de biomarcadores diagnósticos no invasivos y precisos de la detección de tumores vesicales es imprescindible y crucial para mejorar el pronóstico, el diagnóstico y la exploración de tumor vesical.

**Tabla 6: Marcadores de tumor vesical además de citología.**

| Prueba/Marcador        | Técnica               | Empresa                                      | Sensibilidad (%)                                      | Especificidad (%) |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>Urotest</b>         | <b>qPCR multiplex</b> | <b>OncoDiag®</b>                             |                                                       |                   |
|                        |                       | Diagnóstico / Vigilancia                     | <b>98</b>                                             | <b>67</b>         |
|                        |                       | Exploración                                  | <b>80</b>                                             | <b>97</b>         |
| Hematuria*             | Tira reactiva         | Standard                                     | 1-5                                                   | 95                |
| Citotogia*             | Microscopía           | Standard                                     | 20                                                    | 90                |
| BTA-TRAK*              | Elisa                 | Polymedco Inc, EE.UU.                        | 57                                                    | 50                |
| NMP-22*                | Elisa                 | Matritech Inc, EE.UU.                        | 47                                                    | 55-80             |
| CYFRA 21-1*            | Elisa                 | Cis-Bio, Roche, Francia                      | 75                                                    | 67-71             |
| ensayo TRAP*           | PCR                   | Qbiogene, EE.UU.                             | 70                                                    | 60-70             |
| ImmunoCyt*             | Microscopía           | DiagnoCure Inc, Canadá                       | 38                                                    | 73-80             |
| UroVysion*             | FISH                  | Vysis/Abbott, EE.UU.                         | 68                                                    | 90                |
| Predictive Biosciences | Elisa+qPCR            | CertNDX para el control de recidivas, EE.UU. | 3 resultados posibles (negativo positivo, intermedio) |                   |

*Fuente: Grupo de consenso internacional sobre marcadores tumorales vesicales. Journal Urology, 2005.*

**Ejemplo 2: Desarrollo de una prueba basada en orina de un enfoque molecular que combina ensayos tanto genéticos como epigenéticos.**

#### **Diseño del estudio**

Durante la fase de prevalidación, se seleccionó una cantidad total de 153 muestras de orina, incluidos 107 controles y 48 pacientes con tumores vesicales superficiales iniciales (estadio histológico pTa y pT1). Un examen cistoscópico coincidió con la recogida de orina para el análisis molecular. Se realizó una resección transuretral de cada paciente con cáncer de vejiga. Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito.

#### **Recogida de orina y extracción de ADN**

Antes de la cistoscopia se recogió orina recién evacuada (100 ml) y se conservó a 4 °C hasta la preparación del ADN. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 10 minutos a 1 500 x g. Los sedimentos celulares se lavaron dos veces con PBS 10 ml, se resuspendieron en PBS 1 ml, se transfirieron a un microtubo (Eppendorf) y se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 1 500 x g. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular se conservó a -20 °C hasta el aislamiento del ADN. El ADN se extrajo utilizando el mini kit QiAamp DNA Blood (Qiagen) o el kit ZR DNA Urine (Zymo Research) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ADN se midió mediante fluorometría con reactivos de cuantificación Picogreen (Bioprobes; Interchim).

#### **Análisis de mutación de FGFR3**

En el cáncer de vejiga, se han descrito diez mutaciones de FGFR3 diferentes, pero 4 de ellas (S249C, Y373C, G370C y R248C), suponen el 95 % de los casos.

Por lo tanto estas mutaciones representan una excelente diana para ensayos, tales como PCR específica de alelo (AS-PCR), que depende de la detección específica de mutaciones puntuales.

Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf, Life technologies).

Preferentemente, la PCR se realizó en un volumen final de 10 µl que contenía 5 ng de ADN genómico, tampón de PCR 1X (tampón de *Taq* (*Thermus aquaticus*) polimerasa de Perkin-Elmer), 200 µM de cada uno de los desoxinucleósidos trifosfato, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,9 µl de dimetilsulfóxido, 2,5 U de *Taq* polimerasa de oro (Perkin-Elmer), y cebadores (directo e inverso) cada uno de ellos a una concentración de 200 nM.

En cada PCR multiplex, cada par incluye:

- un cebador directo etiquetado en 5' con un colorante fluorescente específico (6FAM, HEX y TET) y
- un cebador inverso que presenta un nucleótido modificado en 3' con tecnología de ácido nucleico bloqueado (LNA).

En ambas PCR (PCR1, PCR2), se incluyó el gen de la  $\beta$ -globina como control interno. Para cada par de cebadores, se utilizó un cebador fluorescente para marcar el producto de PCR. Todos los cebadores se obtuvieron en Applied Biosystems. Los productos de PCR se analizaron en un secuenciador de ADN capilar ABI PRISM 310 con el programa informático Genscan.

❖ La PCR1 detecta las mutaciones R248C, G372C, y la  $\beta$ -globina. Los cebadores utilizados son los siguientes:

- F1 directo/R2 inverso para detectar la mutación R248C,
- F2 directo/R3 inverso para detectar la mutación G372C,
- y FGLO directo/RGLO inverso para detectar la  $\beta$ -globina

❖ La PCR2 detecta las mutaciones R249C, Y375C, y la  $\beta$ -globina. Los cebadores utilizados son los siguientes:

- F1 directo/R1 inverso para la detección de R249C,
- F2 directo/R4 inverso para la detección de Y375C,
- y FGLO directo/RGLO inverso para detectar la  $\beta$ -globina.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

| Estadio | Temp  | Tiempo | Ciclos |
|---------|-------|--------|--------|
| 1       | 96 °C | 6 min  | 1      |
| 2       | 95 °C | 15 s   | 40     |
|         | 61 °C | 15 s   |        |
|         | 72 °C | 15 s   |        |
| 3       | 72 °C | 1 min  | 1      |

#### **Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa, en tiempo real, multiplex, específica de metilación (QM-MSP)**

Los inventores evaluaron la metilación del promotor de 18 genes que son importantes en la carcinogénesis y posiblemente en el cáncer de vejiga, como los genes COL1A2, DDR1, DIRAS3, DNASE1L1, EYA4, FASTK, HS3ST2, NPY, NTRK3, PENK, SEMA3B, SEPTINA5, SEPTINA9, SLIT2, SYNE1, TGFB, TWIST 1 y WIF1.

Los ADN se han modificado con el kit de metilación de ADN EZ (Zymo Research) o con el kit de bisulfito Epitect (Qiagen) para que sean compatibles con los aciertos de la QM-MSP.

Los inventores utilizaron la tecnología TaqMan para la QM-MSP. Dicha tecnología puede determinar con precisión el porcentaje de copias metiladas de cada diana génica en una sola PCR. Las sondas TaqMan-MGB comprenden:

- un fluoróforo, 6FAM, VIC, TET, NED por ejemplo, el extremo 5 y
- un inactivador acoplado en el extremo 3' a la molécula MGB (*Minor Groove Binder*) no fluorescente.

El MGB permite que la molécula se inserte por sí misma en la doble hélice de ADN para aumentar la especificidad de la hibridación.

Los cebadores y las sondas TaqMan-MGB se generaron teniendo en cuenta la modificación del ADN por tratamiento con bisulfito de sodio. Los cebadores y las sondas de genes diana que contienen sitios CpG se han diseñado para amplificar solo los alelos metilados. En la Figura 1 se indica un esquema de QM-MSP. El gen constitutivo (albúmina,  $\beta$ -actina,  $\beta$ -globina) se tuvo en cuenta para normalizar las cantidades de ADN utilizando un conjunto de cebador/sonda que no contenía sitios CpG.

Las secuencias diana para la amplificación tienen un tamaño de aproximadamente 100 bases. La concentración final de los cebadores debe ser 100 nM y 900 nM. La concentración de la sonda debe estar entre 100 nM y 300 nM. Preferentemente, se añade la solución de ADN modificado a una concentración final de 400 nmol de cada cebador (directo e inverso) y la concentración final de 250 nmol de la sonda TaqMan-MGB y solución de PCR 1X (Quantitect Multiplex-Qiagen o Kapa-Biosystems). El volumen de la reacción es de 20  $\mu$ l.

Perfil de termociclado:

• Utilizando Quantitect Multiplex (Qiagen):

| Estadio | Temp  | Tiempo | Ciclos | Recogida de datos |
|---------|-------|--------|--------|-------------------|
| 1       | 50 °C | 2 min  | 1      | No                |
| 2       | 95 °C | 15 min | 1      | No                |
| 3       | 95 °C | 15 s   | 48     | No                |
|         | 60 °C | 1 min  |        | FAM/VIC/NED/TET   |

5 • Utilizando la mezcla maestra de Kapa (Kapa Biosystems):

| Estadio | Temp  | Tiempo | Ciclos | Recogida de datos |
|---------|-------|--------|--------|-------------------|
| 1       | 95 °C | 10 min | 1      | No                |
| 2       | 95 °C | 15 s   | 48     | No                |
|         | 60 °C | 1 min  |        | FAM/VIC/NED/TET   |

### Secuencias y Oligonucleótidos

#### 10 1. Mutaciones de *FGFR3*

El nucleótido marcado en rojo es la base mutada.

