



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 032**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00303615 .9**

96 Fecha de presentación : **28.04.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1048740**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2000**

54 Título: **Métodos y conjuntos de sondas para determinar la prognosis del cáncer de próstata.**

30 Prioridad: **28.04.1999 US 301062**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.05.2011

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL
EDUCATION AND RESEARCH
2000 First Street Southwest
Rochester, Minnesota 55095, US**

72 Inventor/es: **Jenkins, Robert B. ;
Sato, Kazunari y
Qian, Junqi**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 360 032 T3

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

DESCRIPCIÓN

La invención se refiere a un método para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata.

5 El cáncer de próstata constituye la enfermedad maligna más común en los hombres, y se ha estimado que provocó aproximadamente 39.000 muertes como consecuencia de éste en 1998 en los Estados Unidos. Hasta aproximadamente un 59% de los casos de cáncer de próstata se presentan como tumores localizados, es decir, en las etapas A y B, en las que el tumor está confinado en la próstata. La etapa clínica C, en la cual el tumor se localiza clínicamente en el área periprostática, pero que se extiende a través de la cápsula prostática y que puede implicar a las vesículas seminales, representa aproximadamente del 14% al 18% de los casos. Los restantes 10% al 18% de los casos son metastásicos o en una etapa clínica D.

10 En general, el comportamiento clínicamente agresivo está asociado a una acumulación de aberraciones genéticas en algunos tumores sólidos, tales como cáncer de colon y cáncer de vejiga. También pueden aparecer cambios genéticos similares múltiples en el carcinoma de próstata. Ya que el cáncer de próstata es una causa principal de muerte en hombres en los Estados Unidos, la identificación de pacientes cuyo tumor está abocado a progresar rápidamente es un objetivo prioritario de investigación actual. Desafortunadamente, dentro del grupo humano de
15 hombres con un grado y etapa simple del cáncer de próstata, hay pocos marcadores de la agresividad clínica.

El documento WO9620288A, considerado la técnica anterior más cercana, describe un método diagnóstico de la progresión del cáncer de próstata, en el que se determina la presencia de un segmento amplificado de banda del cromosoma 8q24 y del centrómero del cromosoma 8 de una muestra de tumor de próstata humano.

20 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el locus 8p del cromosoma 8, el centrómero del cromosoma 8, y el locus 8q24 sirven como indicadores pronósticos para el cáncer de próstata. La evaluación de la presencia o ausencia de estos marcadores, por ejemplo por técnicas de hibridación, proporciona un método sensible para determinar la progresión y prognosis o pronóstico del cáncer de próstata, y lleva a un tratamiento más precoz en ciertos casos.

25 En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- (i) determinar en una muestra biológica del sujeto la pérdida, la ganancia o el cambio en el número de copia del locus 8p21-22 del cromosoma 8, el cromosoma 8, y el gen c-myc del cromosoma 8; y
- (ii) correlacionar cualquier pérdida, ganancia o cambio en el número de copia con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata para el sujeto.

30 Puede realizarse la determinación de la pérdida, ganancia o cambio en el número de copia (también denominado determinación del Incremento Adicional de un gen) por cualquier método adecuado que sea conocido por cualquier experto en la técnica.

Preferiblemente, el método comprende:

- 35 (a) determinar un modelo de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas al ácido nucleico de una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho conjunto comprende una sonda al locus 8p21-22 del cromosoma 8, una sonda al centrómero del cromosoma 8, y una sonda al gen c-myc en el cromosoma 8; y
- (b) correlacionar dicho modelo de hibridación con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata para dicho sujeto.

40 El conjunto de sonda cromosómica debe ser suficientemente específico para permitir la detección del locus 8p del cromosoma 8; cromosoma 8 y el locus 8q24, y preferiblemente incluye una sonda al locus 8p del cromosoma 8 y una sonda al locus 8q24 del cromosoma 8, y además puede incluir una sonda al centrómero del cromosoma 8. El locus 8p puede definirse además como 8p21-22 y el locus 8q24 puede definirse además como el gen c-myc. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo que consiste en resecciones de tejido de próstata, biopsias de tejido de próstata, lavados de orina y vejiga. Las biopsias de tejido de próstata son particularmente útiles.

45 La prognosis o pronóstico del sujeto se determina como pobre cuando el modelo de hibridación indica la pérdida del locus 8p, la ganancia del cromosoma 8 y el incremento adicional de número de copia de c-myc respecto al número de copia del centrómero. El modelo de hibridación se puede determinar hibridando el conjunto de sondas cromosómicas al ácido nucleico de la muestra biológica y detectando la presencia o ausencia de la sonda hibridada. Las sondas se pueden marcar, usando cualquier método, incluyendo el marcaje fluorescente.

50 La invención también abarca a un kit para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer en un sujeto. El kit comprende un conjunto de sondas cromosómicas, que comprende una sonda al locus 8p21-22 del cromosoma 8, una sonda al centrómero del cromosoma 8 y una sonda al gen c-myc o al cromosoma 8. El locus 8p puede definirse además como 8p21-22 y el locus 8q24 puede definirse además como el gen c-myc. Las sondas se pueden marcar, por ejemplo, con fluorescencia. El kit además puede incluir instrucciones que indiquen la prognosis o pronóstico que se determina
55 como pobre cuando un modelo de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas indica la pérdida del locus 8p, la

ganancia del cromosoma 8 y un incremento adicional del número de copia de c-myc respecto al número de copia del centrómero.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por cualquier experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puedan usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento para poner en práctica la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación.

En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá sobre otras definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

La figura 1 es un esquema que representa posibles rutas genéticas en el carcinoma de próstata. Los paréntesis indican el número de paciente. -8p: pérdida de 8p, +8: ganancia del cromosoma 8, IA c-myc: incremento adicional del gen c-myc. La pérdida de 8p y la ganancia del cromosoma 8 (modelo Ganancia 8p-Ganancia 8cen-Ganancia c-myc) son los dos posibles primeros acontecimientos genéticos del cromosoma 8 en el carcinoma de próstata.

Las figuras 2A y 2B proporcionan datos tabulados para el caso 37, usando sondas específicas del locus para 8p y c-myc, y una sonda del centrómero 8. En la figura 2A, se proporciona el tanto por ciento de núcleos con diversas combinaciones de señal de CEP 8 y c-myc. En la figura 2B, se proporciona el tanto por ciento de núcleos con diversas combinaciones de señal de CEP 8 y 8p.

Las figuras 3A y 3B son diagramas de dispersión que indican la distribución del centrómero 8, c-myc, y el número de copia de 8p para la cohorte de pacientes pT₃N₀M₀ en etapa 144 (3A) y 143 (3B). La figura 3A indica el tanto por ciento de núcleos con señales de CEP 8 ≥ 3 versus la relación c-myc:CEP 8. Este diagrama de dispersión de puntos de CEP 8 y c-myc resalta los grupos de tumores sin anomalía aparente de 8cen y c-myc (diamantes azules), ganancia de 8cen y ganancia de c-myc (diamantes amarillos), ganancia de 8cen e IA de c-myc (diamantes naranjas), e IA de c-myc solo (diamantes rojos). También muestra dos tumores con pérdida de 8cen (diamantes verdes). Dos tumores con pérdida de 8cen y IA de c-myc se incluyeron en el grupo c-myc solo (diamante rojo). La figura 3B indica el tanto por ciento de núcleos con 0-1 señales de CEP 8 versus la relación 8p:CEP 8. Este diagrama de dispersión de los puntos de CEP 8 y 8p resalta los grupos de tumores sin anomalía aparente de 8cen y 8p (diamantes azules), ganancia de 8cen y ganancia de 8p (diamantes amarillos), ganancia de 8cen y pérdida de 8p (diamantes rojos), y pérdida de 8p solo (diamantes naranjas). También muestra 4 tumores con pérdida de 8cen (diamantes verdes).

Las figuras 4A y 4B are curvas de supervivencia de Kaplan-Meier sin progresión (A) y curvas de supervivencia de Kaplan-Meier específicas de causa (B) para pacientes cuyos tumores tienen una ganancia normal, o IA de c-myc. Los paréntesis indican el número de pacientes con riesgo a los 5 y 10 años.

Las figuras 5A y 5B son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier sin progresión (A) y curvas de supervivencia de Kaplan-Meier específicas de causa (B), respectivamente para pacientes cuyos tumores tienen un modelo Normal-Normal-Normal, Pérdida-Normal-Normal, Pérdida-Ganancia-Ganancia o Pérdida-Ganancia-IA para 8p-8cen-c-myc. Los paréntesis indican el número de pacientes con riesgo a los 5 y 10 años.

La invención proporciona ventajosamente un método rápido y sensible para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata en un sujeto. En un aspecto preferido, el modelo de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas se determina en una muestra biológica del sujeto y el modelo de hibridación se correlaciona con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata.

Hibridación in situ

El modelo de hibridación típicamente se evalúa por hibridación *in situ*. En general, la hibridación *in situ* incluye las etapas de fijar una muestra biológica, hibridar una sonda cromosómica al ADN diana contenido dentro de la muestra biológica fijada, lavar para eliminar la unión no específica, y detectar la sonda hibridada. Una "muestra biológica" es una muestra que contiene células o material celular. Los ejemplos no restrictivos de muestras biológicas incluyen resecciones de tejido de próstata, biopsias de tejido de próstata, lavados de orina y vejiga.

