

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 509**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08826146 .6**

96 Fecha de presentación: **03.07.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2171094**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2010**

54 Título: **REORDENAMIENTOS DE GENES MIPOL 1-ETV1.**

30 Prioridad:  
**06.07.2007 US 958629 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.03.2012**

73 Titular/es:  
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
MICHIGAN  
3003 SOUTH STATE STREET  
ANN ARBOR, MI 48109, US**

72 Inventor/es:  
**CHINNAIYAN, Arul, M.;  
TOMLINS, Scott y  
DHANASEKARAN, Saravana, Mohan**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 376 509 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

Reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico, la investigación y el tratamiento de cánceres, incluyendo pero no limitados a, marcadores de cáncer. En particular, esta invención se refiere a reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 que son útiles como marcadores diagnósticos y objetivos clínicos para cáncer de próstata.

**Antecedentes de la invención**

10 La investigación del cáncer puede identificar genes que están implicados causalmente en oncogénesis. Se han identificado diversos tipos de mutaciones somáticas que dan como resultado actividad alterada de un oncogén o gen supresor de tumores, incluyendo sustituciones de bases, inserciones de bases, deleciones de bases, translocaciones de bases y ganancias y pérdidas cromosómicas. Existen evidencias convincentes de un papel causal de reordenamientos cromosómicos en cáncer (Rowley, Nat Rev Cancer 1: 245 (2001)). Aberraciones cromosómicas recurrentes han sido principalmente características de leucemias, linfomas y sarcomas. Menos del  
15 1% de los reordenamientos cromosómicos específicos de enfermedad conocidos están asociados con tumores epiteliales (carcinomas), aunque son cánceres son mucho más comunes y contribuyen a una fracción relativamente grande de la morbilidad y mortalidad asociada con cáncer humano (Mitelman, Mutat Res 462: 247 (2000)). Mientras que las malignidades hematológicas a menudo se caracterizan por reordenamientos cromosómicos específicos, la mayoría de los tumores sólidos tienen una plétora de aberraciones cromosómicas no específicas. La complejidad cariotípica de los tumores sólidos se piensa que resulta de alteraciones secundarias adquiridas a través de la evolución o progresión del cáncer.

20 Los reordenamientos cromosómicos relacionados con el cáncer pueden resultar de dos mecanismos principales. En uno, los elementos promotores/potenciadores de un gen se reordenan de forma adyacente en un protooncogén, causando así expresión alterada de una proteína oncogénica. Este tipo de translocación se ejemplifica por medio de la aposición de genes de inmunoglobulinas (IG) y receptores de linfocitos T (TCR) al oncogen MYC, que conduce a la activación oncogénica en malignidades de linfocitos T en banda, respectivamente (Rabbitts, Nature 372: 143 (1994)). En el otro mecanismo, el reordenamiento da como resultado la condensación de genes, que produce una proteína de condensación que puede tener una nueva función o actividad alterada. Este tipo de translocación se ejemplifica por la condensación de genes de BCR-ABL en leucemia mielógena crónica (CML) (Rowley, Nature 243: 290 (1973); de Klein y cols., Nature 300: 765 (1982)), que condujo al desarrollo racional de imatinib que señaló como objetivo exitosamente la cinasa BCR-ABL (Deininger y cols., Blood 105: 2640 (2005)).

30 Los reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 se describen en el presente documento, lo que es útil para diagnóstico y aplicaciones terapéuticas relacionadas con tumores epiteliales humanos. Las condensaciones génicas entre gen regulado por andrógenos TMPRSS2 y miembros de factores de transcripción de familia ETS (por ejemplo ETV1) se conocen a partir del documento de la técnica anterior WO-A-2007/033187. Dicha condensación de genes es indicadora de cáncer de próstata. El documento WO-A-2007/033187 sugiere que TMPRSS2 puede estar acompañado con miembros de la familia ETS novedosos, que son el opuesto exacto a partir de la materia sujeto de la presente invención según las reivindicaciones, a saber el acompañamiento de una ETS conocida (ETV1) con el compañero de condensación en 5' novedoso MIPOL1.