El nucleótido marcado con un asterisco está modificado con tecnología LNA (ácido nucleico bloqueado).

15

❖ Para la mutación S249C (TCC → TGC)

Los cebadores utilizados son:

20

- F1 directo: SEQ ID NO: 8 etiquetada en 5' con 6FAM;
- R1 inverso: SEQ ID NO: 10 con guanina en la posición 19 modificada con tecnología LNA

❖ Mutación R248C (CGC → TGC)

25

Los cebadores utilizados son:

- F1 directo: SEQ ID NO: 8 etiquetada en 5' con 6FAM;
- R2 inverso: SEQ ID NO: 9 con citosina en la posición 19 modificada con tecnología LNA.

30

❖ Mutación G372C (GGC → TGC)

Los cebadores utilizados son:

35

- F2 directo: SEQ ID NO: 11 etiquetada en 5' con HEX;
- R3 inverso: SEQ ID NO: 12 con citosina en la posición 27 modificada con tecnología LNA.

❖ Mutación Y375C (TAT → TGT)

Los cebadores utilizados son:

40

- F2 directo: SEQ ID NO: 11 etiquetada en 5' con HEX
- R4 inverso: SEQ ID NO: 13 con citosina en la posición 25 modificada con tecnología LNA

#### 45 2. Mutaciones de *TERT*

Para detectar la mutación específica en el gen *TERT*, pueden utilizarse los siguientes cebadores:

- *TERT* directo: 5' CCC TTC ACC TTC CAG CTC 3' 5 (SEQ ID NO: 33)
- *TERT* inverso: 5' AGC GCT GCC TGA AAC TCG 3' (SEQ ID NO: 34)

50

Para detectar la mutación 77C → T, por referencia a la SEQ ID NO: 32, puede utilizarse la sonda 5' FAM/VIC-



CCCGGAAGGGGCT-MGB 3'

Para detectar la mutación 99C→T, por referencia a la SEQ ID NO: 32, puede utilizarse la sonda 5' FAM/VIC-CCCGGAAGGGGTC-MGB 3'

5

### 3. Subunidad beta de hemoglobina = gen constitutivo

El fragmento de la subunidad beta de hemoglobina se muestra en la SEQ ID NO: 31.

10 También pueden utilizarse los siguientes cebadores:

- FGLO directo: SEQ ID NO: 14; y
- RGLO inverso: SEQ ID NO: 15.

### 15 PCR cuantitativa, multiplex, específica de metilación

El ADN genómico se transforma por tratamiento con bisulfito.

20 Las sondas están diseñadas de tal manera que 6FAM o VIC o TET o NED se incorporan como fluoróforo (FL) en el extremo 5' y la molécula MGB se incorpora en el extremo 3'.

La citosina de los dinucleótidos CpG que están metilados se indica en negrita y subrayada.

❖ SEPTINA 9: SEQ ID NO: 3

25

5'TTTTTTCGTCGTTGTTTTTCGCGCGATTCGTTGTTTATTAGTTATTATGTCG  
GATTTCGCGGTTAACCGCGTAGTTGGATGGGATTATTTCGGAT 3'

Los inventores utilizaron las SEQ ID NO: 16, 17 y 18 respectivamente como cebador directo, cebador inverso y sonda.

30

❖ SLIT2: SEQ ID NO: 4

5'TAGTTTCGTCGGGTATTGGGTTTTAGATATTGCGCGGTTTTTTCGGAGTAG  
TAAGTTAAAGAAAGTTTTTAGTGTCGGCGA 3'

35 Los inventores utilizaron las SEQ ID NO: 19, 20 y 21 respectivamente como cebador directo, cebador inverso y sonda.

❖ TWIST1: SEQ ID NO: 5

5'GACCGGTGTGGATGGTTTCGAGGTTTAAAAAGAAAGCGTTTAACGGTTGG  
ACGTTATATTTCGTTAGGTTTTTTGGAAACCGGTGTCGGTGTTGTAGAGT 3'

40

Los inventores utilizaron las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 respectivamente como cebador directo, cebador inverso y sonda.

45 ❖ HS3ST2: SEQ ID NO: 6

5'GCGCGGGGGTATTTTAGTCGCGGAGGGCGCGTAGGTTGTTTTTCGTTTTTT  
ACGTTTTTTCGTTTTTTTTGTATTTATTTGTGTTATAGTTTTTTGTGTTGTTGCGA  
CGATTTG 3'

Los inventores utilizaron las SEQ ID NO: 25, 26 y 27 respectivamente como cebador directo, cebador inverso y

sonda.

❖ DDR1: SEQ ID NO: 7

5'AGGTTTGTTTTGAGGATTTTGTAGTTTTTTTTTTATTTATTTCGTTGGGAG  
TTTAGGGGAATTAGGGTTTGGGCGTTTGGATTTTCGGGTTTTTTAGAACCGTT  
TTTTAGAGAGAGGAATTGAGAGGAGAAGG3'

5 Los inventores utilizaron las SEQ ID NO: 28, 29 y 30 respectivamente como cebador directo, cebador inverso y sonda

## Resultados

10 ***Detección de mutaciones de FGFR3, utilizando tecnología AS-PCR, para identificar pacientes con cáncer de vejiga***

15 La detección de una mutación de FGFR3 conduce a la presencia de un pico específico. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis capilar.

Los resultados se muestran en la Figura 2: búsqueda de la detección de la mutación S249C en pacientes con cáncer de vejiga (+) frente a un individuo sin la mutación S249C (-).

20 Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

**Tabla 7: Detección de mutaciones de FGFR3**

| DETECCIÓN DE MUTACIONES DE FGFR3 | SENSIBILIDAD          | ESPECIFICIDAD   |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| <b>S249C</b>                     | 27,1 % (13/48)        | 100 % (107/107) |
| <b>Y375C</b>                     | 10,5 % (5/48)         |                 |
| <b>G372C</b>                     | 2,0 % (1/48)          |                 |
| <b>R248C</b>                     | 2,0 % (1/48)          |                 |
| <b>Todas las mutaciones</b>      | <b>41,6 % (20/48)</b> |                 |

25 Puede observarse que el 42 % (sensibilidad) de 48 pacientes con cáncer de vejiga tiene al menos una mutación. Ninguno de los sujetos de control (n = 107) ha mostrado mutaciones (especificidad del 100 %).

## ***Eficacia y especificidad de la PCR cuantitativa, multiplex, específica de metilación (QM-MSP)***

30 Los inventores evaluaron el funcionamiento de la QM-MSP para cuantificar los niveles de metilación de 18 genes preseleccionados. Con el fin de amplificar conjuntamente tres dianas de ADN específicas de metilación en tiempo real (triple), se utilizaron las asociaciones de sondas de fluoróforos Fam, Vic y Ned, ya que cada sonda presenta una intensidad espectral individual fuerte con espectros de absorción superpuestos limitados. Hemos demostrado que nuestra QM-MSP en modo triple (GC1+GC2+GC3) permite la amplificación conjunta de tres genes con una eficacia de amplificación muy alta, próxima al 100 % con una pendiente.  $\approx 3, 32$ . La especificidad de los pares de cebadores se evaluó mediante secuenciación del amplicón (datos no mostrados). Esto confirma el tamaño del amplicón y la identidad de los genes.

## ***Validación de la PCR cuantitativa, multiplex, específica de metilación (QM-MSP) en la orina, para la detección de cáncer de vejiga***

40 Los inventores evaluaron cada uno de los 18 genes preseleccionados. Como molde para la QM-MSP, se utilizó una cantidad de aproximadamente 10 ng de ADN (estándar o muestras).

45 Los inventores seleccionaron cuatro genes hipermetilados, los que presentan la mayor sensibilidad y especificidad, para la detección del cáncer de vejiga: **SEPTINA9, SLIT2, TWIST1 y HS3ST2**.

- la QM-MSP1 cuantifica, simultáneamente, el grado de metilación de SEPTINA9, SLIT2 y Albúmina (tres genes), o de SEPTINA9 y SLIT2 (dos genes) o de SEPTINA9 y Albúmina (dos genes) o de SLIT2 y Albúmina (dos genes).
- 50 - la QM-MSP2 cuantifica, simultáneamente, el grado de metilación de TWIST1, HS3ST2 y Albúmina (tres genes) o

de TWIST1 y HS3ST2 (dos genes) o de TWIST1 y Albúmina (dos genes) o de HS3ST2 y Albúmina (dos genes).