Las muestras de tejido típicamente se fijan y se ponen en parafina para su seccionamiento o su congelación y corte en secciones delgadas. Por ejemplo, las muestras de tejido pueden fijarse en soluciones de alcohol ácidas, soluciones de acetona ácidas, o aldehídos tales como formaldehído, paraformaldehído, y glutaraldehído. Las muestras de tejido fijadas pueden embeberse en parafina u otro medio de inclusión después de su deshidratación y aclarado. En general, los tejidos fijados en soluciones acuosas se deshidratan con una serie de lavados alcohólicos, tales como lavados tanto en etanol al 70%, 95% como en etanol absoluto. Después de eliminar el agente de deshidratación, por ejemplo, con xileno, tolueno, cloroformo u otras sustancias que sean miscibles con el medio de inclusión tales como parafina, el tejido se embebe en el medio de inclusión. El tejido embebido en parafina puede seccionarse, por ejemplo, con un microtomo de un espesor adecuado, tal como de aproximadamente 3 μ M a aproximadamente 8 μ M, y se pone

en un portaobjetos. Los plásticos tales como metacrilato de metilo, metacrilato de glicol, araldeto, y epon son ejemplos alternativos al medio de inclusión de parafina. De forma alternativa, la muestra de tejido se puede congelar rápidamente de aproximadamente -20° C a aproximadamente -70° C. El tejido congelado puede cortarse en un espesor adecuado con un criostato y ponerse en un portaobjetos.

5 Antes de la hibridación *in situ*, el medio de inclusión debe retirarse de los tejidos embebidos. La desparafinación, por ejemplo, se realiza por una serie de aclarados en xileno, alcohol y agua. El tejido desparafinado se deshidrata y se puede tratar con ácido cítrico y pepsina antes de la desnaturalización.

10 Se preparan muestras tales como lavados de orina y vejiga para la hibridación usando técnicas estándar. Por ejemplo, se pueden recoger células centrifugando la muestra biológica y resuspendiendo el pelete de células. Típicamente, las células se resuspenden en solución salina tamponada de fosfato (PBS). Después de centrifugar la suspensión celular para obtener un pelete de células, las células pueden fijarse, como se describe anteriormente para muestras de tejido. Por ejemplo, el fijador de Chamoy que contiene metanol o etanol, cloroformo y ácido acético glacial en una relación 6:3:1, respectivamente, se puede usar como fijador. También se puede usar una solución de formalina tamponada neutra, e incluye aproximadamente de 1% a 10% de formaldehído al 37-40% en una disolución acuosa de fosfato sódico. Las laminas que contienen las células se pueden preparar retirando la mayor parte del fijador, dejando las células suspendidas concentradas en solo una porción de la disolución.

15 Las sondas cromosómicas y el ADN cromosómico contenido dentro de cada muestra biológica se desnaturaliza. La desnaturalización se realiza típicamente incubando en presencia de un pH alto, calor (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 70° C a aproximadamente 95° C), disolventes orgánicos tales como formamida y haluros de tetraalquilamonio o sus combinaciones. Por ejemplo, el ADN cromosómico se puede desnaturalizar por una combinación de temperaturas por encima de 70° C (por ejemplo, aproximadamente 73° C) y un tampón de desnaturalización que contiene formamida al 70% y 2xSSC (cloruro sódico 0,3M y citrato sódico 0,03 M). Las condiciones de desnaturalización típicamente se establecen tal que se conserva la morfología celular. Se pueden desnaturalizar sondas cromosómicas por calor. Por ejemplo, se pueden calentar las sondas de aproximadamente 70° C a aproximadamente 75° C durante aproximadamente cinco minutos.

20 Después de eliminar los reactivos o las condiciones desnaturalizantes, las sondas se hibridan al ADN cromosómico bajo condiciones de hibridación. Las "condiciones de hibridación" son condiciones que facilitan la unión entre una sonda y el ADN cromosómico diana. Las condiciones de hibridación varían, dependiendo de las concentraciones, la composición base, complejidades y longitudes de las sondas, así como las concentraciones salinas, temperatura y tiempo de incubación. Cuanta más alta sea la concentración de la sonda, mayor será la probabilidad de formar un híbrido. Las soluciones de hibridación típicamente incluyen sulfato de dextrano, formamida y SSC. Por ejemplo, se puede usar una disolución que contenga aproximadamente formamida al 55%, sulfato de dextrano al 10%, y 2xSSC. En general, las condiciones de hibridación incluyen temperaturas de aproximadamente 25° C a aproximadamente 55° C, y tiempos de incubación de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 96 horas. Más particularmente, puede realizarse la hibridación de aproximadamente 32° C a aproximadamente 40° C durante aproximadamente de 2 a aproximadamente 16 horas.

30 La unión no específica de sondas cromosómicas al DNA fuera de la región diana puede retirarse por una serie de lavados. La temperatura y la concentración salina en cada lavado dependen de la rigurosidad deseada. Por ejemplo, para condiciones de rigurosidad alta, se pueden llevar a cabo lavados con urea 1,5M y 0,1xSSC, pH 7,2 a aproximadamente 45° C. De forma alternativa, se pueden llevar a cabo lavados de aproximadamente 50° C a aproximadamente 80° C, usando de 0,2x a aproximadamente 2xSSC y de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). La rigurosidad puede reducirse disminuyendo la temperatura de los lavados o incrementando la concentración de la sal en los lavados.

35 Puede hacerse una contratinción de núcleos con soluciones de yoduro de propidio o dihidrocloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). El yoduro de propidio es un tinte específico del ADN de fluorescencia roja que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 614 nm. Típicamente, se usa el yoduro de propidio de una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml. DAPI, una tinción específica del ADN de fluorescencia azul que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 452 nm, se usa generalmente a una concentración en el intervalo de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml.

50 **Sondas cromosómicas**

Las sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de acuerdo con la invención se hibridan (es decir, forman una doble hélice) con ADN repetitivo asociado con el centrómero del cromosoma 8. Los centrómeros de cromosomas de primates contienen una familia compleja de repeticiones en tándem largas de ADN, compuesta de una longitud de repetición de monómero de aproximadamente 171 pares de bases, que se denomina ADN alfa-satélite. También son adecuadas las sondas específicas de locus que se hibridan a una región cromosómica crítica. La "región cromosómica crítica" se refiere a una región cromosómica que está asociada con la pérdida de heterocigosidad o amplificación en el cáncer. La "pérdida de heterocigosidad" se refiere a una pérdida de un alelo materno o paterno en un tumor. Por ejemplo, las regiones cromosómicas críticas para el cáncer de próstata incluyen 8p y 8q24, y más particularmente, 8p21-22 y 8q24.1. La región 8p21-22 contiene, *inter alia*, el gen de la lipoproteína lipasa (LPL). La región 8q24.1 contiene c-myc, que se sobre-expresa con frecuencia y se amplifica a menudo en el cáncer de próstata. Cher *et al.*,

Genes Chromosomes Cancer, 1994, **11**:153-162. Es posible que otro gen importante para la progresión del carcinoma de próstata esté dentro de 8q24. Por ejemplo, el antígeno de células madre de próstata (PSCA) se localiza en 8q24, y también se sobre-expresa con frecuencia con un alto grado y de forma constante en el cáncer de próstata. Reiter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**:1735-1740.

5 Las sondas cromosómicas tienen típicamente de aproximadamente 50 a aproximadamente 1×10^5 nucleótidos, comprendiendo las sondas mayores típicamente fragmentos más cortos de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos. Las sondas que se hibridan con el ADN centromérico y el ADN específico del locus se pueden comprar, por ejemplo, en Vysis, Inc. (Downers Grove, Ill.), Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.), o en Cytocell (Oxfordshire, RU). De forma alternativa, se puede usar ADN cromosómico o genómico para producir sondas mediante técnicas estándar. Por ejemplo, las fuentes de ADN pueden incluir ADN genómico, ADN clonado secuencias, híbridos celulares somáticos que contienen un cromosoma humano, o una parte de éste, junto con el complemento del cromosoma normal del huésped, y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdissección. La región de interés se puede aislar por clonación, o amplificación específica de sitio mediante PCR. Véase, por ejemplo, Nath y Johnson, *Biotechnic Histochem.*, 1998, **73**(1):6-22, Wheelless *et al.*, *Cytometry*, 1994, **17**:319-326, y la patente de EE.UU. N° 5.491.224.

10 Las sondas cromosómicas típicamente se marcan directamente con un fluoróforo, una molécula orgánica que emite radiación, por ejemplo, luz, después de absorber energía radiante, dando lugar a la sonda que se visualiza prescindiendo de una molécula de detección secundaria. Después de la unión covalente de un fluoróforo a un nucleótido, el nucleótido se puede incorporar directamente en la sonda con técnicas estándar tales como translación de mellas, cebado aleatorio y marcaje PCR. De forma alternativa, se pueden transaminar con un enlazador nucleótidos de desoxicitidina dentro de la sonda. El fluoróforo entonces se une covalentemente a los nucleótidos de desoxicitidina transaminados. Véase, la patente de EE.UU. N° 5.491.224.