**Sumario de la invención**

40 Se revela un procedimiento para el diagnóstico de cáncer de próstata que comprende detectar la presencia o ausencia de una muestra biológica de un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1, donde la presencia en la muestra del reordenamiento genético es indicativa de cáncer de próstata en el individuo a partir de quien se obtuvo la muestra. En algunas realizaciones, la muestra es tejido, sangre, plasma, suero, orina, semen, secreciones de la  
45 próstata o células prostáticas. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende detectar reordenamientos cromosómicos de ADN genómico que codifica MIPOL1 y ETV1. La etapa de detección puede usar una técnica de secuenciación de ácidos nucleicos o una técnica de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridación *in situ* (FISH), hibridación con uno o más restos en una microdisposición, o análisis de bandas de Southern. En algunas realizaciones, la etapa de detección incluye adicionalmente amplificación de ácidos nucleicos, que pueden usar  
50 procedimientos conocidos que incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). En algunas realizaciones, la etapa de detección detecta ARNm asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 o con expresión proteica resultante de reordenamientos genéticos  
55 MIPOL1-ETV1. Tal detección puede incluir análisis de ARN y/o niveles de expresión de proteínas, o determinación de las características de secuencias.

Las composiciones se describen para diagnosticar cáncer de próstata que comprenden un reactivo que detecta directa o indirectamente una junta entre material genético de ETV1 y material genético de MIPOL1 asociada con un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1. Las realizaciones de tales reactivos incluyen: una sonda que comprende una secuencia que hibrida con la junta entre material genético de ETV1 y material genético de MIPOL1 asociada con un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1, que puede ser la junta en la que un gen ETV1 se inserta dentro de un gen MIPOL1; una combinación de primera y segunda sondas, en la que una primera sonda comprende una secuencia que hibrida al gen ETV1 y una segunda sonda comprende una secuencia que hibrida al gen MIPOL1; y al menos un primer oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente a un gen ETV1 y al menos un segundo oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen MIPOL1.

En algunas realizaciones, la composición de los oligonucleótidos de amplificación también pueden incluir una sonda que hibrida específicamente a una secuencia localizada entre las secuencias hibridadas por el primer oligonucleótido de amplificación y el segundo oligonucleótido, sonda que puede hibridar específicamente con una secuencia del gen ETV1 o en el gen MIPOL1. Todas las sondas pueden unirse directa o indirectamente a una marca que proporciona una señal detectable.

### **Descripción de las figuras**

FIG. 1 ilustra el locus de ETV1 entero reordenado a 14q13.3-14q21.1 en células de cáncer de próstata LNCaP y MDA-PCa 2B. FIG. 1, a es una ilustración esquemática del locus de ETV1 en el cromosoma 7 y FIG. 1, b es una ilustración esquemática de 14q13.3-14q21.1 en el cromosoma 14 y BAC usados como sondas para hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para detectar reordenamientos genéticos. FIG. 1, c y d ilustran FISH llevada a cabo usando BAC indicados con la marca fluorescente correspondiente en difusiones de metafase a partir de células (tetraploides) LNCaP (FIG. 1, c) y células (diploides) MDA-PCa 2B (FIG. 1, d) para detectar reordenamientos en el locus de ETV1 (panel izquierdo) y 14q13.3-14q21.1 (panel derecho). LA FIG. 1, e-g, ilustran la estructura de ETV1 y 14q13.3-14q21.1 en: células normales (FIG. 1, e), células de LNCaP (FIG. 1, f) y células de MDA-PCa 2B (FIG. 1, g), según se determina por FISH para todas.

LA FIG. 2 muestra que el locus de ETV1 está reordenado al cromosoma 14 en células LNCaP. La FIG. 2, a-b, son ilustraciones esquemáticas de BAC usados a partir de cromosomas 7p y 14q32, respectivamente (previamente mapeado de FISH para cromosoma 14). LA FIG. 2, c, ilustra FISH usando BAC marcados con la marca fluorescente indicada mostró dos copias de ETV1 en el cromosoma 7 y dos copias en el cromosoma 14, como se identifica por RP11-483K13.

