

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 872**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2016 PCT/IL2016/050718**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17006317**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2016 E 16820952 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2023 EP 3320116**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico del cáncer de vejiga**

30 Prioridad:
06.07.2015 US 201514792270

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2024

73 Titular/es:
**NUCLEIX LTD. (100.0%)
3 Pekeris Street
7670203 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:
**FRUMKIN, DANNY y
WASSERSTROM, ADAM**

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 961 872 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 el diagnóstico del cáncer de vejiga

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos para identificar el cáncer de vejiga en un sujeto mediante el análisis de una muestra biológica derivada del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a la identificación de cáncer de vejiga mediante el análisis de ADN de muestras de orina. Los métodos se basan en las diferencias en la metilación del ADN entre el ADN normal y el del cáncer de vejiga.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de vejiga es un cáncer que surge de las células de la vejiga urinaria. La mayoría de los cánceres de vejiga son carcinomas de células de transición, que surgen de las células epiteliales en el revestimiento interno de la vejiga (urotelio). Otros tipos de cáncer de vejiga incluyen carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, sarcomas y carcinomas de células pequeñas.

El diagnóstico de cáncer de vejiga se realiza comúnmente mediante cistoscopia, en la que la vejiga se examina visualmente con un endoscopio (cistoscopio). Por lo general, se toma una biopsia de áreas de anomalías sospechosas para verificar la presencia de células cancerosas.

Otro método empleado en el diagnóstico del cáncer de vejiga es la citología de orina, en la que se analiza una muestra de orina bajo un microscopio para detectar la presencia de células cancerosas. También se han utilizado varios métodos de imagen, como rayos X y tomografía computarizada (TC) para diagnosticar el cáncer de vejiga, algunos de los cuales implican inyectar un tinte por vía intravenosa para permitir la visualización del tejido examinado.

En los últimos años, se han puesto a disposición medios de diagnóstico adicionales para el cáncer de vejiga, como pruebas de antígeno urinario y un ensayo para detectar anomalías cromosómicas en muestras de orina (UroVysion™).

Los métodos actualmente disponibles tienen una serie de inconvenientes, ya que algunos de ellos son invasivos, laboriosos y consumen mucho tiempo, y algunos son insuficientemente sensibles y específicos. Además, el diagnóstico por examen patológico se realiza manualmente y, por lo tanto, es subjetivo. Los resultados subjetivos son problemáticos porque puede haber diferencias entre resultados de la misma muestra analizados por diferentes patólogos, e incluso por el mismo patólogo en diferentes momentos.

Smith et al. (2009) *Am J Pathol.*, 174(2):371-9, utilizaron líneas celulares de cáncer de vejiga humano para desarrollar modelos de dos sitios metastásicos clínicamente comunes, pulmón e hígado, y evaluaron su expresión génica con respecto a tejidos tumorales humanos. Smith et al. (2009) informan que KCNJ2 está regulado a la baja en modelos de hígado y pulmón.

Liu et al. (2015) *Mol Cancer.*, 14:59, examinaron la expresión de KCNJ2/Kir2.1 en tejidos de cincuenta y dos casos de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) mediante inmunohistoquímica. Además, se realizó la sobreexpresión o eliminación de KCNJ2/Kir2.1 en líneas celulares SCLC resistentes a múltiples fármacos (H69AR y H446AR) y sus líneas celulares parentales (H69 y H446) para evaluar su influencia en el crecimiento celular, la apoptosis, el ciclo celular y la quimiorresistencia. Liu et al. (2015) concluyeron que KCNJ2/Kir2.1 modula el crecimiento celular y la resistencia a los fármacos al regular la expresión de MRP1/ABCC1 y está regulado simultáneamente por la vía Ras/MAPK y miR-7. KCNJ2/Kir2.1 puede ser un predictor de pronóstico y un objetivo potencialmente novedoso para interferir con la quimiorresistencia en SCLC.

El documento US 2009/0175827 divulga métodos y composiciones para identificar genes o rutas genéticas moduladas por miR-16, usando miR-16 para modular un gen o ruta de genes, usando este perfil para evaluar la condición de un paciente y/o tratar a los pacientes con un miARN apropiado. Entre otros, la expresión de KCNJ2 se evalúa después de la transfección de células cancerosas humanas con pre-miR hsa-miR-16.

Los documentos WO 2011/001274, WO 2011/070441 y WO 2011/132061, asignados al solicitante de la presente invención, describen métodos para identificar ADN de una fuente natural, métodos para categorizar muestras de ADN en diferentes tipos de tejido y métodos para identificar la fuente de una muestra de ADN, respectivamente, en función de las proporciones de señales entre loci genómicos específicos, correspondientes a las proporciones de metilación entre los loci genómicos.

Existe una necesidad insatisfecha de métodos y kits mejorados para diagnosticar el cáncer de vejiga en sujetos que lo necesiten, con alta especificidad y alta sensibilidad que no requieran patólogos bien entrenados. Existe además una necesidad de métodos de diagnóstico objetivos e independientes del usuario.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona, según algunos aspectos, métodos para la identificación de cáncer de vejiga en sujetos que lo necesitan mediante el análisis de ADN de muestras de orina. Los métodos de la presente invención se basan en las diferencias de metilación en loci genómicos seleccionados entre el ADN normal y el ADN del cáncer de vejiga.

Más particularmente, los métodos de la presente invención utilizan un conjunto de loci genómicos que inesperadamente se encontró que estaban altamente metilados en el ADN derivado del cáncer de vejiga, y no en el ADN derivado de un tejido de vejiga sano, y por lo tanto pueden usarse para determinar si una muestra de ADN dada es de un paciente con cáncer de vejiga o de un sujeto sano.

Sorprendentemente, se demostró que los métodos de la presente invención tienen una mayor sensibilidad en comparación con la citología, con una sensibilidad general (indistinta del grado o estadio del cáncer de vejiga) de al menos el 90 %, una sensibilidad del 100 % en tumores invasivos y una sensibilidad del 100 % en tumores no invasivos. tumores invasivos de al menos el 89%.

De acuerdo con los métodos de la presente invención, el ADN de una muestra de orina de un sujeto analizado se digiere con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación que escinde su secuencia de reconocimiento solo si no está metilada. El conjunto de loci genómicos descritos en el presente documento, denominados "loci de restricción", contienen la secuencia de reconocimiento de al menos una enzima de restricción sensible a la metilación y, por lo tanto, se cortan (digieren) de acuerdo con su nivel de metilación, donde una mayor metilación da como resultado una menor digestión por la enzima. Inesperadamente, se corta una muestra de ADN de un individuo sano, en el conjunto de loci genómicos descritos en el presente documento, más extensamente que una muestra de ADN de un paciente con cáncer. En consecuencia, la diferencia en la eficiencia de la digestión entre una muestra de ADN en la que los loci de restricción de la invención están altamente metilados y una muestra de ADN en la que estos loci tienen niveles bajos de metilación establece diferentes patrones de amplificación en etapas posteriores de amplificación y cuantificación. Sorprendentemente, la diferencia en los patrones de amplificación permite distinguir entre el ADN del tejido de cáncer de vejiga y el ADN del tejido de vejiga normal.

Los pasos de amplificación y cuantificación según los métodos de la presente invención implican la coamplificación de al menos un locus de restricción y un locus de control del ADN digerido. El locus de control puede ser un locus que no sea cortado por la enzima de restricción sensible a la metilación utilizada en la etapa de digestión. A continuación, se determinan las intensidades de señal de los loci amplificados y se calcula una relación entre las intensidades de señal de cada locus de restricción y el locus de control. Ahora se revela por primera vez que se producen distintas proporciones de señal para el ADN del cáncer de vejiga y el ADN de la vejiga normal, lo que permite la identificación del cáncer de vejiga.

La identificación de cáncer de vejiga se realiza comparando las proporciones de señales calculadas para el ADN de un sujeto analizado con una o más proporciones de referencia determinadas para los mismos loci de restricción en fuentes conocidas, es decir, individuos normales y/o pacientes con cáncer. Basándose en la comparación, la muestra analizada se identifica como derivada de un paciente con cáncer o de un sujeto sano. Cabe señalar que en ningún momento los kits y métodos de la invención requieren la determinación del nivel de metilación de loci individuales per se.

Los métodos de la presente invención permiten la identificación del cáncer de vejiga analizando muestras de orina, proporcionando así ventajosamente un diagnóstico molecular no invasivo de la enfermedad. Otro beneficio de los métodos y kits reivindicados es que la identificación puede llevarse a cabo en una muestra de orina a pesar de las cantidades relativamente bajas de ADN que pueden contener las muestras de orina. El beneficio adicional conferido por el diagnóstico del cáncer de vejiga por los métodos y kits descritos en el presente documento es la alta sensibilidad y especificidad del diagnóstico. Además, la metodología aquí descrita produce un resultado objetivo que no depende del usuario.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar el cáncer de vejiga en un sujeto humano, comprendiendo el método:

- (a) aplicar ADN de una muestra de orina obtenida del sujeto a la digestión por al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para obtener ADN tratado con endonucleasa de restricción;
- (b) coamplificar a partir del ADN tratado con endonucleasa de restricción al menos un locus de restricción que comprende el locus expuesto en SEQ ID NO: 1 y un locus de control, generando así un producto de amplificación para cada locus;
- (c) calcular una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación de cada uno de dichos al menos un locus de restricción y el locus de control; y
- (d) comparar la relación con una o más relaciones de referencia obtenidas de una pluralidad de muestras de ADN derivadas de una fuente conocida, identificando así el cáncer de vejiga en el sujeto humano.

Puede realizarse la detección de una puntuación de probabilidad alta para dicha relación con respecto a la

relación de referencia de cáncer de vejiga correspondiente y comprende detectar una puntuación de probabilidad con respecto a la relación de referencia de cáncer de vejiga que está por encima de un umbral predefinido.

5 En algunas formas de realización, el al menos un locus de restricción comprende además el locus establecido en SEQ ID NO: 5, y dicha puntuación de probabilidad puede ser una puntuación de probabilidad combinada para una relación SEQ ID NO: 1 y una relación SEQ ID NO: 5 con respecto a sus correspondientes índices de referencia de cáncer de vejiga.

10 En algunas formas de realización, el al menos un locus de restricción comprende además el locus establecido en SEQ ID NO: 7 y el locus establecido en SEQ ID NO: 11, y dicha puntuación de probabilidad puede ser una puntuación de probabilidad combinada para dicha SEQ ID NO:1, dicha relación SEQ ID NO: 5, una relación SEQ ID NO: 7 y una relación SEQ ID NO: 11 con respecto a sus correspondientes relaciones de referencia de cáncer de vejiga.

15 En algunas formas de realización, el al menos un locus de restricción comprende además al menos un locus de restricción adicional seleccionado del grupo de loci expuesto en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, y dicha puntuación de probabilidad puede ser una puntuación de probabilidad combinada para dichas proporciones de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11 y al menos una proporción adicional de dicho al menos un locus de restricción adicional con respecto a su vejiga correspondiente cocientes de referencia del cáncer.

20 En algunas formas de realización, el al menos un locus de restricción adicional comprende los loci establecidos en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el al menos un locus de restricción comprende todo el conjunto de loci adelante en SEQ ID NO: 1-15. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

25 En algunas formas de realización, el método comprende además: proporcionar un primer y un segundo constructo de control que comprenden secuencias de ADN no humano, en el que el primer constructo de control comprende una secuencia de ADN desprovista de una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación, y el segundo constructo de control comprende una secuencia de ADN que contiene una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación y que está completamente desmetilada; digerir los constructos de control primera y segunda con la endonucleasa de restricción sensible a la metilación; y amplificar los constructos de control primera y segunda; en el que la detección de una amplificación adecuada para el primer constructo concomitante con una baja o ausencia de amplificación para el segundo constructo es indicativa de una digestión adecuada del ADN.

30 La al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede seleccionarse del grupo que consiste en AatII, Acc65I, Accl, Acil, ACII, Afel, Agel, Apal, ApaLI, Ascl, AsiSI, Aval, Avall, Bael, BanI, Bbel, BceAI, Bcgl, BfuCI, BglI, BmgBI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BseYI, BsiEI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspDI, BsrBI, BsrFI, BssHII, BssKI, BstAPI, BstBI, BstUI, BstZ171, Cac8I, ClaI, DpnI, DrdI, EaeI, EagI, EagI-HF, EciI, EcoRI, EcoRI-HF, Faul, Fnu4HI, FseI, FspI, Haell, Hgal, HhaI, HincII, HincII, HinfI, HinfII, HpaI, HpaII, HpyI66ii, HpyI88iii, Hpy99I, HpyCH4IV, KasI, MluI, MmeI, MspAII, MwoI, NaeI, NaeI, NgoNIV, Nhe-HFI, NheI, NlaIV, NotI, NotI-HF, NruI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.CviPII, PaeR71, PheI, PmeI, PmlI, PshAI, PspOMI, PvuI, RsaI, RsrII, SacII, Sall, Sall-HF, Sau3AI, Sau96I, ScrFI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SnaBI, TfiI, TscI, TseI, TspMI y ZraI. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

35 En algunas formas de realización, el paso (a) se realiza usando una endonucleasa de restricción sensible a la metilación. En algunas formas de realización, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación es HhaI.

40 En algunas formas de realización, el paso (a) se realiza utilizando una endonucleasa de restricción sensible a la metilación. En algunas formas de realización, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación es HinfII.

45 En algunas formas de realización, el locus de control es un locus desprovisto de una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación.

50 En algunas formas de realización, el locus de control es el locus establecido en SEQ ID NO: 16.

55 En algunas formas de realización, el paso (b) se realiza usando PCR en tiempo real.

60 En algunas formas de realización, el paso (b) se realiza usando PCR en tiempo real y el método comprende además agregar sondas fluorescentes para detectar específicamente los productos de amplificación del al menos un locus de restricción y al menos un locus de control.

65 En algunas formas de realización, el paso (b) se realiza usando PCR en tiempo real y dicho cálculo de una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación de cada uno de dichos al menos un locus de restricción y el locus de control comprende determinar el ciclo de cuantificación (Cq) para cada locus y calcular $2^{(\text{locus de})}$

control Cq-locus de restricción Cq). En algunas formas de realización, la proporción de referencia de cáncer de vejiga correspondiente es $2^{\Delta\Delta Cq}$ (locus de control en un ADN de referencia - locus de restricción Cq en un ADN de referencia) donde el ADN de referencia es ADN de cáncer de vejiga.