- 5 Los inventores combinaron además SEPTINA9, SLIT2, TWIST1 y HS3ST2. Para este fin, los inventores calcularon un índice de metilación acumulativa que consistía en la suma de uno, dos, tres y cuatro valores de metilación de cada muestra y se utilizó como un umbral variable para construir una curva ROC (del inglés *Receiver Operating Characteristic*, curva de eficacia diagnóstica). Las especificidades y las sensibilidades se muestran en la Tabla 8 (un gen), 9 (combinación de dos genes), 10 (combinación de tres genes) y 11 (combinación de cuatro genes).

**Tabla 8: Especificidades y sensibilidades con un gen metilado**

| mutación de FGFR3 | 1 diana metilada | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|-------------------|------------------|--------------|---------------|--------------------------|
|                   | HS3ST2           | 67           | >90           | Exploración              |
|                   |                  | 52           | >97           |                          |
|                   |                  | 48           | 100           |                          |
|                   | SEPTINA9         | 71           | >90           |                          |
|                   |                  | 58           | >97           |                          |
|                   |                  | 38           | 100           |                          |
|                   | SLIT2            | 74           | >90           |                          |
|                   |                  | 71           | >97           |                          |
|                   |                  | 61           | 100           |                          |
|                   | TWIST1           | 71           | >90           |                          |
|                   |                  | 71           | >97           |                          |
|                   |                  | 58           | 100           |                          |
|                   | HS3ST2           | 78*          | 74            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                   | SEPTINA9         | 90*          | 62            |                          |
|                   | SLIT2            | 87*          | 41            |                          |
|                   | TWIST1           | 71*          | 97            |                          |

\* Máximo de sensibilidad

10

**Tabla 9: Especificidades y sensibilidades con dos genes metilados**

| mutación de FGFR3 | Combinación de 2 dianas metiladas | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|-------------------|-----------------------------------|--------------|---------------|--------------------------|
|                   | HS3ST2 + SEPTINA9                 | 73           | >90           | Exploración              |
|                   |                                   | 63           | >97           |                          |
|                   |                                   | 46           | 100           |                          |
|                   | HS3ST2 + SLIT2                    | 50           | >90           |                          |
|                   |                                   | 46           | >97           |                          |
|                   |                                   | 44           | 100           |                          |
|                   | HS3ST2 + TWIST1                   | 52           | >90           |                          |
|                   |                                   | 46           | >97           |                          |
|                   |                                   | 38           | 100           |                          |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2                  | 73           | >90           |                          |
|                   |                                   | 65           | >97           |                          |
|                   |                                   | 54           | 100           |                          |
|                   | SEPTINA9 + TWIST1                 | 73           | >90           |                          |
|                   |                                   | 65           | >97           |                          |
|                   |                                   | 42           | 100           |                          |
|                   | SLIT2 + TWIST1                    | 48           | >90           |                          |
|                   |                                   | 46           | >97           |                          |
|                   |                                   | 40           | 100           |                          |
|                   | HS3ST2 + SEPTINA9                 | >90          | 62            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                   |                                   | 94*          | 60            |                          |
|                   | HS3ST2 + SLIT2                    | 56*          | 34            |                          |
|                   | HS3ST2 + TWIST1                   | 54*          | 90            |                          |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2                  | >90          | 55            |                          |
|                   | SEPTINA9 + TWIST1                 | 94*          | 49            |                          |
|                   | SEPTINA9 + TWIST1                 | 90*          | 62            |                          |
|                   | SLIT2 + TWIST1                    | 56*          | 40            |                          |

\* Máximo de sensibilidad

**Tabla 10: Especificidades y sensibilidades con tres genes metilados**

| mutación de FGFR3 | combinación de 3 dianas metiladas | Sensibilidad               | Especificidad | Aplicación               |
|-------------------|-----------------------------------|----------------------------|---------------|--------------------------|
| -                 | SLIT2 + SEPTINA9 + HS3ST2         | 73                         | >90           | Exploración              |
|                   |                                   | 65                         | >97           |                          |
|                   |                                   | 58                         | 100           |                          |
|                   | HS3ST2 + SLIT2 + TWIST1           | 81                         | >90           |                          |
|                   |                                   | 71                         | >97           |                          |
|                   |                                   | 68                         | 100           |                          |
|                   | HS3ST2 + TWIST1 + SEPTINA9        | 73                         | >90           |                          |
|                   |                                   | 60                         | >97           |                          |
|                   |                                   | 48                         | 100           |                          |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1         | 73                         | >90           |                          |
|                   |                                   | 65                         | >97           |                          |
|                   |                                   | 56                         | 100           |                          |
|                   | SLIT2 + SEPTINA9 + HS3ST2         | >90                        | 64            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                   |                                   | 94*                        | 53            |                          |
|                   | HS3ST2 + SLIT2 + TWIST1           | 87*                        | 34            |                          |
|                   |                                   | HS3ST2 + TWIST1 + SEPTINA9 | >90           |                          |
|                   |                                   | 94*                        | 60            |                          |
|                   |                                   | SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1  | >90           |                          |
|                   |                                   | 94*                        | 48            |                          |
|                   | * Máximo de sensibilidad          |                            |               |                          |

**Tabla 11: Especificidades y sensibilidades con cuatro genes metilados**

| Combinación de 4 dianas metiladas  | mutación de FGFR3 | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|------------------------------------|-------------------|--------------|---------------|--------------------------|
| HS3ST2 + SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1 | -                 | 76           | >90           | Exploración              |
|                                    |                   | 65           | >97           |                          |
|                                    |                   | 61           | 100           |                          |
|                                    |                   | >90          | 66            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                                    |                   | 98*          | 53            |                          |
| * Máximo de sensibilidad           |                   |              |               |                          |

**5 El ensayo multiplex: detecciones de metilación y de mutaciones de FGFR3**

Con el objetivo de desarrollar una prueba de las más sensibles y más específicas, los inventores evaluaron la relevancia de la MSP en asociación con la detección de mutaciones de FGFR3. Los rendimientos de la prueba se dan de acuerdo con cada aplicación (diagnóstico, vigilancia de recidivas y exploración diana). Las especificidades y sensibilidades se muestran en las Tablas 12 (un gen), 13 (combinación de dos genes), 14 (combinación de tres genes) y 15 (combinación de cuatro genes).

**Tabla 12: Especificidades y sensibilidades con un gen metilado junto con la detección de mutaciones de FGFR3**

| mutación de FGFR3 | 1 diana metilada | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación  |
|-------------------|------------------|--------------|---------------|-------------|
| +                 | HS3ST2           | 85           | >90           | Exploración |
|                   |                  | 74           | >97           |             |
|                   |                  | 70           | 100           |             |
|                   | SEPTINA9         | 81           | >90           |             |
|                   |                  | 79           | >97           |             |
|                   |                  | 69           | 100           |             |
|                   | SLIT2            | 87           | >90           |             |
|                   |                  | 84           | >97           |             |
|                   |                  | 77           | 100           |             |
|                   | TWIST1           | 81           | >90           |             |
|                   |                  | 81           | >97           |             |
|                   |                  | 71           | 100           |             |
|                   | HS3ST2           | >90          | 74            |             |
|                   |                  | 93*          | 74            |             |

(continuación)

| mutación de FGFR3        | 1 diana metilada | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|--------------------------|------------------|--------------|---------------|--------------------------|
|                          | SEPTINA9         | >90          | 63*           | Vigilancia y Diagnóstico |
|                          |                  | 92           | 63            |                          |
|                          | SLIT2            | >90          | 87            |                          |
|                          |                  | 94*          | 83            |                          |
|                          | TWIST1           | 81*          | 98            |                          |
| * Máximo de sensibilidad |                  |              |               |                          |