FIG. 3 muestra la identificación del punto de corte genómico en el locus de ETV1 en células LNCaP. FIGURA 3, a ilustra FISH usada para limitar la región de punto de corte entre los BAC 12 y 2, tal como se muestra en verde en FIG. 3, b, ya que BAC 1 y 12 están colocados en el cromosoma 7 y en el cromosoma 14. FIG. 3, b ilustra una serie de 22 sondas (A-Q) para realización de la prueba de bandas de Southern que se diseñaron para abarcar la región implicada. LA FIG. 3, c ilustra un mapa de restricción de la Sonda A, con sitios de restricción para PstI y EcoRI indicados, que fue la única sonda para mostrar bandas reordenadas en realización de la prueba de bandas de Southern. FIG. 3, d, ilustra realización de la prueba de bandas de Southern con Sonda A que mostró bandas adicionales en ADN genómico de LNCaP digerido con EcoRI y PstI, pero no en VCaP, ADN genómico de macho normal ("Nor macho") o ADN de placenta humana. LA FIG. 4 muestra PCR inversa que identifica la inserción de ETV1 dentro del locus MIPOL1 en el cromosoma 14. FIG. 4, a ilustra, una serie de cebadores de PCR divergente diseñados para PCR reversa (A3-B3) que se basaban en la detección de reordenamientos en ADN genómico de LNCaP digerido con EcoRI y PstI usando Sonda A. FIG. 4, b ilustra los resultados obtenidos a partir de amplificación por PCR usando PCR anidados subsiguientemente con A1 y B1 (1), A2 y B2 (2), y A3 y B3 (3) en ADN genómico de LNCaP de paso bajo (L) y alto (H) digerido con PstI. FIG. 4, c ilustra la secuencia del producto de PCR anidado de A3 y B3 (mostrados en la FIG. 4, b) en el que el punto de corte de ADN se muestra en rojo y la secuencia compañera fue ADN intrónico del locus de MIPOL1 en 14q13.3-14q21.1. FIG. 4, d ilustra la localización del punto de corte mostrada por un asterisco. FIG. 4, e ilustra cebadores diseñados (como se muestra en FIG. 4, c) para confirmar la condensación por PCR en ADN no digerido, en la que PCR confirmó la condensación tanto en células LNCaP de paso bajo como de paso alto, pero no en VCaP, ADN genómico de macho normal ("Nor macho") o ADN de placenta humana.

FIG. 5 muestra que el telómero 7p está retenido en todas las copias del cromosoma 7 en LNCaP, usando FISH llevada a cabo usando sondas centroméricas y teloméricas 7p de cromosoma 7 en metafases de LNCaP. Todas las cuatro copias de cromosoma 7 identificadas por las sondas centroméricas retuvieron su secuencia telomérica 7p, demostrando que el reordenamiento de ETV1 no es una translocación ni implica una delección telomérica en 7p.

FIG. 6 muestra que ETV1 y los genes contiguos en 14q13.3-14q21.1 están regulados coordinadamente en cáncer de próstata, LNCaP y el derivado C4-2B de LNCaP insensible a andrógenos. FIG. 6, a ilustra la especificidad de tejido de los 4 genes contiguos en la región 14q13.3-14q21.1 que se interrogó en el conjunto de datos expo (usando Oncomine) y la expresión (en unidades de expresión normalizadas) se mostró para 28 tipos de tumor distintos y para cáncer de próstata. FIG. 6, b y c ilustran la regulación de andrógenos de los genes contiguos 14q13.3-14q21.1 (FIG.

6, b) y ETV1 (FIG. 6, c), según se determina por qPCR en células LNCaP con (+) o sin (-) estimulación por el andrógeno sintético R1881. Se muestran las proporciones de gen objetivo a GAPDH (promedio (n = 4) + error estándar). FIG. 6, d ilustra que LNCaP y su derivado insensible andrógeno, C4-2B, se perfiló usando una microdisposición (Microensayos de Genoma Completo Agilent), en la que se muestran las diez características expresadas más diferencialmente (LNCaP/C4-2B). LA FIG. 6, e-g ilustra los resultados qPCR que muestran expresión disminuida de genes regulados por andrógeno en C4-2B comparadas con LNCaP, para ETV de marcadores (FIG. 6, e) y para PSA (FIG. 6, f) y los 4 transcritos contiguos en 14q13.3-14q21.1 (FIG. 6, g).