5 En algunas formas de realización, el método comprende además proporcionar relaciones saludables de referencia, entre las intensidades de señal de los productos de amplificación del al menos un locus de restricción y el locus de control en el ADN derivado de sujetos sanos. El método puede comprender además la detección de una puntuación de probabilidad baja para dicha relación con respecto a la correspondiente relación de referencia saludable. En algunas formas de realización, dicho cáncer de vejiga se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células de transición, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, sarcoma y carcinoma de células pequeñas. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

En algunas formas de realización particulares, dicho cáncer de vejiga es un carcinoma de células de transición.

15 La presente descripción también proporciona un método para tratar el cáncer de vejiga en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método identificar el cáncer de vejiga según el método de la presente invención y administrar a dicho sujeto una terapia contra el cáncer.

20 Dicha terapia contra el cáncer puede comprender una o más de cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

25 La presente descripción describe además un método para medir la proporción de metilación del ADN en un sujeto humano del que se sospecha que tiene cáncer de vejiga, comprendiendo el método: (a) obtener una muestra de ADN de una muestra de orina del sujeto y someter la muestra de ADN a digestión con al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para obtener ADN tratado con endonucleasa de restricción; (b) coamplificar a partir del ADN tratado con endonucleasa de restricción al menos un locus de restricción que comprende el locus expuesto en SEQ ID NO: 1 y un locus de control, generando así un producto de amplificación para cada locus; y (c) usar una computadora para comparar una relación de intensidades de señal de dicho al menos un locus de restricción y dicho locus de control con una relación de referencia de dichos loci en el ADN del cáncer de vejiga para evaluar de ese modo si dicha relación es indicativa de cáncer de vejiga.

30 Estos y otros aspectos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, los ejemplos y las reivindicaciones que siguen.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A muestra gráficos de amplificación ejemplares de un locus de control y dos loci de restricción en una muestra de un sujeto sano.

40 La figura 1B muestra gráficos de amplificación ejemplares de un locus de control y dos loci de restricción en una muestra de un paciente con cáncer.

La figura 2 es un diagrama de flujo que describe un método para identificar el cáncer de vejiga en un sujeto según algunas formas de realización de la presente invención.

La figura 3A es un gráfico circular que representa una sensibilidad general del 90 % de un estudio representativo.

45 La figura 3B es un gráfico circular que representa una especificidad general del 83 % de un estudio representativo.

La figura 4A representa la sensibilidad del método, en un estudio representativo, con respecto a las etapas del cáncer de vejiga.

La figura 4B representa la sensibilidad del método en un estudio representativo, con respecto a los grados de cáncer de vejiga.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la identificación de cáncer de vejiga utilizando ADN de muestras de orina basándose en la detección de alteraciones en la metilación del ADN en loci predeterminados.

55 La presente invención implica calcular las relaciones de intensidad de la señal entre loci seleccionados coamplificados a partir de una muestra de ADN analizada después de la digestión del ADN con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación, y comparar estas relaciones con una o más relaciones de referencia obtenidas de una pluralidad de muestras de ADN derivado de una fuente conocida, sano o cáncer de vejiga. Basándose en la comparación, la muestra analizada se identifica como derivada de un paciente con cáncer o de un sujeto sano.

El término "pluralidad", como se usa en el presente documento, se refiere a "al menos dos" o "dos o más".

65 Los métodos de la presente invención son particularmente beneficiosos, ya que proporcionan medios altamente sensibles y específicos para diagnosticar el cáncer de vejiga que no son invasivos, son independientes del usuario y pueden llevarse a cabo incluso en muestras de orina que contienen cantidades relativamente bajas de ADN.

Además, a diferencia de los métodos convencionales que utilizan análisis de metilación para distinguir entre tejidos cancerosos y normales, que requieren determinar los niveles de metilación reales en loci genómicos específicos, la metodología descrita en este documento no requiere evaluar los niveles de metilación absolutos. Por lo tanto, el método descrito en el presente documento elimina la necesidad de curvas estándar y/o pasos laboriosos adicionales implicados en la determinación de los niveles de metilación per se, por lo que ofrece un procedimiento simple y rentable. Las proporciones de señal obtenidas por el método de la invención, que se calculan entre loci amplificados a partir del mismo molde de ADN en la misma mezcla de reacción (es decir, en las mismas condiciones de reacción), confieren una ventaja adicional sobre los enfoques para analizar la metilación. Esto hace que el método sea insensible a varios factores de "ruido", como cambios en la concentración de ADN molde, condiciones de PCR y presencia de inhibidores. Estos ruidos son inherentes a los métodos existentes que se basan en la cuantificación de los niveles de metilación de loci comparando señales de reacciones de amplificación separadas.

En algunas formas de realización, se proporciona un método para identificar el cáncer de vejiga en un sujeto, comprendiendo el método: (a) digerir el ADN de una muestra de orina obtenida del sujeto con al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación; (b) amplificar al menos el locus de restricción establecido en SEQ ID NO: 1 y un locus de control en la muestra de ADN digerido, donde el locus de control es un locus que exhibe el mismo perfil de digestión y amplificación en el ADN del cáncer de vejiga y en el ADN sano, generando así un producto de amplificación para cada locus en dicha muestra de ADN; (c) calcular una relación entre intensidades de señal de los productos de amplificación del al menos un locus de restricción y el locus de control en dicha muestra de ADN; y (d) comparar la relación con una o más relaciones de referencia obtenidas de una pluralidad de muestras de ADN derivadas de una fuente conocida, identificando así el cáncer de vejiga en el sujeto humano.

Se puede realizar la detección de una puntuación de alta probabilidad para dicha relación con respecto a la correspondiente relación de referencia de cáncer de vejiga y que comprende detectar una puntuación de probabilidad que está por encima de un umbral predefinido.

Detectar una puntuación de alta probabilidad con respecto a la proporción de referencia de cáncer de vejiga puede comprender comparar la proporción con la proporción de referencia de cáncer de vejiga correspondiente y, opcionalmente, con la proporción de referencia sana, y asignar una puntuación de probabilidad basada en la comparación, en la que una puntuación de probabilidad alta es indicativa de cáncer.

Por lo tanto, en algunas formas de realización, el método de la presente invención consiste en proporcionar índices de referencia de cáncer de vejiga y, opcionalmente, índices de referencia saludables.

Se puede comprender comparar la proporción con una escala de referencia que comprende proporciones determinadas en pacientes con cáncer de vejiga y en individuos sanos, donde dicha puntuación de probabilidad es una puntuación asignada a dicha proporción en función de su posición relativa dentro de la escala de referencia. En algunas formas de realización, cuanto mayor sea el valor de la relación, mayor será la puntuación que se le asigne.

En algunas formas de realización, el método comprende además amplificar en el paso (b) al menos un locus de restricción adicional, generando así un producto de amplificación para al menos un locus de restricción adicional; y repetir los pasos (c)-(d) para cada lugar de restricción adicional. En el paso (d), se pueden obtener una pluralidad de puntuación de probabilidad individuales para una pluralidad de proporciones con respecto a sus correspondientes proporciones de referencia de cáncer de vejiga, en donde cada relación está entre un locus de restricción distinto y el locus de control. Se calcula una puntuación de probabilidad combinada en base a la pluralidad de la puntuación de probabilidad.

La puntuación combinada puede ser una puntuación media. La puntuación combinada también puede ser un promedio ponderado de las puntuaciones de probabilidad individuales. La puntuación combinada puede ser además una suma de todas las puntuaciones de probabilidad individuales. En general, la puntuación combinada puede incluir cualquier valor matemático o estadístico que represente toda la puntuación de probabilidad individual.

La detección de una puntuación de probabilidad combinada alta puede identificar el cáncer de vejiga en el sujeto humano. Detectar una puntuación de probabilidad combinada alta puede ser detectar una puntuación de probabilidad combinada que está por encima de un umbral predefinido.

Los términos "ADN de", "ADN derivado de", "ADN dentro de" y similares son intercambiables y se refieren al ADN obtenido de una muestra de orina, ADN aislado de una muestra de orina o una muestra de orina tal como es, una muestra de orina que contiene ADN, o una muestra de ADN, con el mismo. Por lo tanto, estos términos incluyen, entre otros, ADN aislado de una muestra de orina, una muestra de orina enriquecida en ADN y ADN en una muestra de orina no manipulada.

La metilación en el genoma humano se produce en forma de 5-metil citosina y se limita a los residuos de citosina que forman parte de la secuencia CG, también denominados dinucleótidos CpG (los residuos de citosina que forman parte de otras secuencias no están metilados). Algunos dinucleótidos CG en el genoma humano están metilados y otros no. Además, la metilación es específica de células y tejidos, de modo que un dinucleótido CG específico puede metilarse en una determinada célula y al mismo tiempo desmetilarse en una célula diferente, o metilarse en un determinado tejido y al mismo tiempo desmetilarse en diferentes tejidos. La metilación del ADN es un importante regulador de la transcripción de

genes. Los patrones aberrantes de metilación del ADN, tanto la hipermetilación como la hipometilación en comparación con el tejido normal, se han asociado con un gran número de tumores malignos humanos.

5 El término "cáncer de vejiga" se refiere al cáncer que surge de las células de la vejiga urinaria. El cáncer de vejiga se usa aquí para incluir carcinoma de células de transición (TCC, también denominado carcinoma de células uroteliales), carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas y sarcoma. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

10 El TCC, que surge de las células epiteliales en el revestimiento interno de la vejiga (urotelio), es el tipo más común de cáncer de vejiga y representa más del 90% de los casos. TCC generalmente incluye dos subtipos, carcinomas papilares, en los que los tumores crecen en proyecciones delgadas en forma de dedo desde la superficie interna de la vejiga hacia el centro hueco y carcinomas planos, en los que los tumores no crecen hacia la parte hueca de la vejiga. El carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma son tipos menos comunes de cáncer de vejiga, y el carcinoma de células pequeñas y el sarcoma son relativamente raros.

15 Por lo general, el cáncer de vejiga se puede clasificar adicionalmente como no invasivo, donde las células cancerosas están confinadas a la capa interna del epitelio de transición, o invasivo, donde las células cancerosas crecen en la lámina propia de la vejiga o incluso más profundamente en la capa muscular. Un cáncer de vejiga también se puede describir como superficial o sin invasión muscular. Estos términos incluyen tanto tumores no invasivos como cualquier tumor invasivo que no haya crecido hacia la capa muscular principal de la vejiga.

20 Una de las clasificaciones comunes del cáncer de vejiga es la categoría T, que describe cuánto ha crecido el tumor principal en la pared de la vejiga (o más allá). Por lo general, los cánceres de vejiga comienzan en el urotelio y, a medida que el cáncer crece, pueden invadir otras capas de la vejiga y, por lo tanto, volverse más avanzados. La clasificación según la categoría T incluye los siguientes términos:

- T0: Sin evidencia de un tumor primario
- Ta: Carcinoma papilar no invasivo
- Tis o CIS: Carcinoma plano no invasivo (carcinoma plano in situ)
- 30 - T1: El tumor ha crecido desde la capa de células que recubren la vejiga en el tejido conectivo a continuación. No ha crecido hacia la capa muscular de la vejiga.
- T2: El tumor ha crecido hacia la capa muscular.
- T2a: El tumor ha crecido solo hacia la mitad interna de la capa muscular.
- T2b: El tumor ha crecido hacia la mitad exterior de la capa muscular.
- 35 - T3: El tumor ha crecido a través de la capa muscular de la vejiga y hacia la capa de tejido adiposo que la rodea.
- T3a: La propagación al tejido graso solo se puede ver con un microscopio.
- T3b: La extensión al tejido adiposo es lo suficientemente grande como para que se vea en las pruebas de imagen o para que el cirujano la vea o la sienta.
- T4: El tumor se diseminó más allá del tejido adiposo y hacia los órganos cercanos o estructuras. Puede crecer hacia cualquiera de los siguientes: el estroma (tejido principal) de la próstata, las vesículas seminales, el útero, la vagina, la pared pélvica o la pared abdominal.
- 40 - T4a: El tumor se ha diseminado al estroma de la próstata (en hombres), o al útero y/o vagina (en mujeres).
- T4b: El tumor se ha diseminado a la pared pélvica o a la pared abdominal.

45 También es común describir el cáncer de vejiga por su grado (G), que representa la similitud de las células cancerosas con las células sanas cuando se observan bajo un microscopio. El tejido sano generalmente contiene varios tipos de células agrupadas. Si el cáncer se ve similar al tejido sano y contiene diferentes grupos de células, se le llama tumor diferenciado o de bajo grado. Si el tejido canceroso se ve muy diferente al tejido sano, se le llama tumor pobremente diferenciado o de alto grado.

50 Los cirujanos urólogos también pueden clasificar el grado de un tumor en función de su probabilidad de reaparecer o progresar (crecer y diseminarse) para planificar el tratamiento según el grado, utilizando las siguientes categorías:

- Papiloma (o neoplasia urotelial papilar benigna de bajo potencial maligno; PUNLMP) - puede reaparecer pero tiene un bajo riesgo de progresar.
- Grado bajo: probabilidad de recurrencia y progreso en comparación con PUNLMP.
- Alto grado: más probable que recurra y prograse.

60 El cáncer de vejiga a veces puede afectar muchas áreas de la vejiga al mismo tiempo. Si se encuentra más de un tumor, la letra se agrega incorrectamente a la categoría T correspondiente.

65 Los términos "identificación de cáncer de vejiga", "identificación de cáncer de vejiga en un sujeto" e "identificación de que el sujeto tiene cáncer de vejiga" como se usan en el presente documento son intercambiables y abarcan uno o más de los exámenes de detección de cáncer de vejiga, detección de la presencia de cáncer de vejiga, detectar la recurrencia del cáncer de vejiga, detectar la susceptibilidad al cáncer de vejiga, detectar la resistencia al tratamiento del cáncer de vejiga, detectar la eficacia del tratamiento del cáncer de vejiga, determinar el estadio (gravedad) del cáncer de

vejiga, determinar el pronóstico del cáncer de vejiga y el diagnóstico temprano del cáncer de vejiga en un sujeto. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

5 El término "sujeto" como se usa en este documento es intercambiable con "individuo" y se refiere a un sujeto humano. Se puede sospechar que el sujeto tiene cáncer de vejiga. En algunas formas de realización, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar cáncer de vejiga, por ejemplo, en base a antecedentes previos de la enfermedad, predisposición genética y/o antecedentes familiares, un sujeto que ha estado expuesto a uno o más carcinógenos, riesgo laboral, riesgo ambiental y/o sujeto que presente signos clínicos sospechosos de cáncer. En algunas formas de realización, el sujeto puede mostrar al menos un síntoma o característica de cáncer de vejiga, incluyendo por ejemplo, presencia de sangre en la orina, cambio en la frecuencia de la micción, anemia, debilidad general o síntomas de irritación. En otras formas de realización, el sujeto puede estar asintomático.