20 Los fluoróforos se eligen tal que cada sonda cromosómica en el conjunto se puede visualizar independientemente. Por lo tanto, cada una de las sondas cromosómicas en el conjunto se marca con fluoróforos que emiten luz de un color que contrasta con el(los) otro(s) fluoróforo(s). Por ejemplo, se puede usar una combinación de los siguientes fluoróforos: ácido 7-amino-4-metilcoumarin-3-acético (AMCA), Texas Red® (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), 5-(y-6)-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-(y-6)-carboxifluoresceína, fluorescein-5-isotiocianato (FITC), ácido 7-dietilaminocoumarin-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-(y-6)-isotiocianato, 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina, ácido 7-hidroxycoumarina-3-carboxílico, ácido 6-[fluorescein-5-(y-6)-carboxamido]hexanoico, ácido N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenopropionico, eosin-5-isotiocianato, eritrosin-5-isotiocianato, y acetilazida azul Cascade® (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.). Las sondas se visualizan con un microscopio de fluorescencia y un filtro apropiado para cada fluoróforo, o usando conjuntos de filtros de paso de banda dual o triple para observar múltiples fluoróforos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.776.688. De forma alternativa, se pueden usar técnicas tales como citometría de flujo para examinar el modelo de hibridación de las sondas cromosómicas.

35 También se pueden marcar las sondas indirectamente con biotina o digoxigenina, o se pueden marcar con isótopos radioactivos tales como ^{32}P y ^3H , aunque se requieran moléculas de detección secundarias o un procesamiento posterior para visualizar las sondas. Por ejemplo, una sonda indirectamente marcada con biotina se puede detectar por avidina conjugada a un marcador detectable. La avidina se puede conjugar, por ejemplo, a un marcador enzimático tal como alcalina fosfatasa o peroxidasa de rábano picante. Se pueden detectar marcadores enzimáticos en reacciones colorimétricas estándar usando un sustrato y/o un catalizador para la enzima. Los catalizadores para fosfatasa alcalina incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio. Se puede usar diaminobenzoato como catalizador para la peroxidasa de rábano picante.

Determinación de la prognosis o pronóstico

45 Generalmente, se puede definir la pérdida como la deleción de todo un cromosoma o una parte de éste (por ejemplo, un locus o una región cromosómica crítica) tal que menos de dos copias del cromosoma o parte del cromosoma estén presentes en una célula. Por el contrario, se puede definir la ganancia como la adición, o replicación, de todo el cromosoma 8 (tal como un locus o una región cromosómica crítica), o una parte de éste, tal que tres o más copias del cromosoma 8 o una parte de éste estén presentes en una célula. Un Incremento Adicional (IA) o cambio en el número de copia se refiere al número de copias de un gen presentes en una célula. Este término se usa normalmente en relación a genes o sus partes, por ejemplo c-myc.

50 Cuando se usan técnicas de hibridación, el modelo de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas en una muestra biológica se puede evaluar usando las categorías de "pérdida", "ganancia" e "incremento adicional". Por lo tanto, "pérdida" indica que un núcleo contiene menos de dos señales de hibridación para una sonda particular, mientras que "ganancia" se refiere a tres o más señales para una sonda particular. Incremento adicional (IA) se refiere al número de copias de c-myc respecto al número de copias del centrómero.

55 En general, las muestras se clasifican en normales si menos de aproximadamente el 10% de núcleos epiteliales tienen una ganancia, y si menos de aproximadamente el 55% de núcleos epiteliales tienen una pérdida para una sonda aplicada. Por lo tanto, para una sonda centromérica, una muestra es clasificada como que tiene una ganancia en el número cromosómico si sobre el 10% de núcleos epiteliales tienen tres o más señales para una sonda aplicada, y como que tiene una pérdida en el número cromosómico si sobre el 55% de núcleos epiteliales tienen menos

de dos señales. En particular, las muestras se pueden clasificar como que tienen una pérdida de 8p cuando el promedio global de la relación 8p:cromosoma 8 es menor que aproximadamente 0,85. Las muestras se pueden clasificar como que tienen una pérdida de c-myc si el promedio global de la relación c-myc:cromosoma 8 es menor que aproximadamente 0,90. Las muestras se pueden clasificar en la categoría IA si el promedio global de la relación c-myc:cromosoma 8 es mayor que aproximadamente 1,3 y 10% o más de los núcleos epiteliales tienen ≥ 3 señales para c-myc.

El modelo de hibridación se puede correlacionar con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata para el sujeto usando las siguientes directrices. Por ejemplo, para la hibridación *in situ* de fluorescencia de sonda dual (FISH) con sondas de ADN para 8p (gen de LPL), centrómero 8(8cen), y c-myc en 144 carcinomas de próstata en etapa C patológicos (es decir, T₃N₀M₀, el tumor se extiende a través de la cápsula prostática, pero sin metástasis del nodo linfático regional o distante), se observó que aproximadamente el 79% de carcinomas de próstata tenían frecuentes anomalías genéticas del cromosoma 8. La ganancia del cromosoma 8 y el IA de c-myc se correlacionaban de forma significativa con la escala de Gleason, que incrementó según aumentaba el número de anomalías cromosómicas. La escala de Gleason es un método mediante el cual se evalúan los tumores de próstata. La graduación está en el intervalo de 2 a 10, indicando los valores más altos un grado más alto de tumor. Además, el IA de c-myc se correlacionaba con la progresión sistémica y la supervivencia del paciente, mientras que la pérdida de 8p no lo hacía. La progresión sistémica y supervivencia global de pacientes con carcinoma de próstata fueron peores, de forma significativa, según avanzaban los tumores a lo largo de una ruta propuesta mostrada en la figura 1.

Los análisis multivariantes mostraron que las combinaciones de Normal-Normal-Normal (8p, 8cen, c-myc), Pérdida-Normal-Normal, Pérdida-Ganancia-Ganancia, y Pérdida-Ganancia-IA eran los modelos dominantes en este grupo de tumores. El modelo Pérdida-Ganancia-IA era un significativo factor pronóstico independiente que tenía las relaciones de riesgo más altas para la progresión del cáncer sistémico y disminuía la supervivencia global del paciente. Además, la pérdida de 8p parece ser un acontecimiento genético precoz en la carcinogénesis de la próstata. Aunque la pérdida de 8p aparece a alta frecuencia, no se observó un pronóstico significativo para la progresión sistémica y la supervivencia global del paciente según la pérdida de 8p solo. Estudios anteriores sobre el cromosoma 8p-arm en carcinoma de próstata coinciden con estos hallazgos.

Según la frecuencia de los modelos de anomalía de FISH descritos en este documento, la acumulación de aberraciones génicas en el carcinoma de próstata pueden aparecer en las tres etapas primarias (flecha ancha en la figura 1): En una primera etapa, el 8p-arm se puede delecionar. También se puede dar lugar a la mutación o una pequeña delección de un gen o genes sobre 8p que no son detectables por FISH. En segundo lugar, se gana un cromosoma 8 entero (quizás el cromosoma 8 que ha sufrido la primera pérdida de 8p). Tercero, se gana el 8q-arm, posiblemente sufriendo uno de los cromosomas 8 normales la formación del isocromosoma 8q, que delecionará simultáneamente la región 8p normal así como la ganancia 8q. Una región más pequeña, que incluye el gen c-myc, entonces se amplifica. La amplificación del gen c-myc puede aparecer como el primer acontecimiento genético en el carcinoma de próstata de pT₃N₀M₀ porque el modelo Normal-Normal-IA también se observaba, aunque era raro, lo que indica que los carcinomas de próstata en esta etapa ya son suficientemente genéticamente inestables para amplificar el ADN. La amplificación sustancial del gen c-myc, especialmente junto con la pérdida del 8p-arm y la ganancia del centrómero 8, parece predecir la progresión sistémica y puede justificar un tratamiento adyuvante precoz para los pacientes con carcinoma de próstata. Como se describe en este documento, el carcinoma de próstata es sustancialmente más agresivo si acumula copias extras de 8q24, es decir, IA de c-myc.

Como se describe en este documento, el gen c-myc es un marcador de malignidad potencial del carcinoma de próstata. La sobre-expresión del gen c-myc se ha encontrado en el carcinoma de próstata y la amplificación sustancial del gen c-myc está fuertemente correlacionada con pruebas inmunohistoquímicas de la sobre-expresión de la proteína c-myc. Se ha pensado que la sobre-expresión de la proteína c-myc causa la degradación de p27^{kip1}, lo que conduce a la activación de ciclina E/cdk 2, lo que a su vez da lugar a la proliferación celular. Se ha mostrado recientemente que el nivel de p27^{kip1} está asociado con la escala de Gleason, la recurrencia tumoral y supervivencia del paciente con el carcinoma de próstata. Véase, por ejemplo, Cheville *et al.*, *Mod. tathol.*, 1998, 11:324-328. Un estudio usando la transducción *in vivo* de células de cáncer de próstata con c-myc antisentido demostró que el crecimiento tumoral se redujo suprimiendo la proteína c-myc. Steiner *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 1998, 9:747-755. Tomadas conjuntamente, estas observaciones sugieren que la sobre-expresión de c-myc a través del número de copia incrementado desregula el control del crecimiento celular, dando lugar a la proliferación de células de carcinoma de próstata.

De 130 pacientes sometidos al estudio subsiguiente, 35 tuvieron progresión sistémica y 28 muertes específicas de la enfermedad después de una operación quirúrgica curativa, lo que indicaba que estos pacientes ya tenían una metástasis clínicamente indetectable antes de la operación. Los pacientes cuyos tumores tenían IA c-myc sufrieron una rápida progresión y murieron precozmente de cáncer, lo que indicaba que IA c-myc potenciaba la proliferación de las células tumorales metastazadas. Si este es el caso, las progresiones sistémicas tardías a aproximadamente 10-12 años, observadas en pacientes cuyo carcinoma de próstata tenía una ganancia de 8cen y una ganancia de c-myc, pueden ser el resultado del IA de c-myc que aparecía como un nuevo acontecimiento genético en las células tumorales metastásicas. Desafortunadamente, es difícil obtener muestras de dichas lesiones metastásicas tardías.