**Tabla 13: Especificidades y sensibilidades con dos genes metilados junto con la detección de mutaciones de FGFR3**

| Mutación de FGFR3 | Combinación de 2 dianas metiladas | Sensibilidad   | Especificidad     | Aplicación  |                          |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|-------------------|-------------|--------------------------|
| +                 | HS3ST2 + SEPTINA9                 | 81<br>81<br>71 | >90<br>>97<br>100 | Exploración |                          |
|                   | HS3ST2 + SLIT2                    | 77<br>73<br>71 | >90<br>>97<br>100 |             |                          |
|                   | HS3ST2 + TWIST1                   | 77<br>73<br>67 | >90<br>>97<br>100 |             |                          |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2                  | 81<br>81<br>75 | >90<br>>97<br>100 |             |                          |
|                   | SEPTINA9 + TWIST1                 | 81<br>81<br>71 | >90<br>>97<br>100 |             |                          |
|                   | SLIT2 + TWIST1                    | 75<br>73<br>69 | >90<br>>97<br>100 |             |                          |
|                   | HS3ST2 + SEPTINA9                 | >90<br>96*     | 62<br>62          |             | Vigilancia y Diagnóstico |
|                   | HS3ST2 + SLIT2                    | 79*            | 84                |             |                          |
|                   | HS3ST2 + TWIST1                   | 79*            | 90                |             |                          |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2                  | >90<br>96*     | 61<br>49          |             |                          |
|                   | SEPTINA9 + TWIST1                 | >90<br>92*     | 63<br>63          |             |                          |
|                   | SLIT2 + TWIST1                    | 79*            | 80                |             |                          |
|                   | * Máximo de sensibilidad          |                |                   |             |                          |

**5 Tabla 14: Especificidades y sensibilidades con tres genes metilados junto con la detección de mutaciones de FGFR3**

| Mutación de FGFR3 | Combinación de 3 dianas metiladas | Sensibilidad   | Especificidad     | Aplicación  |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|-------------------|-------------|
| +                 | SLIT2 + SEPTINA9 + HS3ST2         | 81<br>81<br>77 | >90<br>>97<br>100 | Exploración |
|                   | HS3ST2 + SLIT2 + TWIST1           | 90<br>84<br>81 | >90<br>>97<br>100 |             |
|                   | HS3ST2 + TWIST1 + SEPTINA9        | 81<br>81<br>71 | >90<br>>97<br>100 |             |
|                   | SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1         | 81<br>81<br>77 | >90<br>>97<br>100 |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |
|                   |                                   |                |                   |             |

(continuación)

| Mutación de FGFR3        | Combinación de 3 dianas metiladas | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|--------------------------|-----------------------------------|--------------|---------------|--------------------------|
|                          | SLIT2 + SEPTINA9 + HS3ST2         | >90          | 66            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                          |                                   | 96*          | 64            |                          |
|                          | HS3ST2 + SLIT2 + TWIST1           | >90          | 94            |                          |
|                          |                                   | 94*          | 82            |                          |
|                          | HS3ST2 + TWIST1 + SEPTINA9        | >90          | 62            |                          |
|                          |                                   | 96*          | 62            |                          |
|                          | SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1         | >90          | 61            |                          |
|                          |                                   | 96*          | 48            |                          |
| * Máximo de sensibilidad |                                   |              |               |                          |

**Tabla 15: Especificidades y sensibilidades con cuatro genes metilados junto con la detección de mutaciones de FGFR3**

| Combinación de 4 dianas metiladas  |  | Mutación de FGFR3 |  | Sensibilidad |     | Aplicación               |  |
|------------------------------------|--|-------------------|--|--------------|-----|--------------------------|--|
| HS3ST2 + SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1 |  | +                 |  | 83           | >90 | Exploración              |  |
|                                    |  |                   |  | 83           | >97 |                          |  |
|                                    |  |                   |  | 78           | 100 |                          |  |
|                                    |  |                   |  | >90          | 74  | Vigilancia y Diagnóstico |  |
|                                    |  |                   |  | 98*          | 64  |                          |  |
| * Máximo de sensibilidad           |  |                   |  |              |     |                          |  |

- 5 Por ejemplo, se obtiene una sensibilidad del 98 % para la vigilancia de las recidivas (seguimiento) y el diagnóstico inicial de los sujetos sintomáticos (hematuria, trastornos urinarios) con una buena especificidad del 64 %. Se obtiene una especificidad del 97 % para la exploración (población en riesgo) con una alta sensibilidad del 83 % (Figura 3).

- 10 Los inventores demostraron que la combinación de ambos ensayos, basados en la detección de mutaciones de FGFR3 y en la cuantificación del grado de metilación de genes diana, hace que se obtenga mayor precisión en cuanto a sensibilidad y especificidad para la detección del cáncer de vejiga (Tabla 16).

**Tabla 16: Sensibilidad y especificidad de la combinación de la detección de mutaciones de FGFR3 y la cuantificación del grado de metilación de genes diana**

| Combinación de 4 dianas metiladas  | Mutación de FGFR3 | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|------------------------------------|-------------------|--------------|---------------|--------------------------|
| HS3ST2 + SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1 |                   | 76           | >90           | Exploración              |
|                                    |                   | 65           | >97           |                          |
|                                    |                   | 61           | 100           |                          |
|                                    | +                 | 83           | >90           |                          |
|                                    |                   | 83           | >97           |                          |
|                                    |                   | 78           | 100           |                          |
|                                    |                   | >90          | 66            | Vigilancia y Diagnóstico |
|                                    |                   | 98           | 53            |                          |
|                                    |                   | >90          | 74            |                          |
|                                    |                   | 98           | 64            |                          |

**Ejemplo 3: Correlación entre el valor umbral y la especificidad y sensibilidad.**

Los inventores han demostrado que el método de la invención es útil para:

- la vigilancia de recidivas, es decir, el seguimiento de pacientes ya diagnosticados que padecen cáncer de vejiga,
- el diagnóstico inicial de cáncer de vejiga en un paciente;
- la exploración, es decir, la identificación de una población en riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga.

Dependiendo del uso en cuestión del método de la invención, la sensibilidad y la especificidad deben ajustarse.

Dicho ajuste depende realmente del valor umbral específico elegido.

Por tanto, los inventores han demostrado que cambiando el valor umbral, cambia la sensibilidad y especificidad del

método de la invención.

Esto se resume en la tabla 17:

5 **Tabla 17 Influencia del valor umbral sobre la sensibilidad y especificidad de la combinación de la detección de mutaciones de FGFR3 y la cuantificación del grado de metilación de los genes diana**

| Combinación de 4 dianas metiladas  | Mutación de FGFR3 | Umbral (IMA) | Sensibilidad | Especificidad | Aplicación               |
|------------------------------------|-------------------|--------------|--------------|---------------|--------------------------|
| HS3ST2 + SEPTINA9 + SLIT2 + TWIST1 | +                 | 1,39         | 91           | 70            | Exploración              |
|                                    |                   | 1,61         | 89           | 75            |                          |
|                                    |                   | 2,38         | 85           | 80            |                          |
|                                    |                   | 3,53         | 85           | 85            |                          |
|                                    |                   | 5,05         | 83           | 90            |                          |
|                                    |                   | 10,17        | 83           | 95            |                          |
|                                    |                   | 12,52        | 83           | 98            |                          |
|                                    |                   | 22,27        | 78           | 100           | Vigilancia y Diagnóstico |
|                                    |                   | 53,99        | 70           | 100           |                          |
|                                    |                   | 16,12        | 80           | 99            |                          |
|                                    |                   | 3,53         | 85           | 85            |                          |
|                                    |                   | 1,59         | 90           | 74            |                          |
|                                    |                   | 0,98         | 95           | 64            |                          |
|                                    |                   | 0,96         | 98           | 64            |                          |
|                                    |                   | 0,44         | 98           | 50            |                          |

#### Ejemplo 4: Tecnologías alternativas

- 10 Los inventores demostraron además que existen métodos alternativos y eficaces para implementar el método de la invención.

##### 1. Tecnología de la PCR TaqMan competitiva específica de alelo (Cast-PCR)

- 15 La tecnología de la PCR TaqMan competitiva específica de alelo (CastPCR), se ha desarrollado inicialmente para la detección de mutaciones con una alta sensibilidad y especificidad. Los inventores diseñaron un par de cebadores y sondas para medir la metilación lo que permite llevar a cabo el método de Cast-PCR. Este método es muy específico y sensible para detectar y cuantificar mutaciones raras y alelos metilados en una muestra que contiene grandes cantidades de ADN genómico (ADNg), ADNg bruto para la detección de mutaciones o ADNg modificado por
- 20 tratamiento con bisulfito para medir la metilación.

La tecnología CastPCR combina qPCR TaqMan® específica de alelo con bloqueadores de MGB específicos de alelo para suprimir la amplificación inespecífica de alelos de tipo silvestre (no mutados, no metilados). Como molde para la PCR se utilizan 10 ng de ADNg. Los productos de amplificación tienen un tamaño de aproximadamente 100 bases.

25 La concentración final del bloqueador oligonucleotídico y de los cebadores debe estar entre 100 nM y 900 nM. La concentración de la sonda debe estar entre 100 nM y 300 nM. La solución de PCR utilizada es preferentemente la mezcla maestra de genotipado TaqMan (Life Technologies). El volumen de la reacción es de 20 µl. En la figura 4 se muestra un esquema de Cast-PCR.