Recolección y procesamiento de muestras de orina

15 Las muestras de orina se pueden recolectar de sujetos utilizando recipientes o tubos de recolección convencionales.

En algunas formas de realización, el ADN genómico puede extraerse de las muestras de orina según métodos conocidos en la técnica. Se describen procedimientos ejemplares, por ejemplo, en Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cuarta edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2012.

Digestión de ADN

25 De acuerdo con los métodos de la presente invención, el ADN de la muestra de orina se somete a digestión con al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación, por ejemplo, con una, dos, tres endonucleasas de restricción sensibles a la metilación. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

30 En algunas formas de realización, todo el ADN que se extrae de la muestra de orina se usa en la etapa de digestión. En algunas formas de realización, el ADN no se cuantifica antes de someterlo a digestión. En otras formas de realización, el ADN puede cuantificarse antes de su digestión.

Una "endonucleasa de restricción", utilizada aquí de manera intercambiable con una "enzima de restricción", se refiere a una enzima que corta el ADN en o cerca de secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas, conocidas como sitios de restricción.

40 Una endonucleasa de restricción "sensible a la metilación" es una endonucleasa de restricción que escinde su secuencia de reconocimiento solo si no está metilada (mientras que los sitios metilados permanecen intactos). Por lo tanto, el grado de digestión de una muestra de ADN por una endonucleasa de restricción sensible a la metilación depende del nivel de metilación, donde un nivel de metilación más alto protege de la escisión y, en consecuencia, da como resultado una digestión menor.

45 La al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede seleccionarse del grupo que consiste en: AatII, Acc65I, Accl, Acil, ACII, Afel, Agel, Apal, ApaLI, 30 Ascl, AsiSI, Aval, Avall, Bael, BanI, Bbel, BceAI, Bcgl, BfuCI, BgII, BmgBI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BseYI, BsiEI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BspDI, BsrBI, BsrFI, BssHII, BssKI, BstAPI, BstBI, BstUI, BstZ171, Cac8I, ClaI, DpnI, DrdI, EaeI, EagI, EagI-HF, EciI, EcoRI, EcoRI-HF, Faul, Fnu4HI, FseI, FspI, HaeII, HgaI, HhaI, HincII, HincII, HinfI, HinPII, HpaI, HpaII, HpyI66ii, HpyI88iii, Hpy99I, HpyCH4IV, KasI, MluI, MmeI, MspAII, MwoI, NaeI, NaeI, NgoNIV, Nhe-HFI, NheI, NlaIV, NotI, NotI-HF, NruI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.CviPII, PaeR71, PleI, PmeI, PmlI, PshAI, PspOMI, PvuI, RsaI, RsrII, SacII, Sall, Sall-HF, Sau3AI, Sau96I, ScrFI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SnaBI, TfiI, TscI, TseI, TspMI y ZraI. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

55 En algunas formas de realización, la muestra de orina puede someterse a digestión con una endonucleasa de restricción sensible a la metilación. En algunas formas de realización particulares, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede ser HhaI.

60 En algunas formas de realización, la muestra de orina puede someterse a digestión con una endonucleasa de restricción sensible a la metilación. En algunas formas de realización particulares, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede ser HinPII.

En algunas formas de realización, la digestión del ADN se puede llevar a cabo para completar la digestión. En algunas formas de realización, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede ser HhaI, y se puede lograr una digestión completa después de una o dos horas de incubación con la enzima a 37 °C.

65 En algunas formas de realización, la digestión del ADN se puede llevar a cabo para completar la digestión. En algunas formas de realización, la endonucleasa de restricción sensible a la metilación puede ser HinPII, y la digestión

completa puede lograrse después de una o dos horas de incubación con la enzima a 37 °C.

Amplificación de loci genómicos

5 Los términos "locus genómico" o "locus" tal como se utilizan aquí son intercambiables y se refieren a una secuencia de ADN en una posición específica en un cromosoma. La posición específica puede identificarse por la ubicación molecular, es decir, por los números de los pares de bases iniciales y finales en el cromosoma. Una variante de una secuencia de ADN en una posición genómica determinada se denomina alelo. Los alelos de un locus están
10 ubicados en sitios idénticos en cromosomas homólogos. Los loci incluyen secuencias de genes, así como otros elementos genéticos (p. ej., secuencias intergénicas).

Un "lugar de restricción" se usa aquí para describir un locus que contiene la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción sensible a la metilación que se usa en el método.

15 Un "lugar de control" y un "lugar de referencia interno" son intercambiables y se usan aquí para describir un locus cuya digestión, con la enzima de restricción aplicada en el paso de digestión, es independiente de la presencia o ausencia de cáncer. En algunas formas de realización, el locus de control es un locus que exhibe el mismo perfil de digestión y amplificación en el cáncer de vejiga y en el tejido sano. En algunas formas de realización, el locus de control es un locus desprovisto de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción aplicada en el paso de digestión.
20 Ventajosamente, el lugar de control es un interno. locus, es decir, un locus dentro de la muestra de ADN analizada, eliminando así la necesidad de muestras de control externas/adicionales.

En algunas formas de realización, el locus de restricción o los loci de restricción incluyen uno o más de los loci establecidos en SEQ ID NO: 1-15, como sigue:

- 25 SEQ ID NO: 1, corresponde a la posición 65676359 - 65676418 en el cromosoma 17, (KCNJ2 gene);
SEQ ID NO: 2, corresponde a la posición 21958446 - 21958585 en el cromosoma 9, (gen CDKN2A);
SEQ ID NO: 3, corresponde a la posición 336844 - 336903 en el cromosoma 6, (gen IRF4);
SEQ ID NO: 4, corresponde a la posición 33319507 - 33319636 en el cromosoma 21, (gen Olig2);
30 SEQ ID NO: 5, corresponde a la posición 166502151 - 166502220 en el cromosoma 6, región intergénica;
SEQ ID NO: 6, corresponde a la posición 896902 - 897031 en el cromosoma 18, (gen ADCYAP1);
SEQ ID NO: 7, corresponde a la posición 32747873 - 32748022 en el cromosoma 5, (gen NPR3);
SEQ ID NO: 8, corresponde a la posición 27949195 - 27949264 en el cromosoma 6, región intergénica;
SEQ ID NO: 9, corresponde a la posición 27191603 - 27191672 en el cromosoma 7, (gen HOXA9);
35 SEQ ID NO: 10, corresponde a la posición 170170302 - 170170361 en el cromosoma 16, región intergénica;
SEQ ID NO: 11, corresponde a la posición 30797737 - 30797876 en el cromosoma 15, región intergénica;
30 SEQ ID NO: 12, corresponde a la posición 7936767 - 7936866 en el cromosoma 1, región intergénica;
SEQ ID NO: 13, corresponde a la posición 170077565 - 170077634 en el cromosoma 1, (gen DNMT3);
16 SEQ ID NO: 14, corresponde a la posición 1727592 - 1727661 en el cromosoma 2, (gen PXDN);
40 y SEQ ID NO: 15, corresponde a la posición 72919092 - 72919231 en el cromosoma 8, (gen MSC).

Inesperadamente, los locus de restricción expuestos en SEQ ID NOs: 1-15 fueron identificados por los inventores de la presente invención como metilados diferencialmente entre tejido de vejiga canceroso y tejido de vejiga normal. Más particularmente, estos loci tienen una metilación aumentada en el tejido de cáncer de vejiga en comparación con el tejido
45 normal.

Cada uno de estos loci contiene dinucleótidos CG que están más metilados en el ADN del tejido de vejiga canceroso en comparación con el ADN del tejido de vejiga normal no canceroso. Ventajosamente, los dinucleótidos CG metilados diferencialmente se ubican dentro de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción sensibles a la metilación.
50

En algunas formas de realización, cada uno de estos loci puede contener al menos un sitio de restricción de una enzima de restricción sensible a la metilación en la que el dinucleótido CG está más metilado en células de cáncer de vejiga que en células normales, lo que significa que en el tejido canceroso un mayor número de las células contienen metilación en esta posición en comparación con el tejido normal. En algunas formas de realización, cada uno de estos loci puede contener al menos un sitio de restricción HhaI (GCGC). En algunas formas de realización, cada uno de estos loci puede contener al menos un sitio de restricción HinPII. La enzima de restricción sensible a la metilación escinde su secuencia de reconocimiento solo si no está metilada. Por lo tanto, una muestra de ADN que contenga un mayor porcentaje de moléculas de ADN en las que el dinucleótido CG del sitio de restricción esté metilado se digerirá en menor medida en comparación con una muestra de ADN que contenga un mayor porcentaje de moléculas de ADN en las que el dinucleótido CG no esté metilado. En base a los métodos descritos en el presente documento, la digestión del ADN mediante enzimas de restricción sensibles a la metilación es menos extensa para el ADN de muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga en comparación con el ADN de individuos normales (sanos). Sorprendentemente, se encontró que la diferencia en la eficiencia de la digestión establece diferentes patrones de amplificación en los pasos
55 posteriores de amplificación y cuantificación, lo que permite distinguir entre el ADN de un tejido de vejiga canceroso y el ADN de un tejido de vejiga normal.
60
65

En algunas formas de realización, cada uno de los loci establecidos en SEQ ID NO: 1-15 puede contener dinucleótidos CG adicionales cuyo estado de metilación no tiene relevancia ni influencia en el ensayo; solo la metilación en la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción (p. ej., HhaI o HinPII) es relevante.

5 En algunas formas de realización, el locus de control es como se establece en SEQ ID NO: 16, que corresponde a la posición 121380854 - 121380913 en el cromosoma 7 (región intergénica). En algunas formas de realización, el lugar de control, también denominado interno locus de referencia, no contiene una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción. En alguna forma de realización, la secuencia del locus de control permanece intacta (independientemente de su estado de metilación) cuando una muestra de ADN se digiere con una enzima de restricción sensible a la metilación.

10 En algunas formas de realización, la secuencia del locus de control presenta el mismo perfil de digestión y amplificación en tejido de cáncer de vejiga y en tejido de vejiga sano.

15 En algunas formas de realización, el locus de control comprende el locus expuesto en SEQ ID NO: 16 y el patrón de amplificación del locus de control después de la digestión con la enzima de restricción sensible a la metilación no se ve afectado por la metilación.

20 La ventaja de usar los loci de restricción establecidos en SEQ ID NO: 1-15 para diferenciar entre muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga y las de individuos sanos se ejemplifica a continuación usando las enzimas de restricción sensibles a la metilación HhaI y HinPII. La amplificación de cada uno de estos loci de restricción y el locus de control expuesto en SEQ ID NO: 16 después de la digestión con HhaI o con HinPII se llevó a cabo en grandes grupos de pacientes con cáncer e individuos sanos. El cálculo de las proporciones de señal entre los productos de amplificación de cada locus de restricción y el locus de control mostró proporciones de señal media significativamente más altas (al menos un orden de magnitud mayor) en el grupo de cáncer en comparación con el grupo de control.

25 En algunas formas de realización, el método comprende amplificar al menos un locus de restricción y al menos un locus genómico después de la digestión de la muestra de ADN.

30 Tal como se usa en el presente documento, "al menos un locus (de restricción/control)", puede abarcar un solo locus o una pluralidad de loci separados, de modo que, una frase como "al menos un locus de restricción que comprende el locus establecido en SEQ ID NO: 1 y el locus expuesto en SEQ ID NO: 2" indica que al menos estos dos loci genómicos separados están amplificados.

35 En algunas formas de realización, el método comprende amplificar el locus de restricción expuesto en SEQ ID NO: 1 y un locus de control, y opcionalmente al menos un locus de restricción adicional.

En algunas formas de realización, el método comprende amplificar un locus de restricción como se establece en SEQ ID NO: 1 y un locus de control como se establece en SEQ ID NO: 16.

40 En algunas formas de realización, el método comprende amplificar una pluralidad de loci de restricción (es decir, al menos dos loci de restricción) y un locus de control.

45 En algunas formas de realización, la pluralidad de lugares de restricción comprende un lugar de restricción como se establece en SEQ ID NO: 1 y un lugar de restricción como se establece en SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el método comprende la amplificación de un primer lugar de restricción como se establece en SEQ ID NO: 1 y comprende además la amplificación de un segundo locus de restricción como se establece en SEQ ID NO: 5.

50 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende además al menos un locus de restricción seleccionado de los loci establecidos en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11. En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende además un tercer y cuarto loci de restricción como se establece en las SEQ ID NO: 7 y 11, respectivamente.

55 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende además al menos un locus de restricción adicional seleccionado del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

60 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende el locus establecido como SEQ ID NO: 1 y comprende además uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce loci de restricción adicionales seleccionados del grupo que consta de SEQ ID NO: 2-15. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

65 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende los loci establecidos como SEQ ID NO: 1 y 5, y además comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o trece loci de restricción adicionales seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.

13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. Cada posibilidad representa un componente separado de la presente invención.

5 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende los loci establecidos como SEQ ID NO: 1, 5 y 7, y además comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce loci de restricción adicionales seleccionados del grupo que consta de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

10 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende los loci establecidos como SEQ ID NO: 1, 5, 7 y 11, y además comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once loci de restricción adicionales seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

15 En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción comprende los loci de restricción establecidos en SEQ ID NO: 1-15. En algunas formas de realización, la pluralidad de loci de restricción consiste en los loci de restricción establecidos en SEQ ID NO: 1-15. En algunas formas de realización, el método comprende amplificar una pluralidad de loci de restricción como se establece en SEQ ID NO: 1-15.

20 Como se usa en el presente documento, "amplificación" se refiere a un aumento en el número de copias de uno o más ácidos nucleicos diana particulares de interés. La amplificación generalmente se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de una mezcla de reacción de PCR que puede incluir un tampón adecuado complementado con la plantilla de ADN, polimerasa (generalmente Taq polimerasa), dNTP, cebadores y sondas (según corresponda), según corresponda, conocido en el arte.

25 El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, incluye formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. El término "oligonucleótido" también se usa aquí para incluir una forma polimérica de nucleótidos, típicamente de hasta 100 bases de longitud.