Se observó la amplificación de secuencias de ADN de 8q, incluyendo 8q24, en 3 (75%) de 4 lesiones metastásicas de nodo linfático, mientras que se observó en 4 (9%) de 44 carcinomas de próstata primarios. Además, el

gen c-myc en focos metastásicos (21%) se amplificó con frecuencia en comparación con los focos primarios (8%). Por lo tanto, el estado del gen c-myc puede determinar si un foco de de cáncer de próstata metastásico progresa o no.

Además, algunos pacientes cuyos tumores tuvieron una progresión normal o una ganancia de c-myc sufrieron una progresión sistémica, sugiriendo que la metástasis del carcinoma de próstata podría aparecer sin amplificación del gen c-myc y que puede haber otro gen (genes) implicados en provocar la metástasis.

La invención será descrita a continuación mediante los siguientes ejemplos, lo que no limita el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Materiales y Métodos: Se ha realizado previamente el análisis del desequilibrio alélico de ramas del cromosoma 7q, 8p, 16q, y 18q sobre una gran cohorte de carcinomas de próstata patológicos en etapa C (pT₃N₀M₀) (Jenkins *et al.*, *Genes Cromosomas Cancer*, 1998, **21**:131-143). De estos tumores, se seleccionaron 157 que mantenían un número adecuado de células tumorales en los bloques. Todos los pacientes sufrieron linfadenectomías pélvicas concurrentemente entre 1966 y 1987 y se probaron que no tenían depósitos metastásicos en los nodos linfáticos pélvicos. El consecuente promedio de esta población de pacientes fue 7,7 años (promedio 7,5 años).

Los datos clinicopatológicos disponibles para estos pacientes incluyeron edad del paciente, escala de Gleason, implicación de la vesícula seminal (si está presente), estado del margen, y terapia adyuvante postoperatoria (si se aplica). El nivel de antígeno de suero de próstata (PSA) en suero preoperatorio (que estuvo disponible en aproximadamente 1987) no estaba incluido. El análisis de citometría de flujo (FCM) en muestras de prostatectomía embebidas en parafina fijadas en formalina se realizó como se describe en Persons *et al.*, *J. Urol.*, 1993, **150**:120-125. Los datos resultantes se obtuvieron clínicamente a través de una enfermera, que mantenía un contacto anual, y fueron recogidos por teléfono o con un escrito de recogida formal continua del Registro Tumoral de Prostatectomía Radical de la Clínica Mayo. En pocas palabras, se usaron la progresión sistémica del carcinoma de próstata y la muerte específica por carcinoma de próstata como puntos clínicos finales. La progresión sistémica se definió como prueba clínica de enfermedad metastásica distante y se comprobó mediante hallazgos positivos en gammagrafía ósea u otras pruebas de visualización radiológica. Las muertes específicas por cáncer de próstata se comprobaron en el momento de la muerte del paciente por una combinación de la revisión del certificado de defunción, contacto con el médico de familia y discusión con la familia del paciente, si era necesario.

La lista de pacientes fue aleatorizada, y se llevaron a cabo análisis FISH en muestras tumorales sin conocimiento de los hallazgos clinicopatológicos y datos de supervivencia de los pacientes.

Para cada muestra de tejido, se usó un bloque de muestra de próstata simple que contiene el carcinoma de próstata histológico de grado más alto. Quince secciones de tejido de 5 µm de espesor se cortaron de cada uno de estos bloques de tumor embebidos en parafina y se pusieron en portaobjetos. La primera sección de tejido se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para averiguar la región de interés.

FISH de sonda dual con centrómero 8 y sondas específicas de locus. En pocas palabras, se desparafinaron secciones de tejido, se deshidrataron, se trataron con microondas en ácido cítrico (10 mM, pH 6,0) durante 10 min., se digirieron en solución de pepsina (4 mg/ml en NaCl al 0,9%, pH 1,5) durante 12 min a 37° C, se aclararon en 2xSSC (pH 7,2) a temperatura ambiente, y se secaron al aire. Se realizó la hibridación de sonda dual usando una sonda de enumeración cromosómica (CEP) al centrómero del cromosoma 8 (Vysis Inc., Downers Grove, Ill.) junto con una sonda específica de locus (LSP), tanto de la sonda de 8p (LPLgene Vysis, Inc.) como de la sonda de 8q24.1 (c-myc) (Vysis Inc.). Las sondas y el ADN diana se desnaturalizaron conjuntamente a 80° C durante 2 min., se hibridaron a 50° C durante 30 min, y después se incubaron a 37° C toda la noche. El lavado post-hibridación se realizó en urea 1,5M/0,1xSSC, pH 7,2 a 45° C durante 30 min de 157 tumores sometidos a análisis FISH, el FISH se realizó con éxito sobre 144 (91,7%) para c-myc/CEP 8 y 143 (91,1%) para 8p/CEP 8. Se contratiñeron núcleos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el compuesto p-fenilendiamina de montante de fluorescencia.

Se contaron trescientos núcleos en interfase no sobrelapantes, desde un foco de epitelio benigno y un adenocarcinoma, para cada sonda con un microscopio Diaplan equipado con un filtro de paso triple. Usando el portaobjeto teñido H & E de referencia de sección adyacente, se evaluó el mismo foco de tumor dominante para cada sonda. En algunos casos, hubo variaciones en los hallazgos de FISH dentro de un foco de tumor. En estos casos, se evaluó el foco de cáncer con el modelo de Gleason primario. No se enumeraron los núcleos de elementos estromales. El número de señales de sonda específicas de locus (8p o c-myc) y señales CEP 8 se contaron para cada núcleo.

Los datos tabulados típicos para un foco de tumor representativo del caso 37 (etapa pT₃N₀M₀) para los pares de sonda c-myc/CEP 8 y 8p/CEP 8 se muestran en las figuras 2A y 2B, respectivamente. Para este tumor, había una pérdida del número de señal de 8p relacionada con el número de centrómero 8 (como se demuestra por la relación 8p:CEP 8), y el número de señal de CEP 8 aumentaba. Los datos de recuento del centrómero 8 fueron similares entre 2 experimentos de hibridación de sonda dual para 8p/CEP 8 y c-myc/CEP 8. Las filas en las tablas de datos asociados en la figura 2 demuestran el tanto por ciento de núcleos con diferentes números de señales CEP 8. Los núcleos con 0-1 y ≥3 señales CEP 8 definieron a aquellas células con pérdida aparente (-CEP8) y ganancia de CEP 8 (+CEP 8), respectivamente. Las columnas en las tablas de datos asociados demuestran el tanto por ciento de núcleos con diferentes números de señales LSP. Los núcleos con señales 0-1 y ≥3 LSP definieron a aquellas células con pérdida aparente (-LSP) y ganancia de LSP (+LSP), respectivamente. Finalmente, una relación de la señal LSP:CEP 8 promedio se calculó para cada LSP para cada foco. Estas variables (-CEP 8, +CEP 8, -LSP, +LSP, y la relación LSP:CEP

promedio) se pueden usar para determinar si el centrómero cromosómico y/o las regiones cromosómicas se ganaron o perdieron. Es de destacar que los intervalos normales para cada una de estas variables pueden establecerse evaluando la apariencia de los epitelios de próstata normales.

5 Análisis Estadístico. La frecuencia y distribución de anomalías FISH en el carcinoma de próstata se compararon usando la prueba de Pearson χ^2 y la prueba t de student. Las relaciones de anomalías FISH con la escala de Gleason se evaluaron mediante la prueba de Pearson χ^2 . Las curvas de Kaplan-Meier y la prueba de Mantel-Cox se usaron para estimar la supervivencia sistémica sin progresión o la muerte específica de causa. Las comparaciones univariantes de las curvas de supervivencia se hicieron usando la prueba de Mantel-Cox. Todas las relaciones de riesgo para la progresión y la supervivencia se estimaron usando el modelo de riesgos proporcionales de Cox. Las predicciones fueron hallazgos FISH, escala de Gleason, invasión de la vesícula seminal, estado de los márgenes quirúrgicos, terapias adyuvantes, y modelo ploidía FCM. Todas las pruebas estadísticas fueron de colas con un nivel alfa de 0,05. Un valor de p menor de 0,05 fue considerado significativo en todas las pruebas.

10 **Ejemplo 2 - Análisis FISH de Controles:** Se contaron las señales de c-myc y CEP 8 en núcleos epiteliales prostáticos normales histológicamente de 10 pacientes. Se observó la pérdida de señales (<2 señales) con frecuencia tanto para una como para ambas sondas de c-myc y CEP 8 en estos núcleos, posiblemente debido a una truncación nuclear. Núcleos con 3 o más señales, sin embargo, fueron raros para cada sonda. El tanto por ciento de núcleos epiteliales con dos señales c-myc y dos señales CEP 8 estaban en el intervalo de 54,1-82,4% (promedio±desviación estándar; 68,7±9,2%). Los intervalos para el tanto por ciento de núcleos epiteliales con 0-1, 2, 3, y ≥3 señales c-myc fueron 12,5-39,5%, 59,3-85,6%, 0,0-1,2%, y 0,0-1,9%, respectivamente. Los intervalos para el tanto por ciento de núcleos epiteliales con 0-1, 2, 3, y ≥3 señales CEP 8 fueron 13,4-37,4%, 61,7-84,7%, 0,0-1,0%, y 0,0-1,9%, respectivamente. La relación c-myc:CEP 8 promedio en núcleos epiteliales normal fue 1,00±0,00 (intervalo 0,98-1,02). Ningún núcleo epitelial benigno tenía ≥5 señales c-myc o CEP 8.