- 30 El perfil de termociclado es el siguiente:

| Estadio | Temp  | Tiempo | Ciclos | Recogida de datos |
|---------|-------|--------|--------|-------------------|
| 1       | 95 °C | 10 min | 1      | No                |
| 2       | 92 °C | 15 s   | 5      | No                |
|         | 58 °C | 1 min  |        | No                |
| 3       | 92 °C | 15 s   | 40     | No                |
|         | 60 °C | 1 min  |        | FAM/VIC/NED/TET   |

##### 2. El ensayo de sonda con LNA (ácido nucleico bloqueado)

- 35 El ensayo de sonda con LNA (ácido nucleico bloqueado) lo desarrolló Exiqon® (Vedbaek, Dinamarca). LNA® cambia la conformación de la hélice y aumenta la estabilidad del dúplex. La integración de bases LNA® en sondas oligonucleotídicas con doble colorante (6FAM, HEX, TET) abre grandes oportunidades para mejorar las técnicas que requieren sondas de alta afinidad lo más específicas posible, como detección de mutaciones o metilación. Como molde para la PCR se utilizan 10 ng de ADNg. Los productos de amplificación tienen un tamaño de

aproximadamente 100 bases. La concentración final de los cebadores debe estar entre 100 nM y 900 nM. La concentración de la sonda debe estar entre 100 nM y 300 nM. Las soluciones de PCR utilizadas son preferentemente Quantitect Multiplex (Qiagen) o Kapa (Biosystems). El volumen de la reacción es de 20 µl. En la Figura 5 se muestra un esquema de sonda LNA.

### 3. Tecnología de Micromatrices

La tecnología de micromatrices es una herramienta poderosa para la investigación genética y clínica. Resumiendo, utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y avances en tecnología informática. La micromatriz es un dispositivo compacto que contiene la secuencia de captura inmovilizada bien definida (oligonucleótido) ensamblada en un formato localizable (es decir, Agilent, Affymetrix). Los oligonucleótidos están unidos a una superficie de vidrio o plástico. La micromatriz, diseñada por OncoDiag, se utilizará para identificar simultáneamente los puntos de mutación de los genes FGFR3 y *TERT* y el sitio CpG con citosina metilada de cada uno de los genes diana (SEPTINA9, SLIT2, TWIST1, HS3ST2, DDR1), por hibridación entre las secuencias en la micromatriz y una sonda marcada (la muestra de interés).

### 4. Otros métodos

Combinando las tecnologías, se proponen otros diseños. Por ejemplo, En la Tabla 14 se indican 6 variantes (A-F). En particular, los inventores proponen un nuevo enfoque atractivo realizando las variantes C y F. Simultáneamente, pudieron detectar mutaciones y medir el grado de metilación en un tubo a partir del ADN transformado con bisulfito.

**Tabla 18: Resumen de las diferentes técnicas disponibles**

| Variante | Tecnología | Adición           |                                       | Molde             | Aplicación            |
|----------|------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------------|
| A        | Sonda-LNA  | Bloqueador de ASB |                                       | ADNg              | Mutación              |
| B        |            |                   |                                       | ADNg transformado | Metilación            |
| C        |            |                   |                                       |                   | Mutación / Metilación |
| D        | Cast-PCR   | Cebador ASP       | Base-LNA mutada                       | ADNg              | Mutación              |
| E        |            |                   | Citosina metilada-LNA                 | ADNg transformado | Metilación            |
| F        |            |                   | Base-LNA mutada/citosina-LNA metilada | ADNg transformado | Mutación / Metilación |

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ONCODIAG

<120> Métodos para el pronóstico, el diagnóstico y la exploración de cáncer de vejiga

<130> BEP130696EP

<160> 36

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2427

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1



# ES 2 730 710 T3

|             |             |             |             |             |            |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| atggggcgccc | ctgcctgcgc  | cctcgcgctc  | tgcgtggccg  | tggccatcgt  | ggccggcgcc | 60   |
| tcctcggagt  | ccttggggac  | ggagcagcgc  | gtcgtggggc  | gagcggcaga  | agtccccggc | 120  |
| ccagagcccc  | gccagcagga  | gcagttggtc  | ttcggcagcg  | gggatgctgt  | ggagctgagc | 180  |
| tgtccccgcg  | ccgggggtgg  | tcccatgggg  | cccactgtct  | gggtcaagga  | tggcacaggg | 240  |
| ctggtgccct  | cggagcgtgt  | cctggtgggg  | ccccagcggc  | tgcaggtgct  | gaatgcctcc | 300  |
| cacgaggact  | ccggggccta  | cagctgcccg  | cagcggctca  | cgcagcgcgt  | actgtgccac | 360  |
| ttcagtgtgc  | gggtgacaga  | cgctccatcc  | tcgggagatg  | acgaagacgg  | ggaggacgag | 420  |
| gctgaggaca  | caggtgtgga  | cacagggggc  | ccttactgga  | cacggccccg  | gcggatggac | 480  |
| aagaagctgc  | tggccgtgcc  | ggccgccaac  | accgtccgct  | tccgctgccc  | agccgctggc | 540  |
| aacccccactc | cctccatctc  | ctggctgaag  | aacggcaggg  | agttccgcgg  | cgagcacccg | 600  |
| attggaggca  | tcaagctgcg  | gcatcagcag  | tggagcctgg  | tcattggaaag | cgtggtgccc | 660  |
| tcggaccgcg  | gcaactacac  | ctgcgtcgtg  | gagaacaagt  | ttggcagcat  | ccggcagacg | 720  |
| tacacgctgg  | acgtgctgga  | gcgtcccccg  | caccggccca  | tcctgcaggc  | ggggctgccc | 780  |
| gccaaccaga  | cggcgggtgt  | gggcagcgac  | gtggagtcc   | actgcaaggt  | gtacagtgac | 840  |
| gcacagcccc  | acatccagtg  | gctcaagcac  | gtggagggtga | atggcagcaa  | ggtgggcccc | 900  |
| gacggcacac  | cctacgttac  | cgtgctcaag  | tcctggatca  | gtgagagtgt  | ggaggccgac | 960  |
| gtgcgcctcc  | gcctggccaa  | tgtgtcggag  | cgggacgggg  | gcgagtacct  | ctgtcgagcc | 1020 |
| accaatttca  | taggcgtggc  | cgagaaggcc  | ttttggctga  | gcgttcacgg  | gccccgagca | 1080 |
| gccgaggagg  | agctgggtgga | ggctgacgag  | gcgggcagtg  | tgtatgcagg  | catcctcagc | 1140 |
| tacgggggtgg | gcttcttcct  | gttcatacctg | gtgggtggcg  | ctgtgacgct  | ctgccgcctg | 1200 |
| cgcagcccc   | ccaagaaagg  | cctgggctcc  | cccaccgtgc  | acaagatctc  | ccgcttcccc | 1260 |
| ctcaagcgac  | aggtgtccct  | ggagtccaac  | gcgtccatga  | gctccaacac  | accactggtg | 1320 |

# ES 2 730 710 T3

cgcatcgcaa ggctgtcctc aggggagggc cccacgctgg ccaatgtctc cgagctcgag 1380  
 ctgcctgccg accccaaatg ggagctgtct cgggcccggc tgaccctggg caagcccctt 1440  
 ggggagggct gcttcggcca ggtggtcatg gcggaggcca tcggcattga caaggaccgg 1500  
 gccgccaagc ctgtcacctg agccgtgaag atgctgaaag acgatgccac tgacaaggac 1560  
 ctgtcggacc tgggtgtctga gatggagatg atgaagatga tcgggaaaca caaaaacatc 1620  
 atcaacctgc tgggcgcctg cacgcagggc gggcccctgt acgtgctggt ggagtacgcg 1680  
 gccaagggta acctgcggga gtttctgcgg gcgcggcggc ccccgggcct ggactactcc 1740  
 ttcgacacct gcaagccgcc cgaggagcag ctcaccttca aggacctggt gtcctgtgcc 1800  
 taccaggtgg cccggggcat ggagtacttg gcctcccaga agtgcatcca cagggacctg 1860  
 gctgcccgca atgtgctggt gaccgaggac aacgtgatga agatcgaga cttcgggctg 1920  
 gcccgggacg tgcacaacct cgactactac aagaagacaa ccaacggccg gctgcccgtg 1980  
 aagtggatgg cgcctgaggc cttgtttgac cgagtctaca ctcaccagag tgacgtctgg 2040  
 tcctttgggg tcctgtcttg ggagatcttc acgtgggggg gctccccgta ccccggcatac 2100  
 cctgtggagg agctcttcaa gctgctgaag gagggccacc gcatggacaa gcccgccaac 2160  
 tgcacacacg acctgtacat gatcatgcgg gagtgtggc atgccgcgcc ctcccagagg 2220  
 cccaccttca agcagctggt ggaggacctg gaccgtgtcc ttaccgtgac gtccaccgac 2280  
 gagtacctgg acctgtcggc gcctttcgag cagtactccc cgggtggcca ggacaccccc 2340  
 agctccagct cctcagggga cgactccgtg tttgccacg acctgtgtcc cccggcccca 2400  
 cccagcagtg ggggtcgcg gacgtga 2427