30 Un "producto de amplificación" se refiere colectivamente a moléculas de ácido nucleico de una secuencia diana particular que se generan y acumulan en una reacción de amplificación. El término generalmente se refiere a moléculas de ácido nucleico generadas por PCR utilizando un conjunto determinado de cebadores de amplificación.

35 Como se usa aquí, un "cebador" define un oligonucleótido que es capaz de aparearse (hibridarse con) una secuencia objetivo, creando así una región de doble cadena que puede servir como punto de iniciación para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas. La terminología "par de cebadores" se refiere aquí a un par de oligonucleótidos que se seleccionan para usarse juntos en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada mediante uno de los tipos de procesos de amplificación, preferiblemente PCR. Como se conoce comúnmente en la técnica, los cebadores pueden diseñarse para unirse a una secuencia complementaria en condiciones seleccionadas.

40 Los cebadores pueden tener cualquier longitud adecuada, según el formato de ensayo particular y las necesidades particulares. En algunas formas de realización, los cebadores pueden incluir al menos 15 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre 19 y 25 nucleótidos de longitud. Los cebadores pueden adaptarse para que sean especialmente adecuados para un sistema de amplificación de ácidos nucleicos elegido. Como se sabe comúnmente en la técnica, los cebadores de oligonucleótidos pueden diseñarse teniendo en cuenta el punto de fusión de hibridación de los mismos con su secuencia diana (Sambrook et al, *ibid*).

45 En algunas formas de realización, los loci de restricción y control pueden amplificarse a partir de la misma muestra de ADN (la muestra digerida) utilizando pares de cebadores inversos y directos diseñados como se sabe en la técnica para amplificar específicamente cada locus. En algunas formas de realización, los cebadores pueden diseñarse para amplificar un locus junto con sus secuencias flanqueantes 5' y 3'.

50 En algunas formas de realización, las secuencias flanqueantes en 5' pueden incluir entre 1 y 60 bases. En formas de realización adicionales, las secuencias flanqueantes en 5' tienen entre 10 y 50 bases. Por ejemplo, las secuencias flanqueantes 5' pueden incluir 10 bases, 15 bases, 20 bases, 25 bases, 30 bases, 35 bases, 40 bases, 45 bases o 50 bases inmediatamente aguas arriba del locus. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

55 En algunas formas de realización, las secuencias flanqueantes en 3' pueden incluir entre 1 y 90 bases. En algunas formas de realización, las secuencias flanqueantes en 3' pueden incluir entre 5 y 80 bases. En algunas formas de realización, las secuencias flanqueantes 3' pueden incluir 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 u 80 bases inmediatamente aguas abajo del locus. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

En algunas formas de realización, los cebadores pueden diseñarse para generar productos de amplificación de entre 75 y 225 bases de longitud.

En algunas formas de realización, el método implica la amplificación simultánea de más de una secuencia diana (al menos un locus de restricción y un locus de control) en la misma mezcla de reacciones, un proceso conocido como amplificación multiplex o coamplificación. Este proceso requiere el uso simultáneo de múltiples pares de cebadores. Como se sabe en la técnica, los cebadores pueden diseñarse de modo que puedan funcionar a la misma temperatura de hibridación durante la amplificación. En algunas formas de realización, los cebadores con temperatura de fusión similar (T_m) se utilizan en el método descrito en este documento. Una variación de T_m de entre unos 3°-5°C se considera aceptable para los cebadores utilizados en una agrupación.

En algunas formas de realización, todos los loci de restricción y control pueden amplificarse en una sola mezcla de reacción. En otras formas de realización, por ejemplo, debido a la limitación técnica de una máquina en particular, la muestra de ADN digerida se puede dividir en varias alícuotas, cada una de las cuales se complementa con pares de cebadores para la amplificación de uno o más loci de restricción y el locus de control. Por lo tanto, incluso si una muestra de ADN se divide en varias alícuotas, el locus de control se amplifica en cada alícuota, y se realiza el cálculo de las relaciones de señal para el locus de control y un locus de restricción que se amplifican juntos, es decir, a partir de la misma alícuota.

En algunas formas de realización, el método puede usar constructos de control que comprenden secuencias de ADN no humanas en la(s) etapa(s) de digestión y amplificación. En algunas formas de realización, los constructos de control comprenden secuencias de ADN artificiales (sintéticas). Los constructos de control pueden usarse para controlar los procesos de digestión y amplificación, por ejemplo, monitorizando la eficacia y calidad de los pasos de digestión y amplificación. En algunas formas de realización, los constructos de control y la muestra de ADN son digeridas por al menos una enzima de restricción sensible a la metilación, al mismo tiempo, y opcionalmente, dentro del mismo recipiente (por ejemplo, tubo de ensayo, vial y similares). En algunas formas de realización, el método puede incluir el paso de someter los constructos de control a digestión con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación, junto con la muestra de ADN. En algunas formas de realización, el método puede incluir agregar los constructos de control a la muestra de ADN y someter ambas a digestión con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación.

En algunas formas de realización, se puede usar una endonucleasa de restricción sensible a la metilación en el paso de digestión, junto con una o más de las siguientes constructos de control: una primera constructo de control que comprende una secuencia de ADN desprovista de una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación, y una segunda constructo de control que comprende una secuencia de ADN que contiene una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación y que está completamente desmetilada, de modo que la primera constructo de control permanece intacta, mientras que la segunda constructo de control se digiere por completo, o al menos parcialmente. En los pasos de amplificación subsiguientes, se pueden agregar cebadores (y opcionalmente sondas) que son específicos para los constructos de control. Detección de amplificación adecuada para el primer constructo concomitante con una amplificación suficientemente baja para el segundo constructo es indicativo de una digestión adecuada del ADN.

En algunas formas de realización, la detección de una amplificación adecuada para el primer constructo concomitante con una amplificación suficientemente baja para el segundo constructo puede incluir la detección de una diferencia de al menos 5 ciclos entre los ciclos de cuantificación (C_q) del primero y el segundo constructo de control en PCR en tiempo real. En algunas formas de realización, la diferencia puede ser de al menos 6 ciclos, al menos 7 ciclos o al menos 8 ciclos. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

En algunas formas de realización, los constructos de control primera y segunda pueden incluir SEQ ID NO: 17 y 18, respectivamente. En algunas formas de realización, los cebadores y las sondas para amplificar y detectar el primer constructo de control pueden incluir SEQ ID NO: 19 (directo), SEQ ID NO: 20 (inverso) y SEQ ID NO: 21 (sonda). En alguna forma de realización, los cebadores y sondas para amplificar y detectar el segundo constructo de control pueden incluir SEQ ID NO: 22 (directo), SEQ ID NO: 23 (inverso) y SEQ ID NO: 24 (sonda).

En algunas formas de realización, la amplificación de los loci genómicos puede llevarse a cabo mediante PCR en tiempo real (RT-PCR), también conocida como PCR cuantitativa (qPCR), en la que se realizan simultáneamente la amplificación y la detección de los productos de amplificación.

En algunas formas de realización, la detección de los productos de amplificación en RT-PCR se puede lograr utilizando sondas de polinucleótidos, típicamente sondas de polinucleótidos marcadas con fluorescencia.

Como se usa en el presente documento, "sondas de polinucleótidos" o "sondas de oligonucleótidos" son intercambiables y se refieren a polinucleótidos marcados que son complementarios a subsecuencias específicas dentro de las secuencias de ácidos nucleicos de loci de interés, por ejemplo, dentro de la secuencia de un locus de restricción o un locus de control. En algunas formas de realización, la detección se logra mediante el uso de ensayos TaqMan basados en moléculas indicadoras y extintoras combinadas (Roche Molecular Systems Inc.). En dichos ensayos, las sondas de polinucleótidos tienen un resto fluorescente (fluoróforo) unido a su extremo 5' y un extintor unido al extremo 3'. Durante la

amplificación por PCR, las sondas de polinucleótidos se hibridan selectivamente con sus secuencias diana en la plantilla y, a medida que la polimerasa replica la plantilla, también escinde las sondas de polinucleótidos debido a la actividad de la nucleasa 5' de la polimerasa. Cuando las sondas de polinucleótidos están intactas, la estrecha proximidad entre el extintor y el resto fluorescente normalmente da como resultado un bajo nivel de fluorescencia de fondo. Cuando se escinden las sondas de polinucleótidos, el inhibidor se desacopla del resto fluorescente, dando como resultado un aumento de la intensidad de la fluorescencia. La señal fluorescente se correlaciona con la cantidad de productos de amplificación, es decir, la señal aumenta a medida que se acumulan los productos de amplificación.

Tal como se usa en el presente documento, "hibridar selectivamente con" (así como "hibridación selectiva", "hibridar específicamente con" e "hibridación específica") se refieren a la unión, duplicación o hibridación de una molécula de ácido nucleico (como un cebador o sonda) preferentemente a una secuencia de nucleótidos complementaria particular en condiciones estrictas. El término "condiciones estrictas" se refiere a las condiciones en las que una molécula de ácido nucleico se hibridará preferentemente con su secuencia diana y, en menor medida, o no lo hará en absoluto, con otras 10 secuencias no diana. Una "hibridación rigurosa" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos depende de la secuencia y difiere en diferentes condiciones, como se conoce en la técnica.

Las sondas de polinucleótidos pueden variar en longitud. En algunas formas de realización, las sondas de polinucleótidos pueden incluir entre 15 y 30 bases. En formas de realización adicionales, las sondas de polinucleótidos pueden incluir entre 25 y 30 bases. En algunas formas de realización, las sondas de polinucleótidos pueden incluir entre 20 y 30 bases, por ejemplo, 20 bases, 21 bases, 22 bases, 23 bases, 24 bases, 25 bases, 26 bases, 27 bases, 28 bases, 29 bases, 30 bases. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención.

Las sondas de polinucleótidos pueden diseñarse para unirse a cualquiera de las cadenas de la plantilla. Las consideraciones adicionales incluyen la T_m de las sondas de polinucleótidos, que preferiblemente debe ser compatible con la de los cebadores. Puede usarse software informático para diseñar los cebadores y las sondas.

Como se indicó anteriormente, los métodos descritos en el presente documento pueden implicar la amplificación simultánea de más de una secuencia diana (al menos un locus de restricción y un locus de control) en la misma mezcla de reacción. Para distinguir entre múltiples secuencias diana que se amplifican en paralelo, se pueden usar sondas de polinucleótidos marcadas con distintos colores fluorescentes.

En algunas formas de realización, las sondas de polinucleótidos forman pares de fluoróforo/apagador como se conoce en la técnica e incluyen, por ejemplo, FAM-TAMRA, FAM-BHQ1, Yakima 30 Yellow-BHQ1, ATTO550-BHQ2 y ROX-BHQ2.

En algunas formas de realización, las combinaciones de colorantes pueden ser compatibles con el termociclador de RT-PCR de elección.

En algunas formas de realización, la fluorescencia puede controlarse durante cada ciclo de PCR, lo que proporciona un gráfico de amplificación que muestra el cambio de las señales fluorescentes de las sondas en función del número de ciclo.

En el contexto de RT-PCR, se utiliza la siguiente terminología:

"Ciclo de cuantificación" ("Cq") se refiere al número de ciclo en el que la fluorescencia aumenta por encima de un umbral, establecido automáticamente por software o manualmente por el usuario. En algunas formas de realización, el umbral puede ser constante para todos los loci y puede establecerse de antemano, antes de llevar a cabo la amplificación y detección. En otras formas de realización, el umbral se puede definir por separado para cada locus después de la ejecución, en función del nivel máximo de fluorescencia detectado para este locus durante los ciclos de amplificación.

"Umbral" se refiere a un valor de fluorescencia utilizado para la determinación de Cq. En algunas formas de realización, el valor umbral puede ser un valor por encima de la fluorescencia de referencia y/o por encima del ruido de fondo y dentro de la fase de crecimiento exponencial de la gráfica de amplificación.

"Línea de base" se refiere a los ciclos iniciales de PCR donde hay poco o ningún cambio en la fluorescencia.

Se puede usar software de computadora para analizar gráficos de amplificación y determinar la línea de base, el umbral y Cq.

Después de la digestión con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación, se amplifican con gran eficacia loci en los que se metila el dinucleótido CG en el sitio de reconocimiento de la enzima, porque las moléculas de ADN están protegidas de la digestión. El resultado son valores de Cq relativamente bajos porque los productos de amplificación detectables se muestran después de un número relativamente pequeño (bajo) de ciclos de amplificación. Por el contrario, los loci en los que el dinucleótido CG en el sitio de reconocimiento de la enzima no está metilado se cortan más extensamente durante el paso de digestión y, por lo tanto, dan como resultado valores de Cq más altos en el paso de amplificación y cuantificación (es decir, muestran productos de amplificación detectables después de un número relativamente alto de ciclos de amplificación).

En formas de realización alternativas, la amplificación y la detección de productos de amplificación pueden llevarse a cabo mediante PCR convencional utilizando cebadores marcados con fluorescencia seguido de electroforesis capilar de productos de amplificación. En algunas formas de realización, después de la amplificación, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis capilar y se cuantifican las señales fluorescentes. En algunas formas de realización, un electroferograma que traza el cambio en las señales fluorescentes en función del tamaño (pb) o el tiempo desde la inyección pueden ser generados, donde cada pico en el electroferograma corresponde al producto de amplificación de un solo locus. La altura del pico (proporcionada, por ejemplo, utilizando "unidades fluorescentes relativas", rFU) puede representar la intensidad de la señal del locus amplificado. Puede usarse software informático para detectar picos y calcular las intensidades de fluorescencia (altura del pico) de un conjunto de loci cuyos productos de amplificación se corrieron en la máquina de electroforesis capilar, y posteriormente las relaciones entre las intensidades de señal.

Para las muestras de ADN digeridas con una enzima de restricción sensible a la metilación, por ejemplo, HhaI o HinPII, los loci en los que el dinucleótido CG en el sitio de reconocimiento de la enzima está metilado producen una señal relativamente fuerte (pico más alto) en el electroferograma. Por el contrario, los loci en los que el dinucleótido CG en el sitio de reconocimiento de la enzima no está metilado producen una señal relativamente débil (pico inferior) en el electroferograma.

En algunas formas de realización, las etiquetas fluorescentes de los cebadores incluyen cualquiera de fluoresceína, FAM, lisamina, ficoeritrina, rodamina, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX, JOE, HEX, NED, VIC y ROX.