FIG. 7 muestra que MDA-PCa 2B tienen expresión de valor extremo de ETV1, en la que la expresión de ERG y ETV1 se determinó por qPCR para las líneas celulares de cáncer de próstata MDA-PCa 2B, LNCaP, PC3, NCI-H660, 22RV1, VCaP, DU145, LAPC4 y a la línea de células epiteliales de próstata benigna inmortalizada RWPE y las cantidades de ERG y ETV1 para cada muestra se normalizaron a la cantidad promedio de GAPDH y HMBS para cada muestra.

LA FIG. 8 muestra que las C4-C2B derivadas insensibles a andrógenos de LNCaP albergan el mismo reordenamiento de ETV1 que la línea celular LNCaP parental. FIG. 8, a es una figura esquemática del locus de ETV1 7 en el cromosoma 7 y se usaron BAC como sondas para hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para detectar reordenamientos en el locus de ETV1, en el que las localizaciones de puntos de corte identificados en LNCaP están indicadas por un asterisco. LA FIG. 8, b ilustra los resultados obtenidos por FISH usando BAC indicados con la marca fluorescente correspondiente en C4-2B (tetraploides). LA FIG. 8, c ilustra los resultados obtenidos por PCR usando cebadores de cromosomas 7 y 14 que confirmaron el reordenamiento del locus de ETV1 en C4-2B, de forma similar a las LNCaP de paso bajo y de paso alto y en los que no se obtuvo ningún producto a partir de otras líneas celulares de cáncer de próstata, ADN de placenta humana, o ADN humano masculino normal.

LA FIG. 9 muestra que las C4-C2B derivadas insensibles a andrógenos de LNCaP albergan el mismo reordenamiento de ETV1 que la línea celular LNCaP parental. LA FIG. 9, es una ilustración esquemática del locus de ETV1 (púrpura) en el cromosoma 7 (azul) y BAC usados como sondas para hibridación in situ de fluorescencia (FISH) para detectar reordenamientos en el locus de ETV1. LA FIG. 9, b ilustra los resultados obtenidos por FISH llevada a cabo usando los BAC indicados con la correspondiente marca fluorescente en C4-2B (tetraploides). LA FIG. 9, c ilustra los resultados obtenidos por PCR usando cebadores de cromosomas 7 y 14 que confirmaron el reordenamiento del locus de ETV1 en C4-2B, de forma similar a las LNCaP de paso bajo y de paso alto y en los que no se obtuvo ningún producto a partir de otras líneas celulares de cáncer de próstata, ADN de placenta humana, o ADN humano masculino normal.

### **Definiciones**

Para facilitar una comprensión de esta revelación, se definen a continuación términos:

Como se usa en el presente documento, "reordenamiento del gen" o "reordenamiento genético" se refiere a cualquier disposición alterada de ADN genómico que resulta del reordenamiento cromosómico de dos regiones distintas, dos genes diferentes o partes de dos genes diferentes. El producto de un reordenamiento genético incluye una condensación de material genético que no existe en la ausencia del reordenamiento genético. Es decir, el reordenamiento genético da como resultado un reordenamiento genético en una junta que condensa una secuencia genética a otra secuencia genética para producir una junta que no existe en un genoma no reordenado de tipo silvestre. Ejemplos de reordenamientos genéticos incluyen, pero no se limitan a, inserciones de todo o parte de un primer gen o locus genético en un segundo gen o locus genético. En algunos casos, una inserción puede dar lugar a una nueva configuración de los genes primero y segundo o de los locus genéticos que cambian la regulación de expresión, por ejemplo, dando como resultado una expresión incrementada o disminuida de una proteína de tipo silvestre. En otros casos, una inserción puede dar como resultado una condensación génica o ADN quimérico que se transcribe para fabricar un ARN quimérico, que puede traducirse para fabricar proteína(s) alterada(s) comparadas con proteína(s) de tipo silvestre, es decir dando como resultado un producto nuevo que es diferente que el fabricado en una configuración de tipo silvestre.