<210>2  
 <211> 808  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400>2

5

# ES 2 730 710 T3

Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile  
1 5 10 15

Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val  
20 25 30

Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Gln Glu Gln  
35 40 45

Leu Val Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro  
50 55 60

Gly Gly Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly

# ES 2 730 710 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| 65  |     |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 75 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | 80 |
| Leu | Val | Pro | Ser | Glu | Arg | Val | Leu | Val | Gly | Pro | Gln | Arg | Leu | Gln | Val |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Leu | Asn | Ala | Ser | His | Glu | Asp | Ser | Gly | Ala | Tyr | Ser | Cys | Arg | Gln | Arg |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Leu | Thr | Gln | Arg | Val | Leu | Cys | His | Phe | Ser | Val | Arg | Val | Thr | Asp | Ala |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Pro | Ser | Ser | Gly | Asp | Asp | Glu | Asp | Gly | Glu | Asp | Glu | Ala | Glu | Asp | Thr |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Gly | Val | Asp | Thr | Gly | Ala | Pro | Tyr | Trp | Thr | Arg | Pro | Glu | Arg | Met | Asp |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Lys | Lys | Leu | Leu | Ala | Val | Pro | Ala | Ala | Asn | Thr | Val | Arg | Phe | Arg | Cys |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Pro | Ala | Ala | Gly | Asn | Pro | Thr | Pro | Ser | Ile | Ser | Trp | Leu | Lys | Asn | Gly |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Arg | Glu | Phe | Arg | Gly | Glu | His | Arg | Ile | Gly | Gly | Ile | Lys | Leu | Arg | His |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Gln | Gln | Trp | Ser | Leu | Val | Met | Glu | Ser | Val | Val | Pro | Ser | Asp | Arg | Gly |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Asn | Tyr | Thr | Cys | Val | Val | Glu | Asn | Lys | Phe | Gly | Ser | Ile | Arg | Gln | Thr |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Tyr | Thr | Leu | Asp | Val | Leu | Glu | Arg | Ser | Pro | His | Arg | Pro | Ile | Leu | Gln |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Ala | Gly | Leu | Pro | Ala | Asn | Gln | Thr | Ala | Val | Leu | Gly | Ser | Asp | Val | Glu |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Phe | His | Cys | Lys | Val | Tyr | Ser | Asp | Ala | Gln | Pro | His | Ile | Gln | Trp | Leu |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Lys | His | Val | Glu | Val | Asn | Gly | Ser | Lys | Val | Gly | Pro | Asp | Gly | Thr | Pro |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| Tyr | Val | Thr | Val | Leu | Lys | Ser | Trp | Ile | Ser | Glu | Ser | Val | Glu | Ala | Asp |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |

# ES 2 730 710 T3

Val Arg Leu Arg Leu Ala Asn Val Ser Glu Arg Asp Gly Gly Glu Tyr  
 325 330 335  
 Leu Cys Arg Ala Thr Asn Phe Ile Gly Val Ala Glu Lys Ala Phe Trp  
 340 345 350  
 Leu Ser Val His Gly Pro Arg Ala Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala  
 355 360 365  
 Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly  
 370 375 380  
 Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu  
 385 390 395 400  
 Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile  
 405 410 415  
 Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser  
 420 425 430  
 Met Ser Ser Asn Thr Pro Leu Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly  
 435 440 445  
 Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp  
 450 455 460  
 Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu  
 465 470 475 480  
 Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile  
 485 490 495  
 Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu  
 500 505 510  
 Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met  
 515 520 525  
 Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu  
 530 535 540  
 Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly  
 565 570 575

# ES 2 730 710 T3

Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr  
 580 585 590  
 Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu  
 595 600 605  
 Tyr Leu Ala Ser Gln Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn  
 610 615 620  
 Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly  
 645 650 655  
 Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val  
 660 665 670  
 Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu  
 675 680 685  
 Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu  
 690 695 700  
 Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ala Asn  
 705 710 715 720  
 Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala  
 725 730 735  
 Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg  
 740 745 750  
 Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp Leu Ser Ala Pro  
 755 760 765  
 Phe Glu Gln Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser Ser Ser Ser  
 770 775 780  
 Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro Pro Ala Pro  
 785 790 795 800  
 Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr  
 805

<210>3  
 <211> 94  
 <212> ADN

# ES 2 730 710 T3

|    |                                                                     |     |  |
|----|---------------------------------------------------------------------|-----|--|
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                           |     |  |
|    | <400>3                                                              |     |  |
|    | ttttttcgtc gttgtttttc ggcgcattcg ttgtttatta gttattatgt cggatttcgc   | 60  |  |
| 5  | ggttaacgcg tagttggatg ggattatttc ggat                               | 94  |  |
|    | <210>4                                                              |     |  |
|    | <211>81                                                             |     |  |
| 10 | <212> ADN                                                           |     |  |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                           |     |  |
|    | <400> 4                                                             |     |  |
|    | tagtttcgtc gggatttggg ttttagatat tgcgcggttt tttcggagta gtaagttaaa   | 60  |  |
|    | gaaagttttt agtgcggcg a                                              | 81  |  |
| 15 | <210>5                                                              |     |  |
|    | <211> 97                                                            |     |  |
|    | <212> ADN                                                           |     |  |
| 20 | <213> <i>Homo sapiens</i>                                           |     |  |
|    | <400> 5                                                             |     |  |
|    | gacggtgtgg atggtttcga ggtttaaaaa gaaagcgttt aacggttgga cgtatatattc  | 60  |  |
|    | gttaggtttt ttggaaacgg tgcggtgtt gtagagt                             | 97  |  |
| 25 | <210>6                                                              |     |  |
|    | <211> 110                                                           |     |  |
|    | <212> ADN                                                           |     |  |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                           |     |  |
| 30 | <400> 6                                                             |     |  |
|    | gcgcgggggtt atttttagtcg cggagggcgc gtaggttggt tttcgttttt acgttttcgt | 60  |  |
|    | ttttttgtat ttatttgtgt tatagttttt tgtgttggtg cgacgatttg              | 110 |  |
| 35 | <210>7                                                              |     |  |
|    | <211> 133                                                           |     |  |
|    | <212> ADN                                                           |     |  |
|    | <213> <i>Homo sapiens</i>                                           |     |  |
| 40 | <400> 7                                                             |     |  |
|    | aggtttgttt tgaggatttt tgagtttttt tttattttta tttcgttggg agtttagggg   | 60  |  |
|    | aattaggggtt tgggcggttg gattttcggg ttttttagaa cgttttttag agagaggaat  | 120 |  |
|    | tgagaggaga agg                                                      | 133 |  |
| 45 | <210>8                                                              |     |  |
|    | <211> 20                                                            |     |  |
|    | <212> ADN                                                           |     |  |
|    | <213> Artificial                                                    |     |  |

# ES 2 730 710 T3

<220>  
 <223> cebador  
  
 <400>8  
 5 cagtggcggg ggtggtgagg 20  
  
 <210>9  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 15 <400> 9  
  
 atgggccggg gcggggagca 20  
 20 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 10  
 30 caggatgggc cgggcgggc 20  
  
 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 11  
  
 atgtcttgc agccgaggag gag 23  
  
 <210> 12  
 45 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 12  
  
 agctgaggat gcctgcatac aactgca 28  
 55 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 13  
 65 accccgtagc tgaggatgcc tgctc 25



# ES 2 730 710 T3

5 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 14  
 10 cctttgggga tctgtccact cctga 25  
 <210> 15  
 <211> 23  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 15  
 gttgtccagg tgagccaggc cat 23  
 25 <210> 16  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 16  
 35 tttttcgtc gttgttttc gc 22  
 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 45 <400> 17  
 atccgaaata atcccatcca actac 25  
 50 <210> 18  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> sonda  
 <400> 18  
 attatgtcgg atttcgc 17  
 60 <210> 19  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65 <220>

# ES 2 730 710 T3

<223> cebador  
 <400> 19  
 5 tagtttcgtc gggattggg ttt 23  
 <210> 20  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 15 <400> 20  
 tcgccgacac taaaaacttt ctttaa 26  
 <210>21  
 20 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> sonda  
 <400> 21  
 30 agatattgcg cggtttt 17  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 22  
 40 gacggtgtgg atggtttcga 20  
 <210> 23  
 <211> 24  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 23  
 actctacaac accgacaccg tttc 24  
 55 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> sonda  
 <400> 24  
 65 agcgtttaac ggttgac 18