Proporción de señal

El término "proporción" o "proporción de señal" tal como se usa en el presente documento se refiere a la proporción entre las intensidades de las señales obtenidas de la coamplificación de un par de loci genómicos en una sola muestra de ADN (en la misma mezcla de reacción), particularmente coamplificación de un locus de restricción y un locus de control.

Como se usa en el presente documento, una "relación SEQ ID NO: X" se refiere a la relación entre la intensidad de la señal del locus establecido en la SEQ ID NO: X y la intensidad de la señal de un locus de control, después de la coamplificación de este par de loci en una muestra de ADN digerida con una enzima de restricción como se detalla en este documento.

El término "intensidad de la señal", como se usa en el presente documento, se refiere a una medida que refleja la cantidad de productos de amplificación específicos del locus correspondientes a la cantidad inicial de copias intactas del locus. Sin embargo, la intensidad de la señal puede no indicar cantidades reales de productos de amplificación/loci intactos y puede no implicar el cálculo de cantidades absolutas de productos de amplificación/loci intactos. Por lo tanto, para calcular las proporciones de las señales de amplificación, puede que no se necesite una curva estándar o ADN de referencia, ya que no es necesario calcular las concentraciones reales de ADN o el nivel de metilación del ADN por se.

En algunas formas de realización ejemplares, la amplificación y detección de productos de amplificación se llevan a cabo mediante RT-PCR donde la intensidad de la señal de un locus específico puede ser representada por el Cq calculado para este locus. La relación de señal en este caso puede ser representada por el siguiente cálculo: $2^{(Cq \text{ de locus de control} - Cq \text{ de locus de restricción})}$.

En formas de realización ejemplares adicionales, la detección de productos de amplificación se lleva a cabo mediante electroforesis capilar en la que la intensidad de la señal de un locus específico es el número de unidades relativas de fluorescencia (rfus) de su pico correspondiente. La relación de señal se puede calcular dividiendo las alturas de los picos de cada locus de restricción por la altura del pico de un locus de control.

Según la invención, calcular una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación de un locus de restricción y un locus de control en una muestra de ADN comprende: (i) determinar la intensidad de señal del producto de amplificación del locus de restricción; (ii) determinar la intensidad de la señal del producto de amplificación del locus de control; y (iii) calcular una relación entre las dos intensidades de señal.

En algunas formas de realización, calcular una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación de un locus de restricción y un locus de control en la muestra de ADN comprende determinar el Cq para cada locus y calcular la diferencia entre el Cq del locus de control y el Cq de el lugar de restricción. En algunas formas de realización, el cálculo comprende además aplicar la siguiente fórmula: $2^{(Cq \text{ del locus de control} - Cq \text{ del locus de restricción})}$.

En algunas formas de realización, calcular una relación de señal puede ser calcular una relación entre el locus de restricción establecido en SEQ ID NO: 1 y un locus de control.

En algunas formas de realización, una pluralidad de loci entre los lugares establecidos en SEQ ID NO: 1-15 se

amplifican en el que el método comprende calcular las proporciones entre cada uno de los loci establecidos en SEQ ID NO: 1-15 y un locus de control, por ejemplo, entre el locus establecido en SEQ ID NO: 1 y el locus de control, entre el locus establecido en SEQ ID NO: 2 y el locus de control, etc.

5 En algunas formas de realización, el software de ordenador puede ser utilizado para calcular una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación.

Relación de referencia

10 Los términos "relación de referencia", "relación de señal de referencia" se usan indistintamente y se refieren a una relación de intensidad de señal determinada en el ADN de una fuente conocida. Una relación de referencia para un par dado de loci de restricción y control puede representarse de varias formas. En algunas formas de realización, la relación de referencia para un par dado de loci puede ser una relación única. En algunas formas de realización, la relación de referencia para un par dado de loci puede ser un valor estadístico, tal como el valor medio de un gran conjunto de relaciones de referencia, obtenido de un gran conjunto de muestras de ADN de una fuente conocida, por ejemplo, el valor medio determinado en un gran grupo de pacientes con cáncer o un valor medio determinado en un gran grupo de individuos sanos.

20 En otras formas de realización, la proporción de referencia para un par dado de loci puede ser una pluralidad de proporciones, tal como una distribución de proporciones determinada para este par de loci en un gran conjunto de muestras de ADN de una fuente conocida. La relación de referencia puede ser una escala de referencia.

25 Una escala de referencia para un par dado de loci puede incluir proporciones de señales medidas para este par de loci en una pluralidad de muestras de ADN de la misma fuente de referencia. Por ejemplo, una escala de referencia de pacientes con cáncer de vejiga de referencia o una escala de referencia de individuos sanos de referencia. En otras formas de realización, una escala de referencia para un par dado de loci puede incluir proporciones de señales tanto de individuos sanos como enfermos, es decir, una única escala que combina proporciones de referencia de ambas fuentes. Por lo general, cuando se utiliza una sola escala, los valores se distribuyen de manera que los valores de las personas sanas se encuentran en un extremo de la escala, por ejemplo, por debajo de un límite, mientras que los valores de los pacientes con cáncer se encuentran en el otro extremo de la escala, por ejemplo, por encima del corte. En algunas formas de realización, una relación de señal calculada para una muestra de ADN analizada de una fuente desconocida puede compararse con la escala de referencia de relaciones de referencia de personas sanas y con cáncer, y la puntuación de probabilidad puede ser una puntuación asignada a la relación de señal calculada en función de su posición dentro de la escala. Cuanto mayor sea la relación de señal calculada, mayor será la puntuación que se le asigne y, en consecuencia, la probabilidad con respecto al cáncer de vejiga puede ser alta.

40 Los términos "proporción de referencia de cáncer de vejiga" o "proporción de referencia en ADN de cáncer de vejiga" se refieren indistintamente a la proporción de intensidad de señal medida entre un locus de restricción dado y un locus de control dado en ADN de muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga. La relación de referencia del cáncer de vejiga representa la relación de intensidad de la señal en el ADN del cáncer de vejiga, es decir, el ADN de un tejido de vejiga canceroso. La relación de referencia de cáncer de vejiga puede ser una relación única, un valor estadístico o una pluralidad de relaciones (p. ej., distribución), como se detalla anteriormente.

45 Los términos "proporción de referencia sana", "proporción de referencia normal" o "proporción de referencia en ADN sano" se refieren indistintamente a la relación de intensidad de la señal medida entre un locus de restricción dado y un locus de control dado en muestras de orina de individuos normales. Un individuo "sano" o "normal" se define aquí como un individuo sin enfermedades de la vejiga o síntomas detectables, enfermedades asociadas a la vejiga, incluido el cáncer de vejiga, determinadas por métodos de diagnóstico convencionales. La relación de referencia saludable representa la relación de intensidad de la señal en el ADN de la vejiga normal, es decir, el ADN de un tejido de la vejiga normal no canceroso. La relación de referencia saludable puede ser una relación única, un valor estadístico o una pluralidad de relaciones (p. ej., distribución), como se detalla anteriormente.

50 En algunas formas de realización, el método descrito en el presente documento comprende la determinación previa de proporciones de referencia a partir de ADN de vejiga cancerosa. En algunas formas de realización, el método de la presente invención comprende la determinación previa de proporciones de referencia a partir de ADN de vejiga normal.

60 Como se indicó anteriormente, una relación de señal puede determinarse mediante varios métodos, incluida, por ejemplo, la medición de picos después de la electroforesis capilar o el cálculo de Cq después de la RT-PCR. Debe entenderse que las proporciones de referencia y las proporciones medidas para una muestra analizada de una fuente desconocida para determinar el cáncer de vejiga se obtienen usando el método descrito en este documento.

Determinación del cáncer de vejiga

65 En algunas formas de realización, el método descrito en el presente documento se basa en la evaluación de las

proporciones de señales calculadas para el ADN de una muestra de orina de una fuente desconocida en comparación con las proporciones de referencia para identificar el cáncer de vejiga.

5 En algunas formas de realización, las relaciones de señal calculadas indican que el ADN es ADN de cáncer de vejiga.

Una persona experta en la técnica apreciaría que la comparación de las relaciones de señal calculadas para una muestra analizada con las relaciones de señal de referencia correspondientes se puede realizar de varias formas, utilizando diversos medios estadísticos.

10 En algunas formas de realización, comparar una relación de señal de prueba calculada para un par dado de loci con una relación de señal de referencia comprende comparar la relación de señal de prueba con un único valor de referencia. El valor de referencia único puede corresponder a un valor medio obtenido para relaciones de señal de referencia de una gran población de pacientes con cáncer o individuos sanos. En otras formas de realización, comparar una relación de señal de prueba calculada para un par dado de loci con una relación de señal de referencia comprende comparar la relación de señal de prueba con una distribución, o escala, de una pluralidad de relaciones de señal de referencia.

20 Pueden emplearse medios estadísticos conocidos para determinar si la relación de señal calculada entre un locus de restricción dado y un locus de control corresponde a la relación de referencia de cáncer de vejiga o a la relación de referencia normal. En algunas formas de realización, la detección de aproximación de clase de una relación calculada a la relación de referencia de cáncer de vejiga identifica a un sujeto como un sujeto que tiene cáncer de vejiga. Por el contrario, en algunas formas de realización, la detección de una aproximación de clase de una relación calculada a la relación de referencia normal identifica a un sujeto como un sujeto que no tiene cáncer de vejiga.

25 El método puede comprender comparar una relación de señal calculada con su relación de referencia de cáncer de vejiga correspondiente (es decir, con una relación de señal determinada para el mismo par de loci en el cáncer de vejiga) para obtener una puntuación de probabilidad que refleje la probabilidad de que la relación de señal calculada sea una proporción de cáncer de vejiga. Cuanto mejor se aproxime la relación de señal calculada a la relación de referencia, mayor será la puntuación de probabilidad y, en consecuencia, la probabilidad de que la relación de señal calculada sea una relación de cáncer de vejiga. La puntuación de probabilidad puede basarse en la posición relativa de la relación de señal calculada dentro de la distribución de las relaciones de referencia del cáncer de vejiga.

30 En algunas formas de realización, el método comprende comparar una pluralidad de proporciones de señales, calculadas para una pluralidad de loci de restricción con respecto a un locus de control, con sus correspondientes proporciones de referencia de cáncer de vejiga.

35 En algunas formas de realización, un patrón de proporciones de señales puede analizarse utilizando medios estadísticos y un algoritmo informático para determinar si representa un patrón de cáncer de vejiga o un patrón sano normal. Los algoritmos ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento WO 2011/070441, asignado al solicitante de la presente invención. Los algoritmos pueden incluir, entre otros, algoritmos de aprendizaje automático y reconocimiento de patrones.

40 En algunas formas de realización de ejemplo, cada relación calculada (para cada par de restricción y locus de control) puede ser comparada contra una escala de relación de referencia generadas para este par desde un gran conjunto de muestras de orina de pacientes con cáncer y de personas que no padecen cáncer. La escala puede representar relaciones de señal calculadas entre el par de locus de restricción y locus de control en un gran número de muestras de pacientes con cáncer e individuos normales. La escala puede presentar un valor umbral, también denominado en adelante 'corte o 'umbral predefinido', por encima del cual se encuentran relaciones de referencia correspondientes a cáncer de vejiga y por debajo se encuentran relaciones de referencia correspondientes a individuos sanos, o viceversa.

45 En algunas formas de realización, las proporciones más bajas, en la parte inferior de la escala y/o por debajo de un límite, pueden provenir de muestras de individuos normales (sanos, es decir, que no padecen cáncer de vejiga), mientras que las proporciones más altas en la parte superior de la escala y/o por encima de un límite predeterminado, puede ser de los pacientes con cáncer. Para cada relación (entre cada locus de restricción y el locus de control), se puede dar una puntuación basada en su posición relativa en la escala, y las puntuaciones individuales para cada locus se combinan para dar una puntuación única. Las puntuaciones individuales pueden sumarse para dar una sola puntuación. Las puntuaciones individuales se pueden promediar para dar una puntuación única. La puntuación única puede usarse para determinar si el sujeto tiene cáncer, donde una puntuación por encima de un umbral predefinido es indicativa de cáncer de vejiga.

50 Una puntuación puede ser un número entre 0 y 100 que refleja la probabilidad de que la relación de señal calculada sea una relación de cáncer de vejiga, siendo 0 la probabilidad más baja y siendo 100 la probabilidad más alta. Puede determinarse una puntuación de umbral, en la que una puntuación igual o superior es indicativa de cáncer de vejiga. El umbral puede ser, por ejemplo, 40, 50, 60 o 70.

5 Para cada proporción calculada (entre cada locus de restricción y el locus de control), la probabilidad de que represente ADN de cáncer de vejiga puede determinarse en función de la comparación con la proporción de referencia de cáncer de vejiga correspondiente y la relación de referencia normal, y se puede asignar una puntuación (puntuación de probabilidad). En consecuencia, los valores de probabilidad individuales calculados para cada relación (para cada locus) se combinan (por ejemplo, se suman o se promedian) para dar una puntuación combinada. La puntuación combinada puede usarse para determinar si el sujeto tiene cáncer, donde una puntuación combinada por encima de un umbral predefinido es indicativa de cáncer de vejiga.

10 Por tanto, en algunas formas de realización, se determina una puntuación de umbral, o de corte, por encima (o por debajo) de la cual se identifica que el sujeto tiene cáncer de vejiga. La puntuación umbral diferencia la población de sujetos sanos de la población de sujetos no sanos.

15 En algunas formas de realización, el método de la presente invención comprende proporcionar una puntuación de umbral.

En algunas formas de realización, la determinación de la puntuación umbral incluye la medición de proporciones de señales en una gran población de sujetos que están sanos o tienen cáncer de vejiga.

20 En algunas formas de realización, los valores de umbral son valores estadísticamente significativos. La importancia estadística a menudo se determina comparando dos o más poblaciones y determinando un intervalo de confianza (IC) y/o un valor p. En algunas formas de realización, los valores estadísticamente significativos se refieren a intervalos de confianza (IC) de aproximadamente 90 %, 95 %, 97,5 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % y 99,99 %, mientras que los valores p preferidos son inferiores a aproximadamente 0,1, 0,05, 0,025, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 o menos de 0,0001. Cada posibilidad representa una forma de realización separada de la presente invención. Según algunas formas de realización, el valor p de la puntuación umbral es como máximo 0,05.

30 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se refiere a un valor medible, pretende abarcar variaciones de +/-10 %, más preferiblemente +/-5 %, incluso más preferiblemente +/-1 %, y aún más preferiblemente +/-0,1% del valor especificado.