Como se usa en el presente documento, "condensación génica" puede referirse a un ADN de genoma quimérico, un ARNm quimérico que se transcribe a partir de un ADN quimérico (que puede referirse como "ARN de condensación génica") o una proteína traducida a partir del ARNm quimérico que se transcribe a partir de un ADN quimérico. Un "proteína de condensación génica" (o "polipéptido de condensación génica") puede ser una proteína truncada comparada con proteína de tipo silvestre, o una proteína quimérica resultante de la expresión de al menos una parte de un primer gen condensado a al menos una parte de un segundo gen. Una condensación génica (o un ARN transcrito a partir de la condensación génica de ADN) no necesita incluir genes completos o exones de genes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "regiones reguladoras transcripcionales" se refiere a la secuencia reguladora anterior en la cadena no codificante de un gen, también llamada la región 5' no traducida (5'UTR).

Como se usa en el presente documento, los términos "detectar", "detectando" o "detección" pueden describir bien la acción general de descubrir o distinguir o bien la observación específica de una composición marcada detectablemente.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe al menos una actividad biológica de un gen de condensación" hace referencia a cualquier agente que disminuye cualquier actividad de una condensación génica revelada en el presente documento, sus transcritos y/o productos de traducción (*por ejemplo*, incluyendo, pero no limitados a, las actividades descritas en el presente documento), por medio de poner en contacto directamente una proteína de condensación génica, poner en contacto ARNm de condensación o ADN genómico de condensación, causar cambios conformacionales de polipéptidos de condensación génica, disminuir niveles de proteína de condensación génica, o interferir con las interacciones de condensación génica con compañeros de señalización y afectar la expresión de condensaciones génicas de objetivo (es decir, la transcripción o traducción de los transcritos resultantes). Los inhibidores incluyen también moléculas que regulan indirectamente actividad biológica de condensación génica interceptando moléculas de señalización anteriores en la cadena.

15 Como se usa en el presente documento, el término "ARNip" se refiere a los ARN de interferencia pequeños. En algunas realizaciones, los ARNip comprenden un dúplex, o región bicatenaria, de aproximadamente 18-25 nucleótidos de largo; a menudo los ARNip contienen de aproximadamente dos a cuatro nucleótidos no emparejados en el extremo 3' de cada hebra. Al menos una cadena del dúplex o región de cadena doble o un ARNip es sustancialmente homólogo a, o sustancialmente complementario a, una molécula de ARN objetivo. La hebra complementaria a una molécula de ARN objetivo es la "hebra antisentido"; la hebra homóloga a la molécula de ARN objetivo es la "cadena en sentido correcto" y también es complementaria de la hebra antisentido de ARNip. ARNip también pueden contener secuencias adicionales; ejemplos no limitantes de tales secuencias incluyen secuencias de unión, o bucles, así como estructuras troncales y otras estructuras plegadas. ARNip parecen funcionar como intermediarios clave en activar interferencia de ARN en invertebrados y en vertebrados y en activar degradación de ARN específica de secuencia durante silenciamiento génico postranscripcional en plantas.

25 El término "ARN de interferencia" o "ARNi" se refiere a la silenciamiento o a la disminución de expresión génica por ARNip. Es el procedimiento de silenciamiento génico postranscripcional, específica de secuencia en animales y plantas, iniciado por ARNip que es homólogo en su región de dúplex a la secuencia del gen silenciado. El gen puede ser endógeno o exógeno para el organismo, integrado presente en un cromosoma o presente en un vector de transfección que no está integrado dentro del genoma. La expresión del gen bien está completa o bien está parcialmente inhibida. También puede considerarse ARNi para inhibir la función de un ARN objetivo; la función del ARN objetivo puede estar completa o ser parcial.