15 La misma evaluación se hizo para sondas 8p y CEP 8 (Tabla 1). El porcentaje de núcleos epiteliales con 0-1, 2, 3, y >3 señales CEP 8 fueron similares a las señales 8p y a aquellas de la hibridación de sonda dual de c-myc/CEP 8 (valores de p de todas las comparaciones, >0,05, t-prueba). El tanto por ciento de núcleos epiteliales con dos señales 8p y dos señales CEP 8 estaba en el intervalo de 51,77-77,66% (promedio±desviación estándar; 67,1±7,4%). El promedio de la relación 8p:CEP 8 en núcleos epiteliales normales fue 0,98±0,02 (intervalo 0,95-1,00). Ningún núcleo epitelial benigno tuvo >5 señales 8p o CEP 8.

TABLA 1

30 Número de copia de 8p, 8cen y c-myc en núcleos epiteliales en glándulas de próstata histológicamente normales

	Promedio ± S.D.	Intervalo
C-myc/CEP 8		
relación c-myc:CEP8	1,00 ± 0,01	0,98-1,02
% núcleos con 0-1 señales c-myc	25,52 ± 8,16	12,46-39,51
% núcleos con 0-1 señales CEP 8	25,53 ± 7,94	13,42-37,39
% núcleos con 2 señales c-myc y 2 CEP 8	68,70 ± 9,22	54,10-82,43
% núcleos con ≥3 señales c-myc	0,83 ± 0,58	0,00-1,92
% núcleos con ≥3 señales CEP 8	0,87 ± 0,68	0,00-1,94
8p/CEP 8		
relación 8p:CEP 8	0,98 ± 0,02	0,95-1,00
% núcleos con 0-1 señales 8p	27,89 ± 7,39	17,16-43,41
% núcleos con 0-1 señales CEP 8	25,28 ± 5,84	16,99-37,94
% núcleos con 2 señales 8p y 2 CEP 8	67,07 ± 7,35	51,77-77,56
% núcleos con ≥3 señales 8p	0,68 ± 0,36	0,00-0,99
% núcleos con ≥3 señales CEP 8	0,78 ± 0,49	0,00-1,65

Ejemplo 3 – Anomalías FISH en pacientes con cáncer de próstata: El estado del número de copia de 8p, c-myc, y CEP 8 de un foco tumoral se caracterizó como normal, ganancia, o pérdida, según el estudio normal y una inspección

de la distribución de señales FISH entre los focos de carcinoma. Además, también se usó la categoría IA del número de copia de c-myc respecto al número de copia del centrómero. Se eligieron valores umbrales para estas categorías para minimizar la detección de cambios falsos positivos. Lo normal requirió <10% de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales y <55% de núcleos epiteliales con 0-1 señales para una sonda aplicada. La ganancia requirió >10% de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales para una sonda aplicada. La pérdida de CEP 8 requirió >55% de núcleos epiteliales con 0-1 señales para CEP 8. La pérdida de 8p requirió una relación en promedio global de 8p:CEP 8 de <0,85. La pérdida de c-myc requirió una relación en promedio global de c-myc:CEP 8 de <0,90. El IA se aplicó solo a c-myc y requirió una relación en promedio global de c-myc:CEP 8 de >1,3 y $\geq 10\%$ de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales para c-myc.

La figura 2 proporciona datos de enumeración derivados del caso 37, como un ejemplo representativo de los casos de cáncer. Para este foco de cáncer, el tanto por cientos de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales para c-myc y CEP 8 fueron 73,4% y 50,9%, respectivamente (figura 2A). El tanto por cientos de núcleos epiteliales con 0-1 señales para c-myc y CEP 8 fueron 0,3% y 7,0%, respectivamente (figura 2A). La relación promedio de c-myc:CEP 8 fue 1,32. Según los criterios definidos más arriba, este foco se clasificó como con ganancia 8cen e IAc-myc.

Los resultados FISH para 8p y CEP 8 del caso 37 también se analizaron del mismo modo. Los tantos por ciento de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales para 8p y CEP 8 fueron 23,9% y 51,4%, respectivamente (figura 2B). Los tantos por ciento de núcleos epiteliales con 0-1 señales para 8p y CEP 8 fueron 38,7% y 6,7%, respectivamente (figura 2B). La relación promedio de 8p:CEP 8 fue 0,69. Por lo tanto, este foco se definió como con ganancia 8cen y pérdida 8p. Combinando estos resultados conjuntamente, el carcinoma de próstata de este paciente fue definido como con pérdida de 8p, ganancia de 8cen e IA de c-myc.

La relación del promedio global c-myc:CEP 8 y el tanto por ciento de núcleos epiteliales con ≥ 3 señales CEP 8 para cada tumor se representan en la figura 3A. Esta representación resalta grupos de tumores que comparten las mismas anomalías FISH. Aplicando los valores de corte descritos más arriba, 78 (54,2%) de 144 carcinomas de próstata se definieron como con ganancia de número de copia del gen c-myc. De estos 78 tumores, 50 (34,7%) con una ganancia de 8cen y una ganancia proporcionalmente similar de c-myc (diamantes amarillos en la figura 3A) se distinguieron claramente de 28 (19,4%) con IA de c-myc (diamantes naranjas y rojos en la figura 3A). Entre los casos con IA de c-myc, 16 (11,1%) con una ganancia 8cen e IA c-myc (diamantes naranjas) también se distinguieron de 12 (8,3%) IA c-myc solo (diamantes rojos). El grupo IA c-myc solo consistió en dos tumores con pérdida de 8cen y 10 tumores sin anomalía aparente de 8cen. No se encontró ninguna pérdida de c-myc. Dos carcinomas (1,4%) designados como pérdida 8cen tuvieron una alta relación c-myc:CEP 8 (1,28 y 1,68, diamantes verdes en la figura 3A) debido a la pérdida de 8cen, sin un incremento real (núcleos 3) de señales c-myc por núcleo.

La relación del promedio global de señal 8p:CEP 8 y el tanto por ciento de núcleos epiteliales con 0-1 señales CEP 8 para cada tumor se representaron en la figura 3B. Los tumores con pérdida de 8p se separaron claramente de aquellos sin pérdida de 8p por la relación de corte de 8p:CEP 8 de 0,85. Ciento nueve (76,2%) de 143 carcinomas de próstata se definieron como con anomalías 8p. Entre estos casos, 89 (62,2%) mostraron una pérdida de 8p y 20 (14,0%) tuvieron una ganancia de 8p. No se observaron en este estudio aparentes deleciones de 8p homocigóticas.

El estado del número de copia de CEP 8, definido en los experimentos de hibridación de sonda dual para c-myc y 8p, fueron similares, y las clasificaciones FISH CEP 8 fueron completamente concordantes entre los dos experimentos. Sesenta y seis pacientes (45,8%) tuvieron tumores con ganancia de 8cen, mientras que 4 (2,7%) tuvieron tumores con pérdida de 8cen.

La TABLA 2 resume los hallazgos FISH de 8p, 8cen y c-myc para todos los 144 pacientes. Las anomalías FISH fueron clasificadas en 11 modelos. Los hallazgos FISH normal para todos los tres loci (8p-8cen-c-myc: Normal-Normal-Normal) se observaron en 31 (21,5%) casos. Ciento trece tumores con hallazgos FISH anormales fueron distribuidos entre los otros 10 modelos (78,5%).

TABLA 2

Clasificación de 144 pacientes con carcinoma de próstata en etapa pT₃N₀M₀ según los hallazgos FISH de 8p, 8cen, y c-myc

Nº de modelo	8p	8cen	c-myc (8q)	Nº. puntos	%
1	Normal	Normal	Normal	31	21,5
2	Pérdida	Normal	Normal	33	22,9
3	Pérdida	Pérdida	Normal	2	1,4
4	Pérdida	Ganancia	Ganancia	34	23,6
5	Ganancia	Ganancia	Ganancia	15	10,4
6	Normal	Normal	IA	3	2,1

7	Pérdida	Normal	IA	7	4,9
8	Pérdida	Pérdida	IA	2	1,4
9	Pérdida	Ganancia	IA	11	7,6
10	Ganancia	Ganancia	IA	5	3,5
11	--*	Ganancia	Ganancia	1	0,7
Total				144	100,0

*No determinado

5 **Ejemplo 4 - Correlación de Anomalías Cromosómicas con Características Patológicas:** Se evaluó la relación de los resultados FISH con la escala de Gleason (TABLAS 3A y 3B). Se indica el número de pacientes, con el tanto por ciento de pacientes indicados en paréntesis. La escala de Gleason se dividió en 3 grupos de 5-6, 7, y 8-10. Como tumores de alto grado se seleccionaron solo 16 (11,1%) de los 144 carcinomas de próstata con una escala de Gleason de 5-6. De los restantes 128 tumores, 64 (44,4%) con una escala de Gleason de 7, y otros 64 (44,4%) con una escala de Gleason de 8-10. Como se muestra en la TABLA 3, no hubo asociación significativa entre la escala de Gleason y el estado 8p ($p=0,74$). La alta escala de Gleason, sin embargo, estaba asociada de forma significativa con la ganancia de 8cen, la ganancia de c-myc e IA de c-myc ($p<0,01$, 0,03, y 0,01, respectivamente). Considerando los resultados FISH combinados de 8p, 8cen, y c-myc, los tumores con el modelo Ganancia-Ganancia-Ganancia estaban asociados con una escala de Gleason más alta ($p<0,03$). El tanto por ciento de tumores con una escala de Gleason de 8-10 se incrementó de 29,0% a 36,4% a 50,0% a 63,6% para los modelos de anomalía de FISH dominante Normal-Normal-Normal, Pérdida-Normal-Normal, Pérdida-Ganancia-Ganancia, y Pérdida-Ganancia-IA, respectivamente.