35 El método puede comprender además comparar la relación de señal calculada entre un locus de restricción dado y un locus de control con su correspondiente relación de referencia de vejiga normal para obtener una puntuación de probabilidad, en el que detectar una puntuación de probabilidad baja para dicha relación con respecto a la correspondiente relación de referencia saludable es indicativa que el sujeto tiene cáncer de vejiga.

40 En algunas formas de realización, la sensibilidad de los métodos descritos en el presente documento puede ser de al menos aproximadamente el 75 %. En algunas formas de realización, la sensibilidad de los métodos puede ser de al menos alrededor del 80%. En algunas formas de realización, la sensibilidad del método puede ser de al menos alrededor del 85%. En algunas formas de realización, la sensibilidad de los métodos puede ser de al menos alrededor del 90%.

45 En algunas formas de realización, la "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico como se usa en el presente documento se refiere al porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de "verdaderos positivos"). En consecuencia, los individuos enfermos no detectados por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos que no están enfermos y que dan negativo en el ensayo se denominan "negativos verdaderos". La "especificidad" del ensayo de diagnóstico es uno (1) menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de personas sin la enfermedad que dan positivo. Si bien un método de diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método brinda una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

50 En algunas formas de realización, la especificidad de los métodos descritos en el presente documento puede ser de al menos aproximadamente el 65 %. En algunas formas de realización, la especificidad de los métodos puede ser de al menos aproximadamente 70%. En algunas formas de realización, la especificidad del método puede ser de al menos aproximadamente el 75 %. En algunas formas de realización, la especificidad de los métodos puede ser de al menos aproximadamente el 80 %.

Tratamiento del cáncer de vejiga

60 También se describen métodos para tratar el cáncer de vejiga, que incluyen la identificación de cánceres de vejiga según el método de la presente invención y la administración a dicho sujeto de terapia contra el cáncer.

Los métodos para tratar el cáncer de vejiga pueden incluir uno o más de: cirugía para extirpar el tumor, partes de la vejiga o toda la vejiga en casos más graves; terapia de radiación (externa o interna); quimioterapia (sistémica o regional); e inmunoterapia, como se conoce en la técnica.

65 Kits

También se describe un kit para la identificación de cáncer de vejiga en un sujeto humano. El kit es para la identificación del cáncer de vejiga según el método de la presente invención. El kit puede comprender al menos una enzima de restricción sensible a la metilación; pares de cebadores para la amplificación de al menos un locus de restricción y al menos un locus de control; medios para detectar productos de amplificación del al menos un locus de restricción y al menos un locus de control; y manual de instrucciones para llevar a cabo la identificación del cáncer de vejiga. El manual de instrucciones puede ser un manual de instrucciones electrónico.

El manual de instrucciones puede proporcionar índices de referencia de cáncer de vejiga y, opcionalmente, índices de referencia saludables.

El manual de instrucciones puede incluir instrucciones para realizar los pasos del método descritos anteriormente.

El manual de instrucciones puede incluir instrucciones que indiquen la correlación entre la(s) relación(es) de señal y la(s) relación(es) de referencia de cáncer de vejiga y, opcionalmente, con la(s) relación(es) de referencia saludable.

El manual de instrucciones puede proporcionar instrucciones para calcular una puntuación de marcador, es decir, una puntuación para un lugar de restricción dado. En algunas formas de realización, el manual de instrucciones puede proporcionar instrucciones para calcular una puntuación total para una pluralidad de puntos de marcador. En algunas formas de realización, el manual de instrucciones puede proporcionar una puntuación umbral para determinar el cáncer de vejiga, por encima de la cual se identifica que un sujeto tiene cáncer. En otras formas de realización, el manual de instrucciones puede proporcionar una puntuación umbral para determinar el cáncer de vejiga, por debajo de la cual se identifica que un sujeto tiene cáncer.

El kit puede comprender una única endonucleasa sensible a la metilación. En algunas formas de realización, la endonucleasa sensible a la metilación es HhaI.

El kit puede comprender una única endonucleasa sensible a la metilación. En algunas formas de realización, la endonucleasa sensible a la metilación es HinfII.

El kit puede comprender además un software de ordenador. El software de ordenador puede ser un software de ordenador que calcule al menos una de las intensidades de señal, las proporciones de señal y los valores de marcador.

El kit puede comprender: HhaI; pares de cebadores complementarios a al menos un locus de restricción y al menos un locus de control como se describe en el presente documento; y sondas de polinucleótidos fluorescentes complementarias al al menos un locus de restricción y al menos un locus de control.

El kit puede comprender: HinfII; pares de cebadores complementarios a al menos un locus de restricción y al menos un locus de control como se describe en el presente documento; y sondas de polinucleótidos fluorescentes complementarias al al menos un locus de restricción y al menos un locus de control.

Los cebadores ejemplares para amplificar los loci de restricción establecidos en SEQ ID NOs: 1-15 se establecen en SEQ ID NOs: 25-155 de la siguiente manera (for=directo, rev=inverso):

Locus 1 for: SEQ ID NOs: 25-29; Locus 1 rev.: SEQ ID NOs: 30-35
 Locus 2 for.: SEQ ID NOs: 36-38; Locus 2 rev.: SEQ ID NOs: 39-42
 Locus 3 for.: SEQ ID NOs: 43-51; Locus 3 rev.: SEQ ID NOs: 52-61
 Locus 4 for.: SEQ ID NOs: 62-64; Locus 4 rev.: SEQ ID NOs: 65-67
 Locus 5 for.: SEQ ID NOs: 68-70; Locus 5 rev.: SEQ ID NOs: 71-73
 Locus 6 for: SEQ ID NOs: 74-76; Locus 6 rev.: SEQ ID NOs: 77-79 Locus 7 for.: SEQ ID NOs: 80-85; Locus 7 rev.: SEQ ID NOs: 86-89
 Locus 8 for.: SEQ ID NOs: 90-92; Locus 8 rev.: SEQ ID NOs: 93-95
 Locus 9 for.: SEQ ID NOs: 96-99; Locus 9 rev.: SEQ ID NOs: 100-102
 Locus 10 for.: SEQ ID NOs: 103-106; Locus 10 rev.: SEQ ID NOs: 107-112
 Locus 11 for.: SEQ ID NOs: 113-116; Locus 11 rev.: SEQ ID NOs: 117-120
 Locus 12 for.: SEQ ID NOs: 121-125; Locus 12 rev.: SEQ ID NOs: 126-130
 Locus 13 for.: SEQ ID NOs: 131-135; Locus 13 rev.: SEQ ID NOs: 136-140
 Locus 14 for.: SEQ ID NOs: 141-145; Locus 14 rev.: SEQ ID NOs: 146-151
 Locus 15 for.: SEQ ID NOs: 152-153; Locus 15 rev.: SEQ ID NOs: 154-155.

Los cebadores ejemplares para amplificar el locus de control expuestos en SEQ ID NO: 16 se exponen en SEQ ID NOs: 156 - 167 como sigue:

Control for: SEQ ID NOs: 156 - 161;

Control rev.: SEQ ID NOs: 162-167.

5 El kit puede comprender al menos uno de un primer constructo de control y un segundo constructo de control, comprendiendo cada uno secuencias de ADN artificial/no humano como se describe anteriormente.

10 El kit puede comprender constructos de control primera y segunda como se describe anteriormente. El kit puede comprender uno o más recipientes llenos con al menos un par de cebadores de nucleótidos. Cada par de cebadores de nucleótidos incluidos en el kit puede incluir cebadores que son complementarios a las subsecuencias dentro de un locus de restricción seleccionado de los loci de restricción establecidos en SEQ ID NOs: 1-15 o a las secuencias flanqueantes de los mismos, en donde dicho par de cebadores de nucleótidos está diseñado para amplificar selectivamente un fragmento del genoma que incluye el lugar.

15 El kit puede comprender pares de cebadores para amplificar selectivamente la combinación de loci descrita anteriormente.

El kit puede comprender además pares de cebadores de nucleótidos para amplificar selectivamente los constructos de control artificiales primera y segunda.

20 El kit puede incluir además sondas de oligonucleótidos para detectar productos de amplificación de los loci amplificados utilizando los cebadores del kit. Cada sonda de oligonucleótido puede ser complementaria a una subsecuencia dentro de un locus y puede ser capaz de hibridarse con la misma. Las sondas de oligonucleótidos pueden estar marcadas con fluorescencia.

25 El kit puede incluir además al menos un ingrediente adicional necesario para la digestión del ADN, la amplificación de loci y la detección de productos de amplificación, como la ADN polimerasa y la mezcla de nucleótidos.

30 El kit puede incluir además tampones de reacción adecuados para digestión y amplificación, y un protocolo escrito para realizar la identificación del cáncer de vejiga. El protocolo escrito puede comprender instrucciones para realizar cualquiera de los pasos descritos en el presente documento, incluidos, entre otros, parámetros de digestión de ADN, parámetros de ciclos de PCR, análisis de relación de señales y comparación con relaciones de referencia.

35 Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente ciertas formas de realización de la invención. Sin embargo, de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención. Un experto en la técnica puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios descritos en este documento sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1 - Loci genómicos para la detección de cáncer de vejiga

45 Se identificaron quince (15) loci genómicos humanos que tenían una metilación aumentada en tejido con cáncer de vejiga en comparación con tejido normal (Tabla 1 a continuación, SEQ ID NOs: 1-15). Se descubrió que estos loci permiten distinguir entre el ADN de pacientes con cáncer de vejiga y el de individuos normales (no afectados por cáncer de vejiga).

50

55

60

65

Tabla 1 - Loci genómicos

SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico	Descripción*
5 1	TTTTAgGGGTCTGCGCGCTCTCGCC TGGCTGCTGGGAAGGABGGCTGGGA GGCGCTGAA	Posición 65676359 - 65676418 en el cromosoma 17, gen KCNJ2
10 2	TCCAGGCGCGCCGACCGCTCAAGCG CTCCAGGTCCACCCGGCGGAGGGCA GAGAAAAGCGCGACCCGCGCGGCCCG CAGGCTTGCAAGAAGAAAACGAGT GTTATATAATGAGTCTCAGTGGTTG CTCACAA TGCCAGGCCG	Posición 21958446 - 21958585 en el cromosoma 9, gen CDKN2A
15 3	GGCTGATACCAGAGAGGACCCGGA GCGCGAACCCAGAGGTTGACCTCCA GGCAGCGCAG	Posición 336844 - 336903 en el cromosoma 6, gen IRF4
20 4	GGGGCGCCAAATGCCACGTGTTGA TGAAACCAGTGAGATGGAAACAGG CGGCGGGAAACCAGACAGAGGAAG AGCTAGGGAGGAGACCCAGCCCCG GATCCTGGGTCCGACAGGGTTTCCG CGCGCAT	Posición 33319507 - 33319636 en el cromosoma 21, gen Olig2
25 5	TCTGAGAAGTGTCCCTCCCTCTCTCT TATAAAAACAGGACTTGTTCGCGAG GTCAGCGCG CGCATCGAGT	Posición 166502151 - 166502220 en el cromosoma 6, región intergénica
30 6	ATCAGCGCGAACTATTCGTTAAGTG GCCTTAAAACACCCCTGGTTTCACCCCT CAGCTATTTTCAAGTTCCTCGTGTGCC TGGCACTTTCCTCGTGGGAGAAAGCA CCGGAGGGTGGGACGCGCCACAGT CTG	Posición 896902 - 897031 en el cromosoma 18, gen ADCYAP1
35 7	TGCTCTGCGCAGCGTGGAGGGCAAC GGGACTGGGAGCGCGCTTCTGCCCGC CGGGCACTCGCTTCCAGGTGGCTTA CGAGGATTCAGACTGTGGGAACCGT GCGCTTTCAGCTTGGTGGACCGCG TGGCGCGCGCGCGGGGCGCCAAGCC	Posición 32747873 - 32748022 en el cromosoma 5, gen NPR3
40 8	CGCGCAGAACTTTGCGGTGGCGCTT AGCGCCTCCTTTGCCAGACCCCTTCC CGCTTTGCCGCGCCAGAA	Posición 27949195 - 27949264 en el cromosoma 6, región intergénica
45 9	CGTAAATCGCCGGTCTAACTCATGTT GGCTGGGGGGCTCCCGGCGCGCGC GGAGAGGCTG GGGTGC'GCCC	Posición 27191603 - 27191672 en el cromosoma 7, gen HOXA9
50 10	CGATTCAGAGGGCCCCCGTCCGGAGC TGTCGGAGATTGAGCGCGCGCGGTC CCGGGATCTC	Posición 170170302 - 170170361 en el cromosoma 16, región intergénica

(Continuación)

SEQ ID NO.	Secuencia de ácido nucleico	Descripción*
11	CGCGCGGCAGCCCTCCCGTGCGCGCA GGCTCGGGTGCCTTGTTCGCGGGG TGAATFGTGAAGAACCATCGCGGG TCCTTCTGCTGAGGCCGCGGACAC CGTGACCTCGCTGCTCTGGGTCTGC AGGGAAACCTAGGAA	Posición 30797737 - 30797876 en el cromosoma 15, región intergénica
12	TGACCTTTAGGGGCTGTTACTCTCAG ACCAGGCCCCAGCAAGCACCCGGCGCA TTTACGTGGATCTGACCCCTGCAA GCACCGGCCCGACCCGCTAGCGG	Posición 7936767 -7936866 en el cromosoma 1, región intergénica
13	AGAACTTCGTGGGCAGGTAAGCGCG CAGGGCGCGGAGTAAGGATGCGGC AGTGGGGCGACCCCGCTGCGG	Posición 170077565 - 170077634 en el cromosoma 1, gen DNM3:
14	CTGECTGCGCTCACTACGGGTTTTT AGTTGGCGCCTTAATGTTTTGTAACA CTTTTAGAGCGCTTGCTCT	Posición 1727592 - 1727661 en el cromosoma 2, gen PXDN
15	GGCCGGGAAGCGCGGGGTGAGAAA GCGAGGTGGGTGGCGAGAAGCGTGA GCGCCCCCTGCTGACCCCGGGGAG CGTGGACTACGAGTTGGCGCCCAAG TCCAGAAATCCGCGCGCACCGCGGTA AGCTGCGCCTTTTAAA	Posición 72919092 -72919231 en el cromosoma 8, gen MSC
16	AGACTAACTTTTCTCTTGTACAGAAT CATCAGGCTAAATTTTGGCATTATT TCAGTCCT	Posición 121380854 - 121380913 en el cromosoma 7, región intergénica
* La descripción se refiere a la posición en el constructo genómico hg18		

Ejemplo 2 - Prueba del panel de loci genómicos

Se obtuvieron muestras de orina de 69 pacientes con cáncer de vejiga y 40 sujetos sanos, no afectados por cáncer de vejiga. La población de pacientes con cáncer de vejiga estaba compuesta por 55 hombres y 14 mujeres, con edades comprendidas entre 41 y 92 años (media 72). Los 69 cánceres 5 eran TCC (carcinoma de células de transición) con etapas distribuidas: Ta (carcinoma papilar no invasivo) - 42 pacientes, T1 - 10 pacientes, T2 - 10 pacientes, CIS (carcinoma in situ) - 8 pacientes. La población sana estaba compuesta por 33 hombres y 7 mujeres, con edades comprendidas entre 55 y 88 años (media 70). El ADN se extrajo de todas las muestras de orina con el mini kit de sangre QIAamp (QIAGEN, Hilden, Alemania).