Como se usa en el presente documento, el término "fase de cáncer" se refiere a una valoración cualitativa o cuantitativa del nivel de avance de un cáncer. Los criterios aplicados a determinar la fase de un cáncer incluyen, pero no se limitan a, el tamaño del tumor y el grado de metástasis (*por ejemplo*, localizadas o distantes).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de transferencia de genes" se refiere a cualquier medio de suministrar una composición que comprende una secuencia de ácidos nucleicos a una célula o tejido. Por ejemplo, los sistemas de transferencia de genes incluyen, pero no se limitan a, vectores (por ejemplo, retrovíricos, adenovíricos, víricos adenoasociados y otros sistemas de suministro a base de ácidos nucleicos), microinyección de ácido nucleico desnudo, sistemas de suministro a base de polímeros (por ejemplo, sistemas a base de liposomas y a base de partículas metálicas), inyección biolística y similares. Como se usa en el presente documento, la expresión "sistema de transferencia de genes víricos" se refiere a sistemas de transferencia de genes que comprenden elementos víricos (por ejemplo, virus intactos, virus modificados y componentes víricos tales como ácidos nucleicos o proteínas) para facilitar el suministro de la muestra a una célula o tejido deseados. Como se usa en el presente documento, el término "sistema de transferencia de genes de adenovirus" se refiere a sistemas de transferencia de genes que comprenden virus intactos o alterados pertenecientes a la familia Adenoviridae.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencias objetivo de recombinación específicas de sitio" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que proporcionan secuencias de reconocimiento para factores de recombinación y a la localización donde tiene lugar dicha recombinación.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácidos nucleicos" se refiere a cualquier molécula que contenga ácidos nucleicos, incluidos, pero no limitados a, ADN o ARN. El término abarca secuencias que incluyen cualquiera de las bases análogas de ADN y ARN conocidas incluidas, pero no limitadas a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2 metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo,

éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante siempre que se mantengan la actividad o propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, actividad enzimática, unión de ligandos, transducción de señales, inmunogenicidad, etc.) de la longitud completa o fragmento. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante tanto en el extremo 5' como en el 3' a lo largo de una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo tal que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas 5' con respecto a la región codificante y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o más adelante en la cadena de la región codificante y presentes en el ARNm se refieren como secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca las formas tanto de ADNc como genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificadas denominadas "intrones" o "regiones interventoras" o "secuencias interventoras". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben a ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se retiran o se "eliminan por ajuste" del transcrito nuclear o primario; los intrones, por lo tanto, están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducido en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen originario de un organismo que ha sido alterado de algún modo (por ejemplo, mutado, añadido en varias copias, unido a secuencias reguladoras no originales, etc.). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos en que las secuencias de genes heterólogos normalmente están unidas a secuencias de ADN que no se encuentran asociadas de forma natural con las secuencias del gen en el cromosoma o están asociadas con porciones del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en loci en los que el gen no se expresa normalmente).

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una longitud corta de cadena polinucleotídica de cadena sencilla. Los oligonucleótidos normalmente tiene una longitud de menos de 200 residuos (por ejemplo, entre 15 y 100), no obstante, como se usa en el presente documento, se pretende que el término también abarque cadenas polinucleotídicas más largas. Frecuentemente se hace referencia a los oligonucleótidos por su longitud. Por ejemplo un oligonucleótido de 24 residuos se denomina "24-mero". Los oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias y terciarias autohibridando o hibridando con otros polinucleótidos. Tales estructuras pueden incluir, pero no se limitan a, dúplex, horquillas, cruciformes, codos y tríplex.

Como se usa en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'", es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos están apareadas de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O puede existir complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Esto es de especial importancia en reacciones de amplificación, así como en procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede existir homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que impide, al menos parcialmente, que una molécula de ácido nucleico completamente complementaria hibride con un ácido nucleico objetivo que es "sustancialmente homólogo". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia objetivo puede examinarse usando un ensayo de hibridación (bandas de Southern o northern, hibridación de soluciones y similares) según condiciones de restrictividad baja. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá con e impedirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a un objetivo según condiciones de restrictividad baja. Esto no quiere decir que las condiciones de restrictividad baja sean tales que permitan la unión no específica; las condiciones de restrictividad baja requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede probarse por el uso de un segundo objetivo que es sustancialmente no complementario (por ejemplo, identidad de menos de aproximadamente el 30 %); en la ausencia de unión no específica la sonda no hibridará al segundo objetivo no complementario.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena tal como un ADNc o un clon genómico, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con cualquiera

de las dos cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena según condiciones de restrictividad baja como se describe anteriormente.