# ES 2 730 710 T3

5 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 25  
 10 gcgcgggggtt attttagtcg 20  
 <210> 26  
 <211> 22  
 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 26  
 caaatcgtcg caacaacaca aa 22  
 25 <210> 27  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 27  
 35 cgtaaaaacg aaaaacaac 19  
 <210> 28  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 40 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 45 <400> 28  
 aggtttgttt tgaggatttt tgagttt 27  
 50 <210> 29  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 29  
 60 ccttctcctc tcaattcctc tctctaa 27  
 <210> 30  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 65 <220>

# ES 2 730 710 T3

<223> sonda

<400> 30

5 cgtttgatt ttcgggtt 19

<210> 31  
<211> 110  
<212> ADN  
10 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

cctttgggga tctgtccact cctgatgctg ttatgggcaa ccctaagggtg aagggtcatg 60

gcaagaaagt gctcgggtgcc tttagtgatg gcctgggtca cctggacaac 110

15 <210> 32  
<211> 155  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 32

tcgcgacgga ctttgagcgc ggcgctcctc tcccgccccg gcgcctttcc ttcccctccc 60

cgaccctccc gggcctcccc cgaccgggcc cctggggcct cccagccct gccccgcccc 120

aggcgcgcct cctccgcctc gaccttccac ttccc 155

25 <210> 33  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> cebador directo

<400> 33

35 cccttcacct tccagctc 18

<210> 34  
<211> 18  
<212> ADN  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador inverso

45 <400> 34

agcgtgcct gaaactcg 18

50 <210> 35  
<211> 13  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
55 <223> mutación de sonda 77CT de *TERT*

<400> 35

## ES 2 730 710 T3

cccggaaggg gct            13

5    <210> 36  
     <211> 13  
     <212> ADN  
     <213> Artificial

10   <220>  
     <223> mutación de sonda 99CT de *TERT*

     <400> 36

     cccggaaggg gtc            13

15

## REIVINDICACIONES

1. Método para la vigilancia, el diagnóstico y la exploración de un cáncer de vejiga, o riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga en un sujeto, donde dicho método comprende:

- a) una etapa de detección de una mutación en el gen FGFR3 en una primera muestra biológica; y
- b) una etapa de medición del grado de metilación de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos de los mismos, en una segunda muestra biológica obtenida de dicho sujeto,

donde

dichas primera y segunda muestras biológicas son la misma muestra biológica; y dicha etapa a) se realiza:

- detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en 742C→T, 746C→G, 1114G→T y 1124A→G por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; o
- detectando una mutación en el grupo que consiste en las mutaciones Arg248Cys, Ser249Cys, Gly372Cys y Tyr375Cys, por referencia a los números de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa a) y la etapa b) se realizan en el mismo ADN tratado bisulfito obtenido de una sola muestra biológica y donde la etapa a) es una etapa de determinación de la presencia de:

- una guanina (G) en la posición 746 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito;
- una timina (T) en la posición 1114 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito; y/o
- una guanina (G) en la posición 1124 de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 que se trató con bisulfito.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho método comprende, después de la etapa b), una etapa b') adicional que consiste en comparar el grado de metilación medido en la etapa b) con un valor umbral, donde dicho valor umbral discrimina entre un paciente que padece o corre el riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga y un paciente que no padece cáncer de vejiga.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde:

- la presencia de dicha mutación en el gen FGFR3, y
- la comparación del grado de metilación de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en SEPTINA 9, SLIT 2, TWIST 1, HS3ST2 y fragmentos de los mismos, con un valor umbral son indicativos de un cáncer de vejiga o de un riesgo de desarrollar un cáncer de vejiga.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la etapa a) del método de la invención comprende además la detección de una mutación en el gen *TERT*, realizándose dicha detección:

- detectando una mutación seleccionada del grupo que consiste en las mutaciones 77C→T y 99C→T por referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID NO: 32.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la etapa b) consiste en:

- medir el grado de metilación del fragmento de SEPTINA 9 como se muestra en la SEQ ID NO: 3;
- medir el grado de metilación del fragmento de SLIT 2 como se muestra en la SEQ ID NO: 4;
- medir el grado de metilación del fragmento de TWIST 1 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y
- medir el grado de metilación del fragmento de HS3ST2 como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la etapa b) comprende además medir el grado de metilación del gen DDR1 o de uno de sus fragmentos.

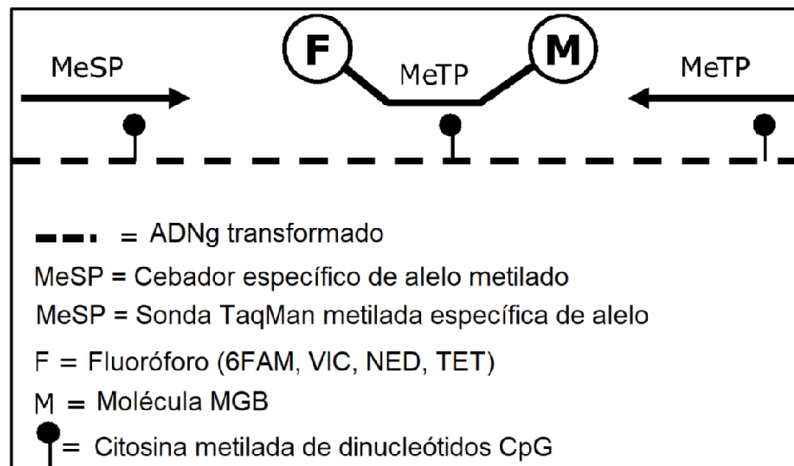
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho fragmento se muestra en la SEQ ID NO: 7.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dichas primera y segunda muestras biológicas son muestras de orina.

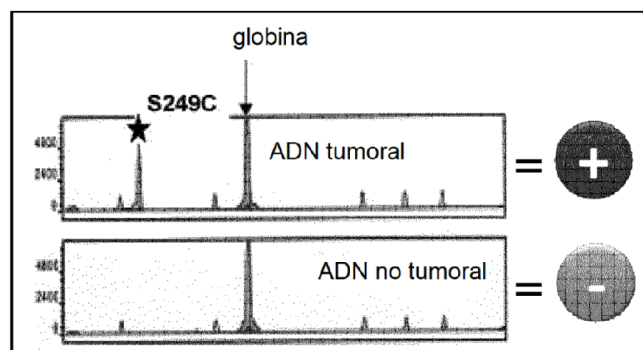
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la etapa a) se realiza mediante PCR específica de alelo (AS-PCR).

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, donde la etapa a) se realiza utilizando todos los cebadores como se muestra en las SEQ ID NO: 8 a 13.

12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la etapa b) se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa, en tiempo real, multiplex, específica de metilación (Qm-PCR).
- 5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicha etapa b) se realiza utilizando los cebadores y las sondas como se muestra en las SEQ ID NO: 16 a 30.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, **caracterizado por que** comprende además una etapa de medición del grado de metilación de un gen constitutivo.
- 10 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde dicho gen constitutivo se selecciona entre albúmina,  $\beta$ -actina y  $\beta$ -globina, preferentemente el gen de albúmina o un fragmento del mismo.
16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, donde dicho umbral se expresa como índice de metilación acumulativa.
- 15 17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde dicho método comprende además una etapa c) de medición del nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en BCLA-4 y BCAR-1.
- 20 18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicha etapa c) comprende además una etapa c') de comparación de dicho nivel de expresión con el nivel de expresión obtenido en un sujeto sano o en un sujeto que superó un cáncer de vejiga.
- 25 19. Uso de un kit que comprende:
- (a) al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8 a 13; y
- (b) al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16 a 30
- para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 1.
- 30