El ADN de cada muestra se procesó como se describe en la Figura 2. En resumen, el ADN extraído de cada muestra se sometió a digestión con la metilación endonucleasa de restricción sensible (HhaI o HinPII). La reacción de digestión (volumen total 120 microlitros) incluyó todo el ADN extraído (no cuantificado) y HhaI o HinPII en un tampón de digestión. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 2 horas.

A continuación, se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (RT) en las muestras de ADN digeridas para amplificar en cada muestra de ADN los 15 loci de restricción detallados en la Tabla 1 anterior y un locus de control como se establece en SEQ ID NO: 16 (ver Tabla 1). El locus de control es un locus que no contiene una secuencia de reconocimiento de HhaI o HinPII y permanece intacto cuando una muestra de ADN se digiere con la enzima de restricción independientemente de su estado de metilación. Este locus de control, también denominado interno! locus de referencia, tiene un patrón de amplificación que después de la digestión con HhaI o con HinPII no se ve afectado por la metilación.

En particular, cada muestra de ADN digerido se dividió en ocho (8) alícuotas que contenían 10 microlitros del ADN digerido. Se complementaron siete alícuotas con 25 pares de cebadores para la amplificación de dos loci de

restricción de los quince y el locus de control (el locus de control debe amplificarse en cada alícuota). La octava alícuota se complementó con un par de cebadores para la amplificación de un locus de restricción restante y el locus de control. Se amplificaron amplicones de entre 75 y 225 bases, cada uno de los cuales contenía uno de los 16 loci junto con secuencias flanqueantes 5' y 3' de 5-80 bases.

Cada reacción de amplificación (volumen total de 25 microlitros) contenía además dNTP y un tampón de reacción. Para permitir la detección de productos de amplificación durante la amplificación, se agregaron a la reacción sondas de polinucleótidos marcadas con fluorescencia (una para cada locus). Se usaron las siguientes etiquetas fluorescentes: FAM, JOE, ROX y CY5. Se realizaron reacciones de RT-PCR en un instrumento ABI 7500 FastDx con el siguiente programa de PCR: activación inicial de la enzima a 95°C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60° C.

Después de la RT-PCR, se analizaron gráficos de PCR cuantitativos que mostraban el cambio de las señales fluorescentes de las sondas en función del número de ciclo para calcular el ciclo de cuantificación (Cq) para cada locus.

Las Figuras 1A y 1B muestran gráficos PCR cuantitativos ejemplares del locus de control y dos loci de restricción en una muestra de un paciente con cáncer (Fig. 1B) y un sujeto sano (Fig. 1A). En la muestra de un paciente con cáncer, en la que los loci de restricción tienen niveles elevados de metilación y, por lo tanto, permanecieron prácticamente intactos cuando se digirieron con HhaI, los dos loci de restricción se amplificaron con gran eficacia, es decir, aumentaron aproximadamente un ciclo más tarde que el locus de control (que no se cortó en absoluto). En la muestra sana, en la que los loci de restricción se caracterizan por niveles bajos de metilación y, por lo tanto, se cortaron mucho cuando se digirieron con HhaI, la eficiencia de amplificación fue mucho menor que la eficiencia de amplificación del locus de control. Como puede deducirse de la figura, los valores de Cq de los loci de restricción difieren entre pacientes con cáncer y sujetos sanos.

Para cada muestra, se calcularon las relaciones entre la intensidad de la señal de cada uno de los loci de restricción 1-15 (SEQ ID NO: 1-15) y la intensidad de la señal del locus de control (SEQ ID NO: 16), de la siguiente manera: el Cq fue determinado para cada locus de restricción y para el locus de control. Los valores de Cq se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$2^{(Cq \text{ de locus de control} - Cq \text{ de locus de restricción})}$$

Debe entenderse que el cálculo se realizó para un locus de restricción y un locus de control que se coamplificaron en la misma alícuota.

El valor numérico obtenido para cada locus de restricción con respecto al locus de control representa la relación de señal entre este locus de restricción y el locus de control.

En total, se calcularon quince relaciones (es decir, quince cálculos según la fórmula anterior) para cada muestra. La Tabla 2 resume las proporciones medias y la desviación estándar (Std) de cada locus con respecto al locus de control en el grupo de cáncer y en el grupo de control. Como puede verse en la tabla, las proporciones obtenidas para el ADN extraído de muestras de cáncer de vejiga son significativamente diferentes de las proporciones obtenidas para el ADN extraído de muestras de voluntarios sanos (sin cáncer de vejiga). Específicamente, se observaron proporciones significativamente más altas (al menos un orden de magnitud más altas) para cada locus en el grupo de cáncer en comparación con el grupo de control, lo que destaca la ventaja en utilizar estos loci para diferenciar entre muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga y las de individuos normales/sanos.

Tabla 2 - proporciones de señales

	Locus (SEQ ID NO)	Cáncer		Control	
		Relación media	Est.	Relación media	Est.
5					
10	1	0.13980	0.30183	0.00534	0.01060
	2	0.01190	0.02754	0.00090	0.00182
	3	0.01599	0.02506	0.00270	0.00152
15	4	0.01760	0.02701	0.00244	0.00352
	5	0.06652	0.11102	0.00529	0.01228
	6	0.02459	0.04334	0.00263	0.00291
20	7	0.03484	0.05963	0.00182	0.00733
	8	0.03583	0.09940	0.00262	0.00439
	9	0.05781	0.10562	0.00505	0.00612
25	10	0.02006	0.03538	0.00416	0.00294
	11	0.00992	0.02105	0.00041	0.00062
	12	0.00324	0.00770	0.00019	0.00023
30	13	0.03143	0.05330	0.00214	0.00204
	14	0.05309	0.08935	0.00107	0.00270
	15	0.02872	0.05965	0.00087	0.00172

35

A continuación, se calcularon la sensibilidad, especificidad y área bajo una curva ROC (AUC) con respecto a la identificación de cáncer de vejiga para el locus establecido en SEQ ID NO: 1 y para varias combinaciones, o subconjuntos, de loci. Los datos se resumen en la Tabla 3.

40

Tabla 3 - Sensibilidad, especificidad y AUC

	Locí (SEQ ID NO)	Sensibilidad	Especificidad	AUC
45	1	75%	67%	0.81
	1+5	79%	70%	0.82
50	1+5+7+11	82%	74%	0.85
	1+5+7+11+12	85%	75%	0.89
	1+5+7+11+13	84%	76%	0.89
55	1+5+7+11+14	85%	76%	0.90
	Todos (1-15)	94%	84%	0.93

60 Ejemplo 3 - Diagnóstico de pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga

Se obtuvieron 5 muestras de orina evacuada de 222 pacientes con antecedentes de cáncer de vejiga, sometidos a vigilancia de rutina. Un subgrupo de 40 pacientes (18%) tenía cáncer de vejiga recurrente comprobado por biopsia. La distribución de estadios fue: 16-Ta, 13-T1, 3-T2 y 12-CIS y la distribución de grados fue 19-LG y 26-HG. Se observa que el número de muestras clasificadas y clasificadas suman más de 40, ya que algunas muestran más de 10 de un estadio/grado (p. ej., tumor en estadio T1 junto con CIS en el mismo paciente).

65

El ADN se extrajo, digirió y amplificó como se describe en el Ejemplo 2 anterior.

Para cada muestra, se calcularon las relaciones entre la intensidad de la señal de cada uno de los loci de restricción 1-15 (SEQ ID NO: 1-15) y la intensidad de la señal del locus de control (SEQ ID NO: 16), como se describe anteriormente.

El índice de metilación promedio, normalizado con respecto a un grupo de referencia de índices de metilación (siendo el más alto 100 y el más bajo 0), también denominado "EpiScore", fue de 69 y 85 para pacientes con tumores LG y HG, respectivamente, por lo tanto significativamente correlacionado con el grado del tumor ($p = 0,006$).

El EpiScore promedio por etapa se muestra en la Tabla 4. El análisis estadístico utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los EpiScores Ta y T2 ($p = 0,0077$) y entre Ta y CIS ($p=0,0155$).

Tabla 4 – Promedio EpiScore

Etapa	Promedio EpiScore
Ta	68,6
T1	84,4
T2	90,7
CIS	84,4

La sensibilidad y la especificidad globales fueron del 90 % y el 83 %, respectivamente (Figs. 3A, 5 y 3B). La sensibilidad por etapa y grado se muestra en las Figs. 4A y 4B, respectivamente. El valor predictivo negativo para este estudio de cohortes fue del 97,4 %.

Los resultados de citología estaban disponibles en 173 de estos casos. El rendimiento de la citología resultó con una sensibilidad del 40 % y una especificidad del 96 %.

De las 173 muestras, 15 eran de pacientes con tumores. Los seis (6) tumores que fueron detectados por citología, también fueron detectados por el método descrito en este documento y los dos (2) tumores que no fueron detectados por el método también fueron detectados por citología. Sorprendentemente, solo se detectaron siete (7) tumores mediante el método de la invención.

El resultado indica que el método descrito en el presente documento es un ensayo sensible y específico independiente del operador para la detección de cáncer de vejiga en muestras de orina evacuadas. Además, en comparación con la citología, el método descrito en este documento tiene una sensibilidad significativamente mayor con una especificidad ligeramente menor. Por lo tanto, el método de la invención bien puede reemplazar a la citología de orina en el control de pacientes con cáncer de vejiga sin riesgo de recurrencias.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar el cáncer de vejiga en un sujeto humano, comprendiendo el método:
- 5 (a) aplicar ADN de una muestra de orina obtenida del sujeto a digestión con al menos una endonucleasa de restricción sensible a la metilación para obtener ADN tratado con endonucleasa de restricción;
- (b) coamplificar a partir del ADN tratado con endonucleasa de restricción al menos un locus de restricción que comprende el locus expuesto en SEQ ID NO: 1 y un locus de control, generando así un producto de amplificación para cada locus;
- 10 (c) calcular una relación entre las intensidades de señal de los productos de amplificación de cada uno de dichos al menos un locus de restricción y el locus de control; y
- (d) comparar la relación con una o más relaciones de referencia obtenidas de una pluralidad de muestras de ADN derivadas de una fuente conocida, identificando así el cáncer de vejiga en el sujeto humano.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que una o más relaciones de referencia comprenden una relación de referencia saludable.
3. El método de la reivindicación 1, en el que una o más proporciones de referencia comprenden una relación de referencia de cáncer de vejiga.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, que comprende amplificar en el paso (b) el locus de restricción establecido en SEQ ID NO: 1 y un locus de control, y al menos un locus de restricción adicional.
5. El método de la reivindicación 4, en el que al menos un locus de restricción adicional comprende el locus establecido en SEQ ID NO: 5.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que al menos un locus de restricción adicional comprende además el locus establecido en SEQ ID NO: 7 y el locus establecido en SEQ ID NO: 11.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en el que al menos un locus de restricción adicional comprende además al menos un locus de restricción seleccionado del grupo de loci establecido en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.
- 35 8. El método de la reivindicación 6, en el que al menos un locus de restricción adicional comprende los loci establecidos en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15.
9. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- 40 proporcionar un primer y un segundo constructo de control que comprenden secuencias de ADN no humano, en el que el primer constructo de control comprende una secuencia de ADN desprovista de una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación, y el segundo constructo de control comprende una secuencia de ADN que contiene una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación y que está completamente desmetilada;
- 45 digerir los constructos de control primera y segunda con la endonucleasa de restricción sensible a la metilación; y
- amplificar los constructos de control primero y segundo;
- en el que la detección de una amplificación adecuada para el primer constructo concomitante con una baja o ausencia de amplificación para el segundo constructo es indicativa de una digestión adecuada del ADN.
- 50 10. El método de la reivindicación 1, en el que el paso (a) se realiza utilizando una endonucleasa de restricción sensible a la metilación; preferiblemente
- 55 donde la endonucleasa de restricción sensible a la metilación es HhaI; o
- donde la endonucleasa de restricción sensible a la metilación es HinPII.
11. El método de la reivindicación 1, en el que el locus de control es un locus desprovisto de una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción sensible a la metilación, preferiblemente en el que el locus de control es el locus establecido en SEQ ID NO: 16.
- 60 12. El método de la reivindicación 1, en el que el paso (b) se realiza usando PCR en tiempo real.
13. El método de la reivindicación 12, en el que el método comprende además agregar sondas fluorescentes para detectar específicamente los productos de amplificación del al menos un locus de restricción y el locus de control.
- 65 14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho cálculo de una relación entre las intensidades de señal de los

productos de amplificación de cada uno de dichos al menos un locus de restricción y el locus de control comprende determinar el ciclo de cuantificación (Cq) para cada locus y calcular el $2^{(Cq \text{ locus de control} - Cq \text{ locus de restricción})}$, preferiblemente donde la relación de referencia de cáncer de vejiga correspondiente es $2^{(Cq \text{ locus de control} - Cq \text{ locus de restricción})}$ y donde el ADN de referencia es ADN de cáncer de vejiga.

5

15. El método de la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de vejiga

se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de células de transición, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, sarcoma y carcinoma de células pequeñas; o es carcinoma de células de transición.