Un gen puede producir varias especies de ARN que se generan por ajuste diferencial del transcrito primario de ARN. Los ADNc que son variantes de ajuste del mismo gen contendrán regiones con identidad de secuencia u homología completa (que representan la presencia del mismo exón o una parte del mismo exón en ambos ADNc) y regiones de no identidad completa (por ejemplo, representando la presencia del exón "A" en el ADNc 1, en las que el ADNc 2 contiene el exón "B" en su lugar). Debido a que los dos ADNc contienen regiones de identidad de secuencia, ambos hibridarán con una sonda derivada del gen entero o de partes del gen que contienen secuencias encontradas en ambos ADNc; las dos variantes de ajuste son, por lo tanto, sustancialmente homólogas a una sonda tal y entre sí.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar (es decir, es complementaria a) con la secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla según condiciones poco rigurosas como se describe anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) están condicionadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la restrictividad de las condiciones implicadas, la  $T_m$  del híbrido formado y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Se dice que una molécula sencilla que contenga apareamientos de ácidos nucleicos complementarios dentro de su estructura está "autohibridada".

Como se usa en el presente documento, el término "restrictividad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, según las que se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. Según "condiciones de restrictividad baja" una secuencia de ácidos nucleicos de interés hibridará con su complementario exacto, secuencias con emparejamiento inadecuado de bases sueltas, secuencias muy relacionadas (por ejemplo, secuencias con una homología del 90 % o superior) y secuencias que tengan homología sólo parcial (por ejemplo, secuencias con una homología del 50-90 %). Según "condiciones de restrictividad media", una secuencia de ácidos nucleicos de interés hibridará sólo con su complementario exacto, secuencias con apareamiento inadecuado de bases individuales y secuencias relacionadas estrechamente (por ejemplo, homología del 90 % o mayor). Según "condiciones de restrictividad alta" una secuencia de ácidos nucleicos de interés hibridará sólo con su complementario exacto y (dependiendo de condiciones tales como la temperatura) secuencias con emparejamiento inadecuado de bases sueltas. En otras palabras, según condiciones de restrictividad alta también puede elevarse la temperatura con el fin de excluir la hibridación con secuencias con emparejamiento inadecuado de bases sueltas.

"Condiciones de restrictividad alta" cuando se usa en referencia a hibridación de ácidos nucleicos comprende condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución consistente en SSPE 5 X (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5 X y 100  $\mu\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguida de lavado en una solución que comprende SSPE 0,1 X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

"Condiciones de restrictividad media" cuando se usa en referencia a hibridación de ácidos nucleicos comprende condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución consistente en SSPE 5 X (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5 X y 100  $\mu\text{ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguida de lavado en una solución que comprende SSPE 1,0 X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

"Condiciones de restrictividad baja" comprende condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42 °C en una solución consistente en SSPE 5 X (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1 %, reactivo de Denhardt 5 X [el reactivo de Denhardt 50 X contiene por 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fracción V; Sigma)] y 100  $\mu\text{g/ml}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado seguida de lavado en una solución que comprende SSPE 5 X, SDS al 0,1 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

Es bien sabido en la técnica que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para comprender las condiciones poco rigurosas; se tienen en consideración factores tales como la longitud y naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en disolución o inmovilizada, etc.) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y puede variarse la solución de hibridación para generar condiciones de hibridación poco rigurosa diferentes, pero equivalentes a las condiciones enumeradas anteriormente. Además, en la técnica se conocen condiciones que promueven la hibridación según condiciones muy rigurosas (por

ejemplo, incrementar la temperatura de las etapas de hibridación y/o lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc.) (véase la definición anterior de "restrictividad").