TABLA 3

15 Correlación de anomalías genéticas con la escala de Gleason

A)	8pb		8cenc		c-myc		
Escala de Gleason	Sin pérdida	Pérdida	Normal	Ganancia	Normal	Ganancia	IA
4-6	7(13)	8(9)	13(18)	3(5)	13(20)	3(6)	0(0)
7	24(44)	40(45)	36(49)	26(39)	31(47)	20(40)	13(46)
8-10	23(48)	41(46)	25(34)	37(56)	22(33)	27(54)	15(54)
valor de p^a		0,74		0,01		0,03	0,01

B)	8p-cen-c-myc ^d						
Escala de Gleason	N-N-N	L-N-N	L-G-G	G-G-G	Any IA	L-G-IA ^e	Otros IA ^e
4-6	7(23)	6(18)	2(6)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
7	15(48)	15(45)	15(44)	5(33)	13(46)	4(36)	9 (53)
8-10	9(29)	12(36)	17(50)	10(67)	15(54)	7(64)	8(47)
valor de p^a		0,8	0,08	0,03	0,01	0,07	0,09

^a, todas las comparaciones se hicieron con el grupo normal.

^b, 1 caso sin datos de 8p se excluyó.

^c, 4 casos con pérdida de 8cen se excluyeron.

^d, modelos de anomalía de loci de 8p-8cen-c-myc se describieron con hallazgos FISH abreviados como sigue:

N, normal, L, pérdida, G, ganancia, IA, incremento adicional.

1 caso sin datos de 8p y 2 casos con L-L-N se excluyeron.

^e, IA se subdividió en L-G-IA y otros IA (véase la TABLA 2).

La edad promedio global (intervalo) con supervivencia fue 66 años, con un intervalo de 53-59 años. Catorce pacientes que habían recibido terapia hormonal antes de su prostatectomía fueron excluidos de los estudios pronósticos. De los 130 pacientes elegibles para estudios pronósticos, la invasión de la vesícula seminal se observó en 78 (60%) pacientes. El margen quirúrgico fue positivo de carcinoma en 50 (39%) pacientes. 29 (24%) y 22 (17%) pacientes recibieron después de la operación terapia hormonal adyuvante y radioterapia, respectivamente, mientras que 2 pacientes (2%) recibieron ambas.

Entre estos 130 pacientes, 35 (26,0%) pacientes tuvieron una progresión sistémica y 28 (21,5%) pacientes murieron por el cáncer de próstata. El IA c-myc estaba asociado de forma significativa con una mayor probabilidad de progresión sistémica ($p=0,024$) y una menor probabilidad de supervivencia global ($p=0,039$). Las supervivencias sin progresión de diez años para los grupos con c-myc normal, la ganancia 8cen y ganancia c-myc, y el IA c-myc fueron 80,6%, 71,3%, y 57,5%, respectivamente (figura 4A). De forma similar, las supervivencias específicas de causa de diez años para los grupos con c-myc normal, ganancia 8cen y ganancia c-myc, e IA c-myc fueron 87,6%, 83,3%, y 63,7%, respectivamente (figura 4B).

Para evaluar una influencia de la pérdida de 8p frente a la prognosis o pronóstico del paciente, se compararon los datos pronósticos entre 8p normal, pérdida 8p, y ganancia 8p. Las alteraciones en 8p no estaban asociadas ni con la progresión sistémica ($p=0,63$) ni con la muerte del paciente ($p=0,14$). La supervivencia sin progresión de diez años para los grupos con 8p normal, pérdida 8p, y ganancia 8p fueron 77,1%, 72,9% y 69,7%, respectivamente. Por otra parte, las supervivencias específicas de causa de diez años para los grupos con 8p normal, pérdida 8p, y ganancia 8p fueron 90,3%, 76,4%, y 94,1%, respectivamente.

Teniendo en cuenta el modelo de alteraciones, se compararon los resultados pronósticos entre tumores con cambios genéticos combinados para loci de 8p-8cen-c-myc. La supervivencia sin progresión de diez años para los grupos dominantes de modelos Normal-Normal-Normal, Pérdida-Normal-Normal, Pérdida-Ganancia-Ganancia y Pérdida-Ganancia-IA fueron 78,2%, 82,3%, 78,4%, y 30,0%, respectivamente (figura 5A). La supervivencia específica de causa de diez años para los grupos dominantes de modelos Normal-Normal-Normal, Pérdida-Normal-Normal, Pérdida-Ganancia-Ganancia, y Pérdida-Ganancia-IA fueron 89,3%, 85,7%, 82,0%, y 40,0%, respectivamente (figura 5B). Los pacientes con un modelo Pérdida-Ganancia-IA tenían de forma significativa peor supervivencia sin progresión ($p=0,0002$) y supervivencia específica de causa ($p=0,008$) que los pacientes con otros modelos.

Los análisis multivariantes demostraron que el modelo Pérdida-Ganancia-IA era una predicción significativa para la progresión sistémica y la supervivencia global, con relaciones de riesgo de 4,18 (intervalo de confianza de 95%, 1,69-10,30; $p=0,0019$) y 2,97 (95% CI, 1,12-7,89; $p=0,029$), respectivamente. El modelo Pérdida-Ganancia-IA era independiente de la escala de Gleason, la invasión de la vesícula seminal, el estado de los márgenes quirúrgicos y de la terapia adyuvante post-operativa en la predicción de la progresión sistémica y la supervivencia global (TABLAS 4A y 4B, Modelo 1).

El análisis de ploidía de ADN de FCM estándar fue posible para 119 pacientes; tumores 42 (35%) diploides, 62 (52%) tetraploides, y 15 (13%) aneuploides. Cuando estos FCMs de modelo de ploidía se incluyeron en los análisis multivariantes, el modelo Pérdida-Ganancia-IA todavía tenía las relaciones del riesgo más altas de 5,53 (95% CI, 2,02-15,12; $p=0,0009$) y 3,50 (95% CI, 1:20-10-19; $p=0,021$) para progresión sistémica y supervivencia específica de causa, respectivamente. El grupo de pacientes con el modelo de aneuploidía FCM tenían relaciones de riesgo de 2,51 ($p=0,67$) y 3,01 ($p=0,037$) para progresión sistémica y supervivencia específica de causa, respectivamente (TABLAS 4A y 4B, Modelo 2).

TABLA 4A

Variable	progresión sistémica					
	Modelo 1			Modelo 2		
	Relación de riesgo	95% CI	Valor de p	Relación de riesgo	95% CI	Valor de p
Pérdida-Ganancia-IA ^a	4,18	1,69-10,30	0,0019	5,53	2,02-15,12	0,0009
Escala de Gleason por unidad de incremento	1,01	0,75-1,36	0,95	0,94	0,67-1,32	0,73
Invasión de la vesícula seminal	2,34	1,07-5,11	0,033	2,32	0,96-5,61	0,062
Estado de Márgenes	1,27	0,53-3,02	0,59	1,19	0,45-3,19	0,72

Positivo						
Uso de terapias adyuvantes	0,42	0,17-1,02	0,054	0,44	0,17-1,17	0,10
Modelo ploidía FCM aneuploide	--	--	--	2,51	0,94-6,71	0,067
Número de pacientes		130			119	
Número de acontecimientos		35			30	

^a Pérdida-Ganancia-IA (n = 10) *versus* cualquier otro modelo de combinación.

TABLA 4B

Variable	Supervivencia global					
	Modelo 1			Modelo 2		
	Relación de riesgo	95% CI	valor de p	Relación de riesgo	95% CI	valor de p
Pérdida-Ganancia-IA ^a	2,97	1,12-7,89	0,029	3,50	1,20-10,19	0,021
Escala de Gleason	1,14	0,81-1,60	0,44	0,96	0,64-1,43	0,82
Invasión de la vesícula seminal	1,64	0,70-3,85	0,26	1,29	0,51-3,25	0,59
Estado de Márgenes Positivo	0,80	0,29-2,21	0,67	0,59	0,18-1,91	0,38
Uso de terapias adyuvantes	0,87	0,34-2,27	0,78	0,97	0,35-2,70	0,95
Modelo ploidía FCM aneuploide	--	--	--	3,01	1,07-8,49	0,037
Número de pacientes		130			119	
Número de acontecimientos		28			24	

5 ^a Pérdida-Ganancia-IA (n = 10) *versus* cualquier otro modelo de combinación.

Los tumores pueden ser más proclives a tener pérdida de 8p porque la frecuencia del modelo Pérdida-Normal-Normal (22,9%) era más alta que la del modelo Ganancia-Ganancia-Ganancia (10,4%) (flecha ancha) en la figura 1. A continuación, la ganancia del cromosoma 8 (23,6%) lo más posible es que siga a la pérdida de 8p, dando como resultado un modelo Pérdida-Ganancia-Ganancia. Finalmente, los tumores logran el modelo Pérdida-Ganancia-IA, cuando adquieren IA c-myc. En la ruta paralela (flecha estrecha de la figura 1), los tumores que inicialmente ganaban el cromosoma 8 también lograban el modelo Pérdida-Ganancia-IA cuando adquirían la pérdida de 8p y IA de c-myc.