**Figura 1**



**Figura 2**



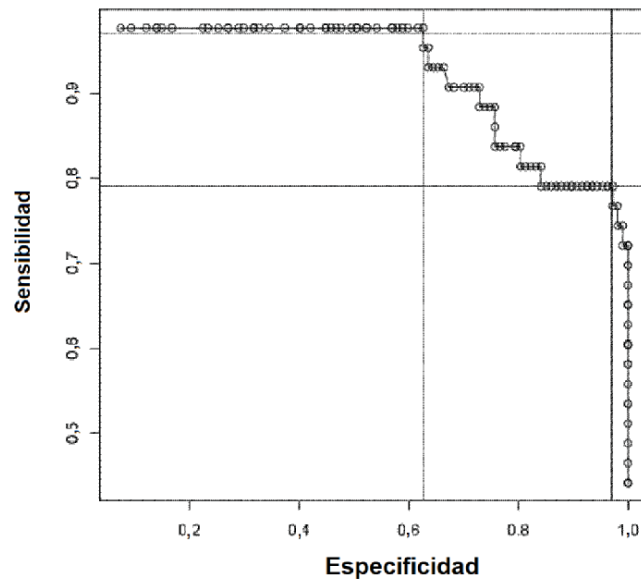


Figura 3

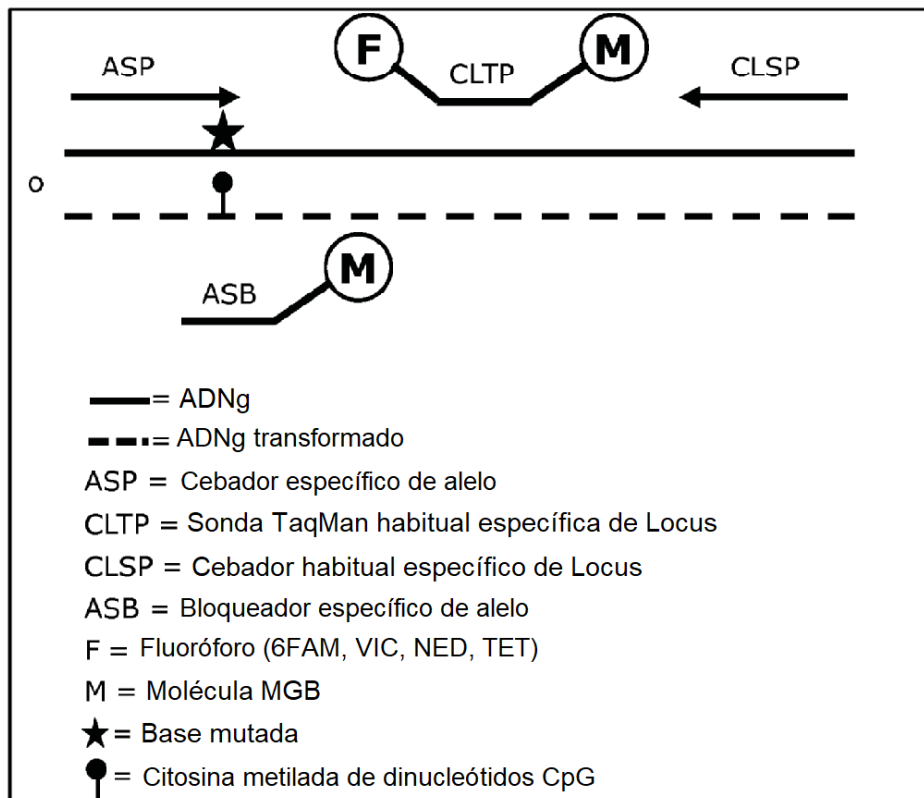
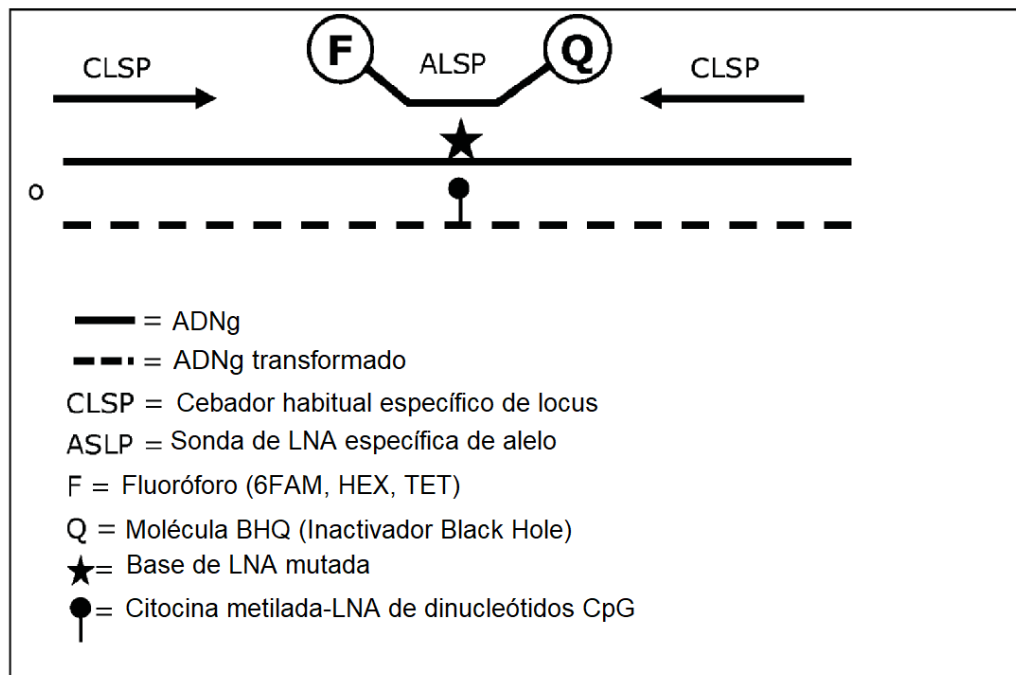
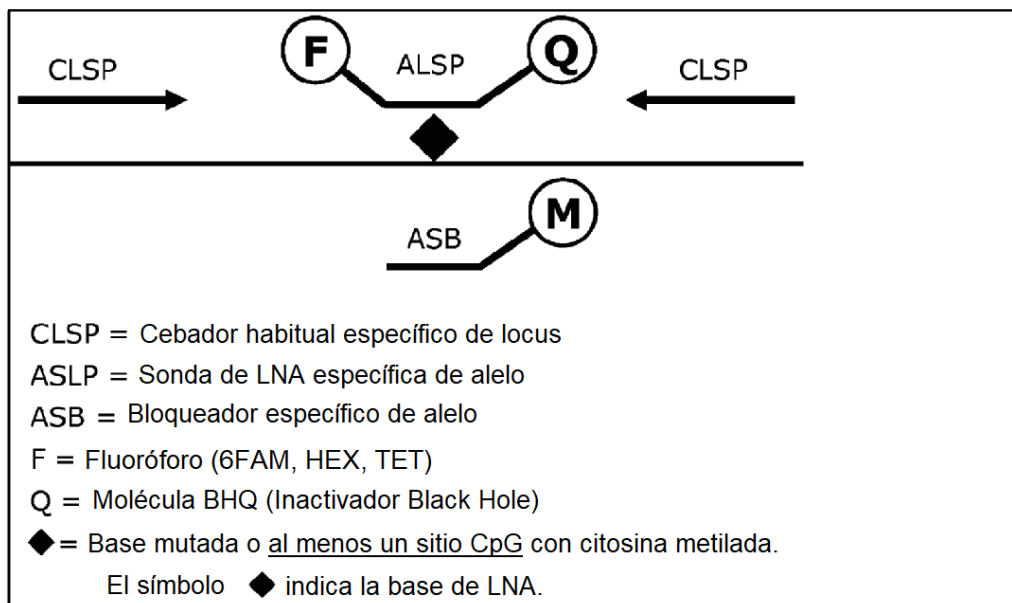


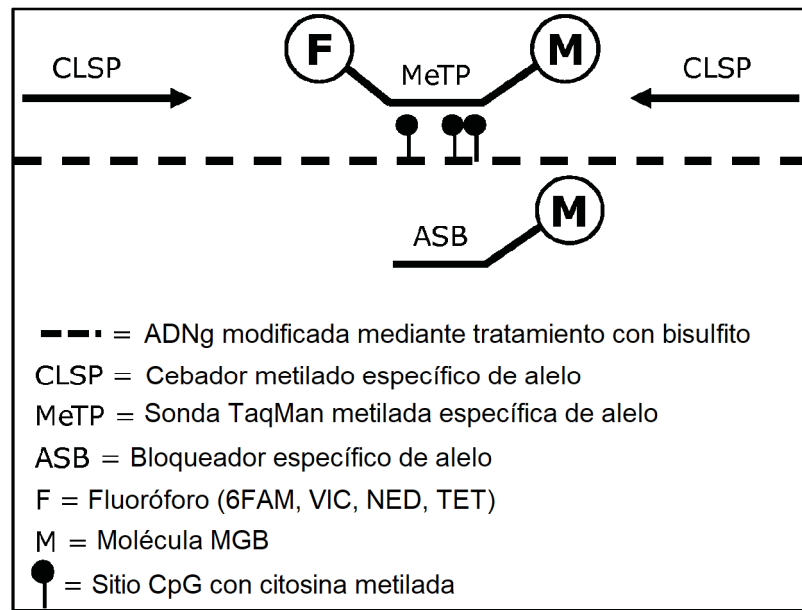
Figura 4



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**