10

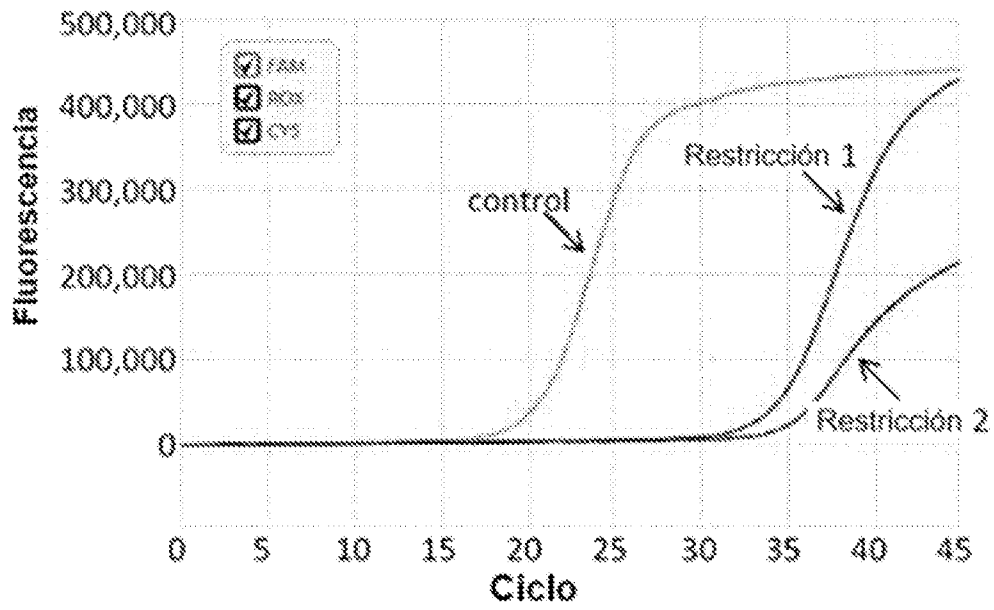


Figura 1A

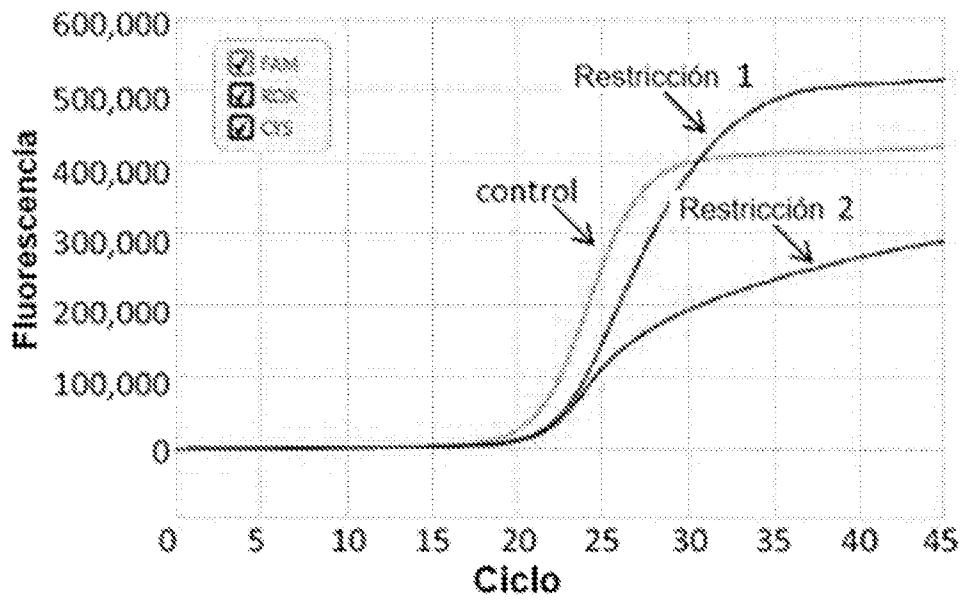


Figura 1B

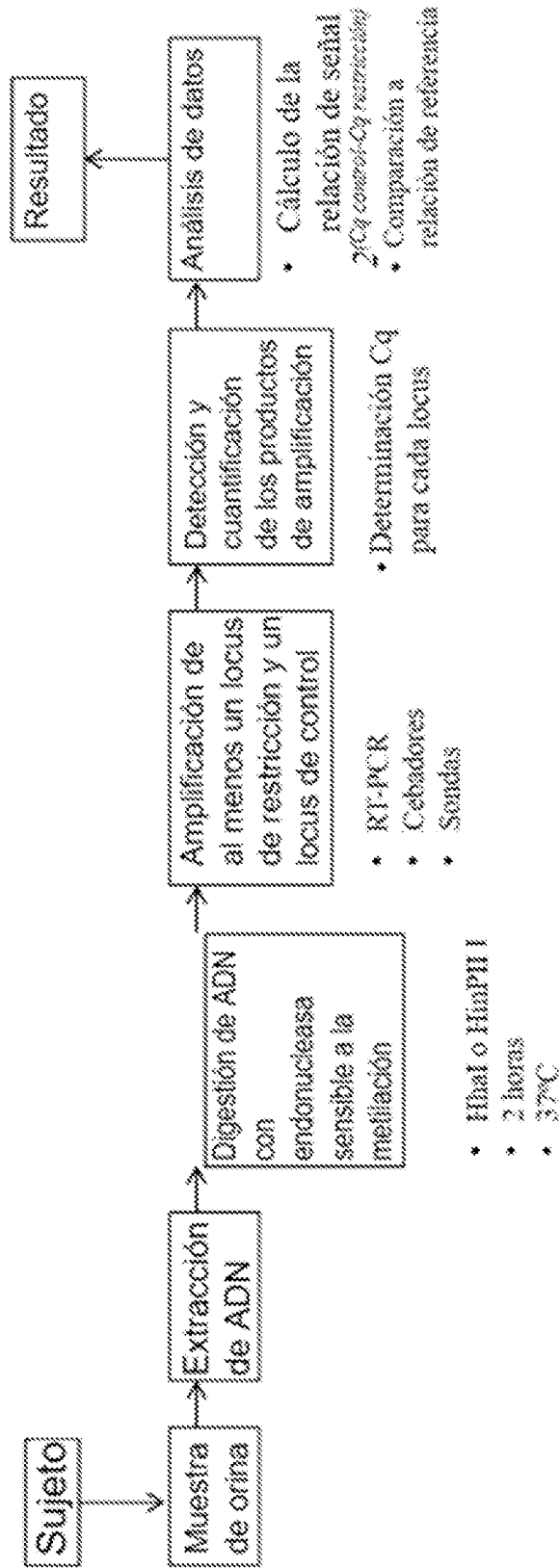


Figura 2

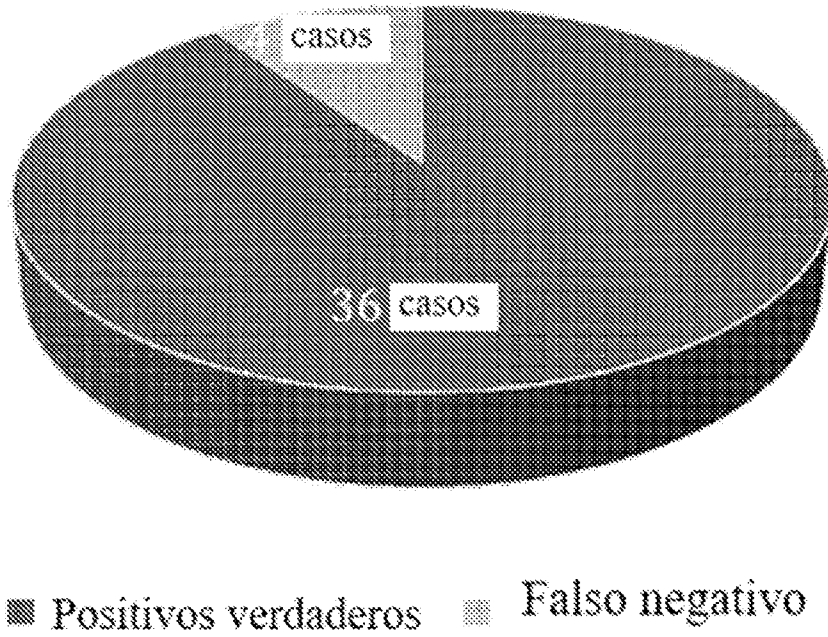


Figura 3A

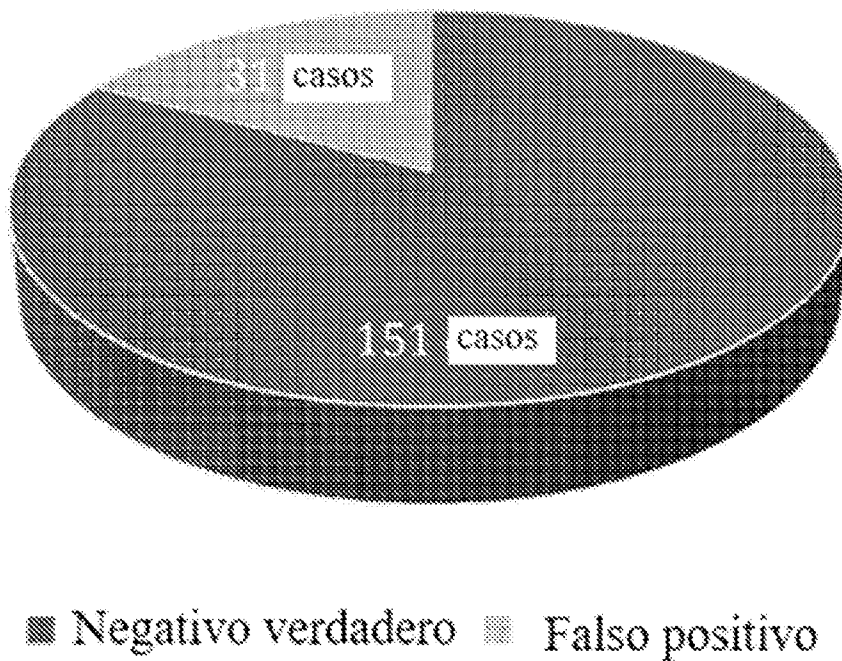


Figura 3B

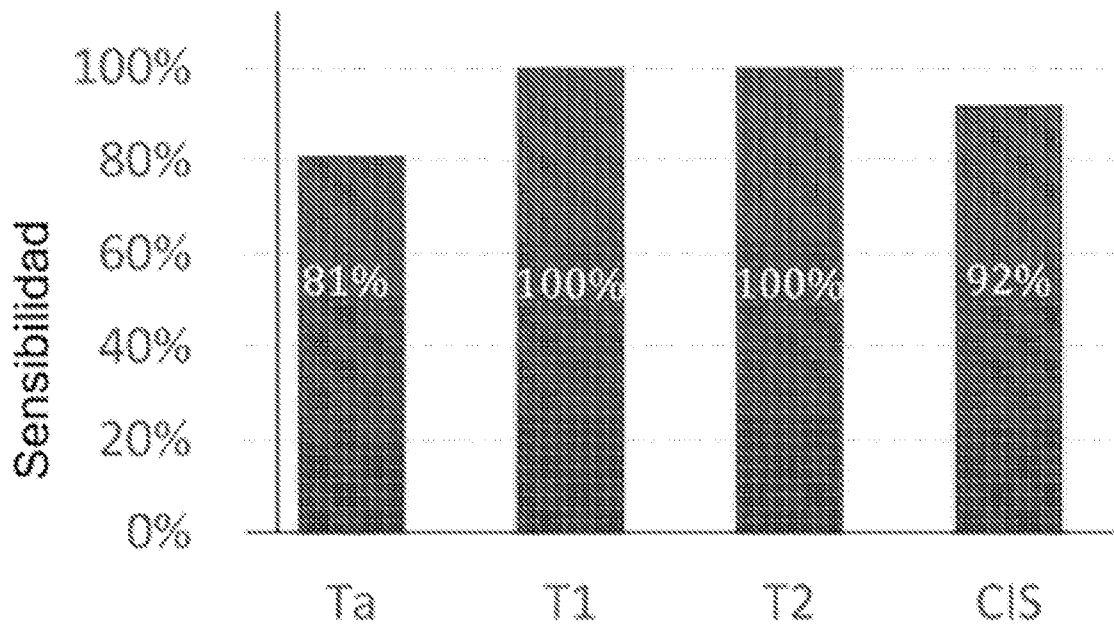


Figura 4A

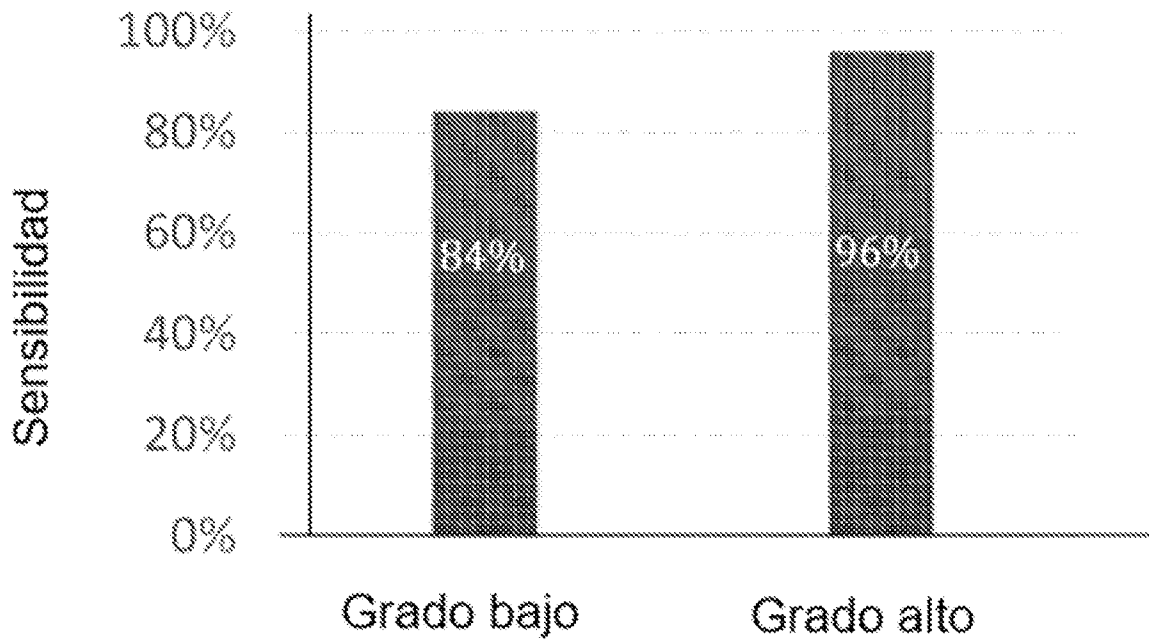


Figura 4B