De otras combinaciones que consistían en un pequeño número de pacientes (véase la TABLA 2), dos con modelo Pérdida-Pérdida-Normal podían ponerse en la ruta principal como una variante de la pérdida de 8p, mientras que otras combinaciones con IA de c-myc pueden no ajustarse a estas rutas.

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con su descripción detallada, la anterior descripción pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar en una muestra biológica de un sujeto la pérdida, la ganancia o el cambio en el número de copia del locus 8p21-22 del cromosoma 8, cromosoma 8, y el gen c-myc del cromosoma 8; y
- (b) correlacionar la pérdida, la ganancia o el cambio en el número de copia con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata para el sujeto.

2. El método de reivindicación 1, en el que dicho método comprende:

- 10 (a) determinar un modelo de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas al ácido nucleico de una muestra biológica de dicho sujeto, en el que dicho conjunto comprende una sonda al locus 8p21-22 del cromosoma 8, una sonda al centrómero del cromosoma 8, y una sonda al gen c-myc sobre el cromosoma 8; y
- (b) correlacionar dicho modelo de hibridación con la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata para dicho sujeto.

15 3. El método de reivindicación 1 ó 2, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de resecciones de tejido de próstata, biopsias de tejido de próstata, lavados de orina y vejiga.

4. El método de reivindicación 3, en el que dicha muestra biológica es una biopsia de tejido de próstata.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha prognosis o pronóstico se determina que es pobre cuando dicho modelo de hibridación indica la pérdida del locus 8p21-22, la ganancia del cromosoma 8, y el incremento adicional del número de copia de c-myc respecto al número de copia del centrómero.

20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que determinar dicho modelo de hibridación comprende hibridar dicho conjunto de sondas cromosómicas al ácido nucleico de dicha muestra biológica, y detectar la presencia o ausencia de la sonda hibridada.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que dichas sondas se marcan.

8. El método de reivindicación 7, en el que dichas sondas se marcan con fluorescencia.

25 9. Un kit para determinar la prognosis o pronóstico del cáncer de próstata en un sujeto, comprendiendo dicho kit un conjunto de sondas cromosómicas, en el que dicho conjunto comprende una sonda al locus 8p21-22 del cromosoma 8, una sonda al centrómero del cromosoma 8, y una sonda al gen c-myc sobre el cromosoma 8.

10. El kit de la reivindicación 9, en el que las sondas están marcadas.

11. El kit de la reivindicación 10, en el que dichas sondas se marcan con fluorescencia.

30

Figura 1

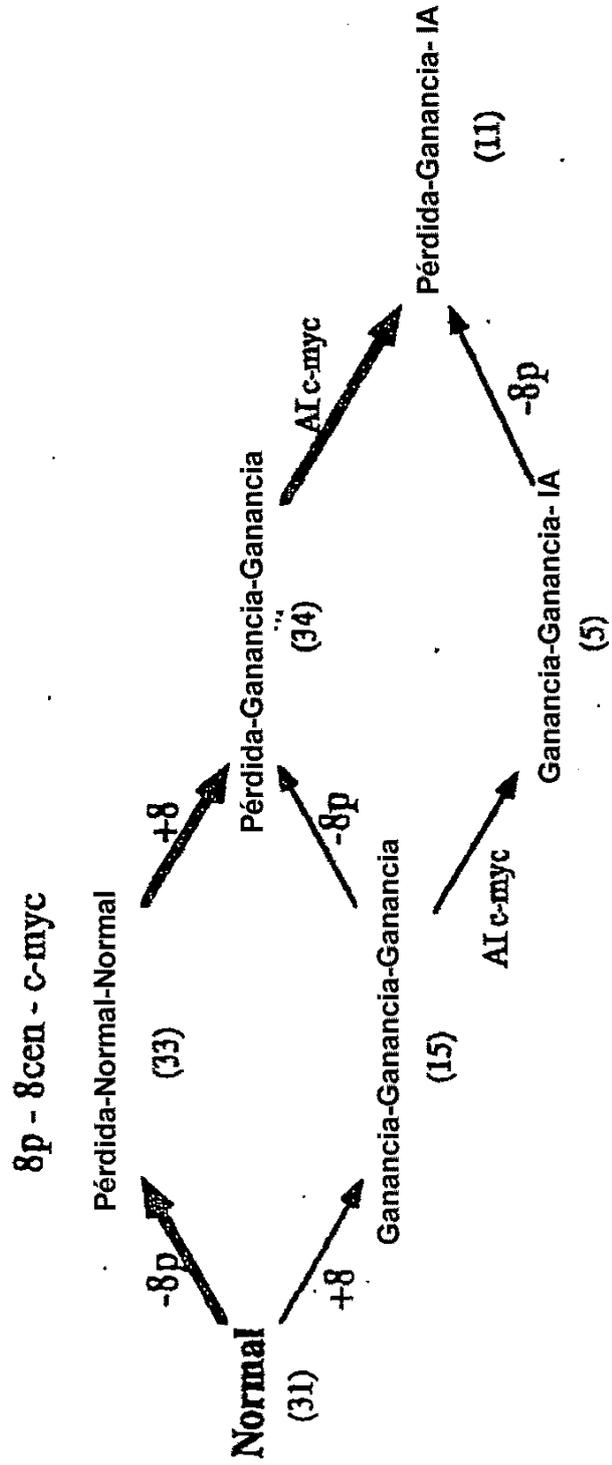


Figura 2

A)

% de núcleos con número indicado de señales c-myc

	S0	S1	S2	S3	S4	S≥5	%CEP
C0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C1	0.0	0.0	2.1	3.7	0.6	0.3	7.0
C2	0.0	0.3	20.1	17.4	1.5	1.8	42.1
C3	0.0	0.0	4.0	31.4	1.2	0.3	39.0
C4	0.0	0.0	0.0	0.3	2.4	0.9	6.7
C≥5	0.0	0.0	0.0	0.3	0.9	0.6	5.2
%c-myc	0.0	0.3	26.2	53.0	6.7	13.7	100.0

% de núcleos con número indicado de señales CEP 8

B)

% de núcleos con número indicado de señales 8p

	S0	S1	S2	S3	S4	S≥5	%CEP
C0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
C1	0.6	4.3	0.9	0.0	0.0	0.0	5.8
C2	2.2	12.0	23.4	4.0	0.3	0.0	41.8
C3	2.2	11.4	7.1	17.5	0.3	0.0	38.5
C4	0.3	1.5	3.7	0.3	1.2	0.0	7.1
C≥5	0.6	2.8	2.1	0.0	0.0	0.3	5.8
%8p	5.8	32.9	37.2	21.8	1.8	0.3	100.0

% de núcleos con número indicado de señales CEP 8

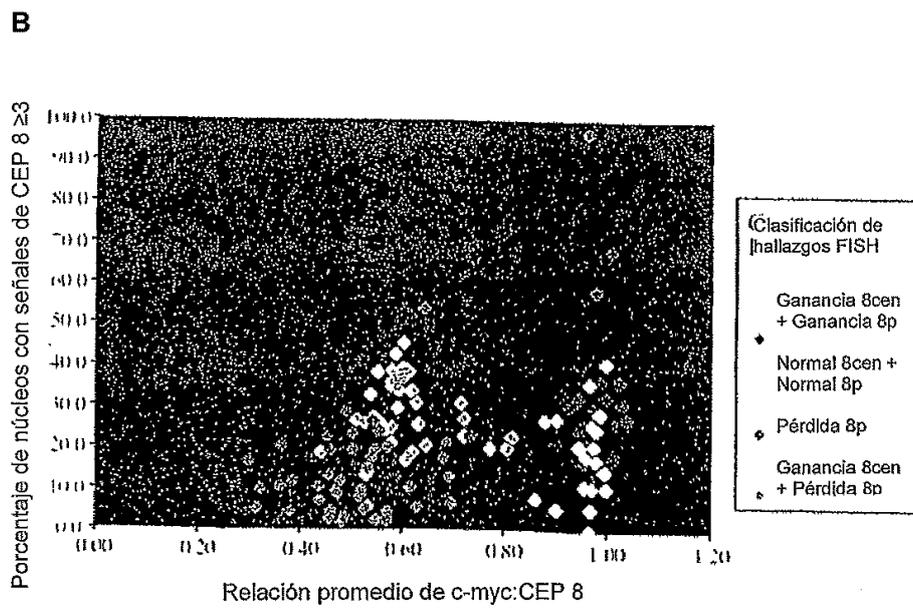
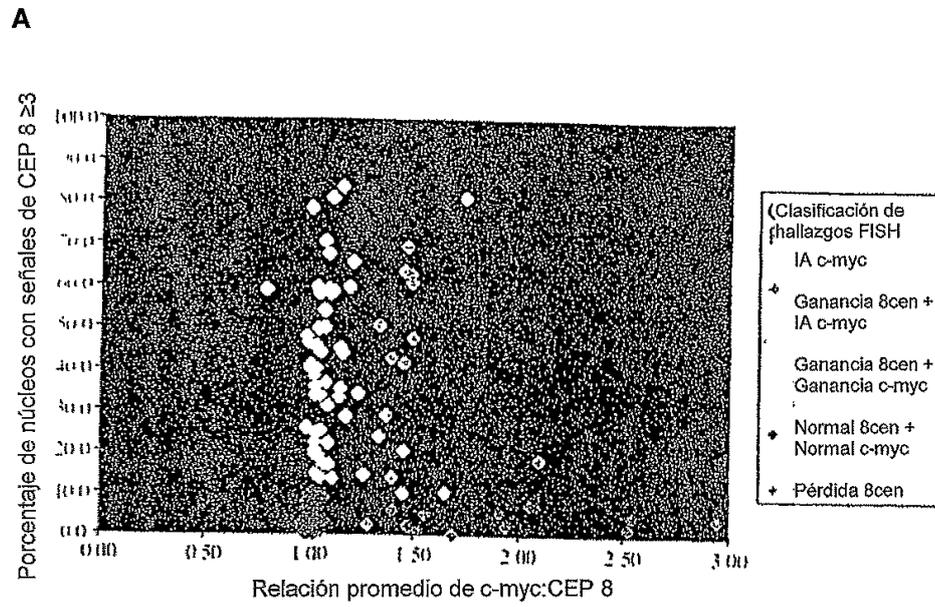


Figura 3

Figura 4A

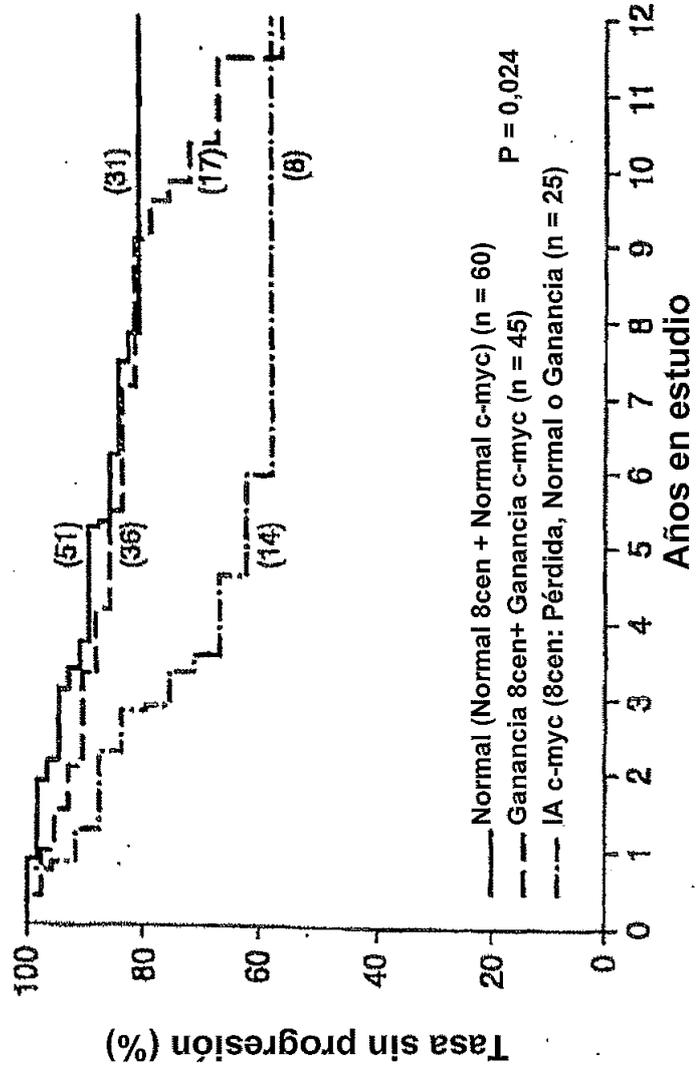


Figura 4B

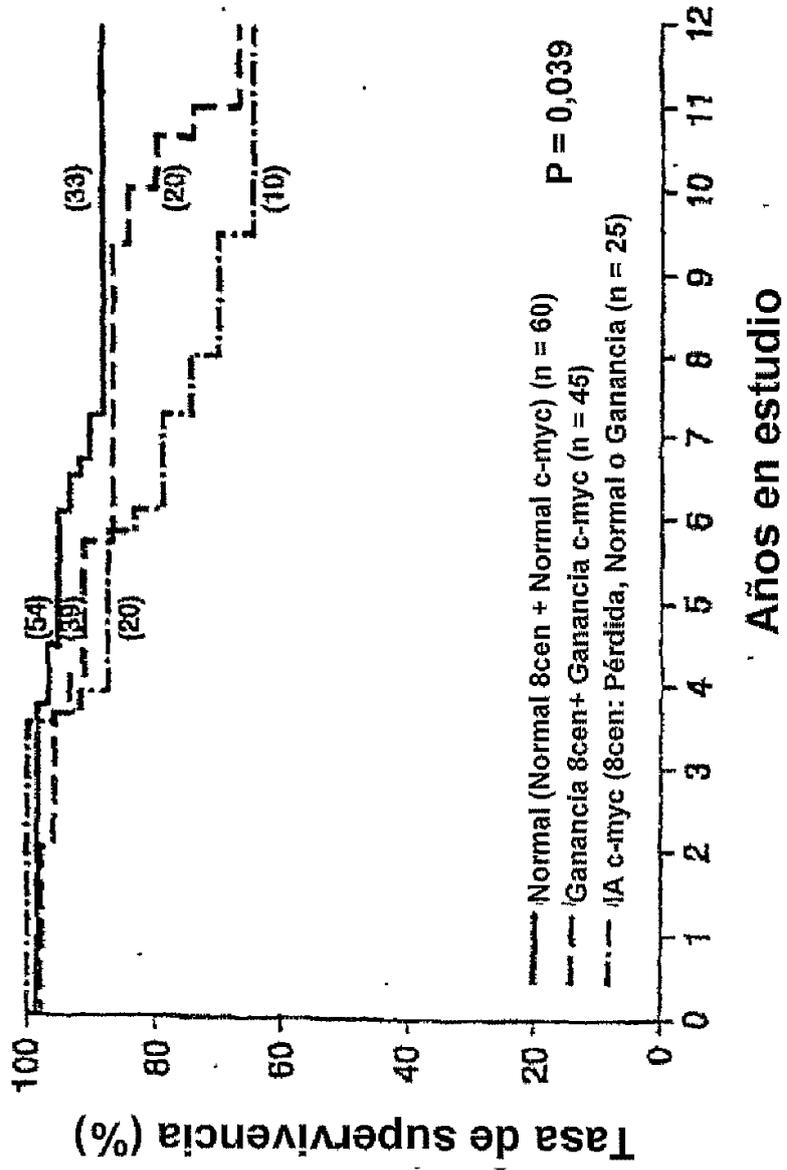


Figura 5A

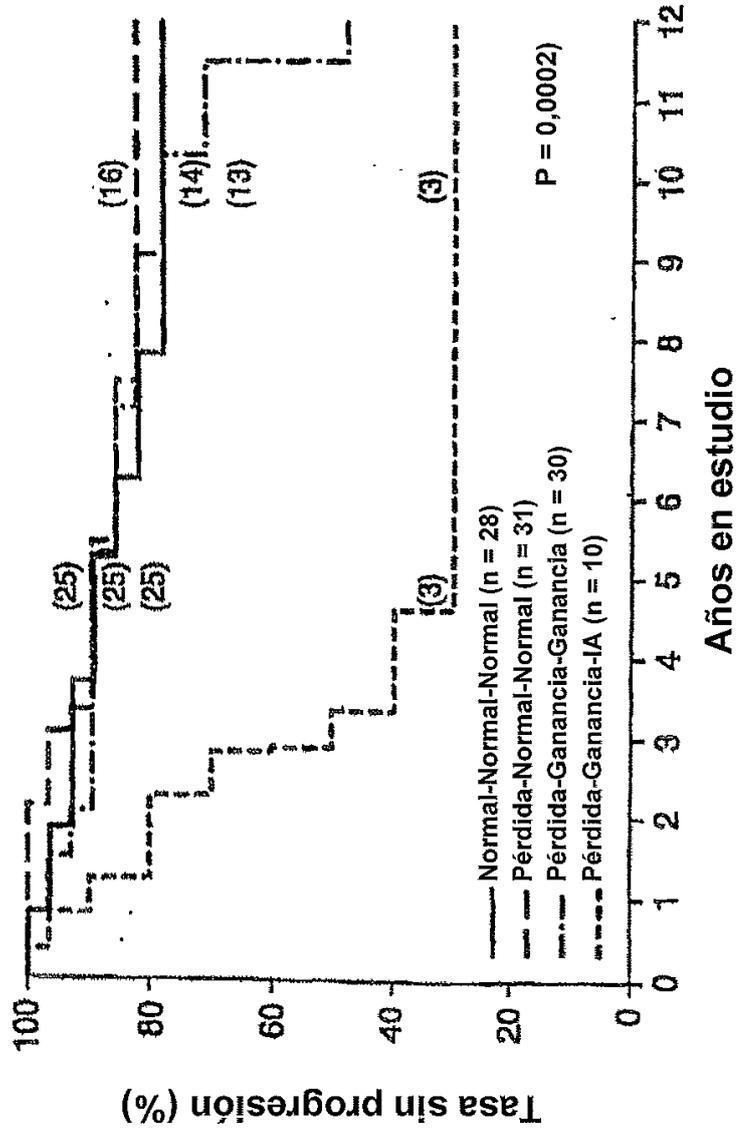


Figura 5B