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido de amplificación" se refiere a un oligonucleótido que hibrida con un ácido nucleico objetivo, o con su complemento y que participa en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Un ejemplo de un oligonucleótido de amplificación es un "cebador" que se hibrida con un ácido nucleico de plantilla y que contiene un extremo 3' OH que se prolonga por una polimerasa en un procedimiento de amplificación. Otro ejemplo de un oligonucleótido de amplificación es un oligonucleótido que no se prolonga por una polimerasa (por ejemplo, debido a que tiene un extremo 3' bloqueado) pero participa en o facilita la amplificación. Los oligonucleótidos de amplificación pueden incluir opcionalmente nucleótidos modificados o análogos, o nucleótidos adicionales que participan en una reacción de amplificación pero no son complementarios a o no están contenidos en el ácido nucleico objetivo. Los oligonucleótidos de amplificación pueden contener una secuencia que no sea complementaria a la secuencia objetivo o de plantilla. Por ejemplo, la región 5' de un cebador puede incluir una secuencia promotora que no es complementaria al ácido nucleico objetivo (referida como un "promotor-cebador"). Los expertos en la técnica entenderán que un oligonucleótido de amplificación que funciona como un cebador puede modificarse para incluir una secuencia promotora 5' y por lo tanto funcionar como un promotor-cebador. De forma similar, un promotor-cebador puede modificarse por la retirada de, o por la síntesis sin, una secuencia promotora y funcionar todavía como un cebador. Un oligonucleótido de amplificación 3' bloqueado puede proporcionar una secuencia promotora y servir como una plantilla para polimerización (referida como un "promotor-proveedor").

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea que se dé en la naturaleza como en una digestión de restricción purificada o se produzca sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de síntesis cuando se sitúa en condiciones en las que la síntesis de un producto de prolongación de cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico se induce, (*es decir*, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferentemente de cadena sencilla para eficiencia máxima en amplificación, pero alternativamente puede ser de cadena doble. Si es de cadena doble, se trata primero el cebador para separar sus hebras antes de que se use para preparar productos de prolongación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente de cebador y el uso del procedimiento.

Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea que se dé en la naturaleza como en una digestión de restricción purificada o se produzca sintéticamente, recombinantemente o por amplificación por PCR, que es capaz de hibridar con al menos una parte de otro nucleótido de interés. Una sonda puede ser de hebra simple o de hebra doble. Las sondas son útiles en la detección, la identificación y el aislamiento de las secuencias génicas particulares. Se considera que cualquier sonda usada en los procedimientos revelados puede marcarse con una "molécula indicadora", tal que es detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero no limitado a sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. Las composiciones y procedimientos que usan tales composiciones como se revelan en el presente documento no se limitan a cualquier sistema o marca de detección particular.

El término "aislado" cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "un polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se identifica y se separa de al menos un componente o contaminante con el que está asociado normalmente en su fuente natural. El ácido nucleico está presente, por tanto, en una forma o configuración que es diferente de aquella en la que se encuentra en la naturaleza. En cambio, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales como ADN o ARN que se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped próxima a sus genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos otros ARNm que codifican multitud de proteínas. Sin embargo, los ácidos nucleicos aislados que codifican una proteína incluyen, a modo de ejemplo, tales ácidos nucleicos en células que normalmente expresan la proteína dada donde el ácido nucleico está en una posición cromosómica diferente de la de células naturales, o por el contrario está flanqueado por una secuencia de ácidos nucleicos diferente de la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma de cadena simple o de cadena doble. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a utilizar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra en sentido correcto o codificante (*es decir*, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser de cadena sencilla), pero puede contener las cadenas tanto sentido como antisentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser de doble cadena).

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la retirada de componentes (*por ejemplo*, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos se purifican mediante la retirada de proteínas no inmunoglobulinas contaminantes; también se purifican mediante la retirada de inmunoglobulinas que no

se unen a la molécula diana. La retirada de proteínas no inmunoglobulinas y/o la retirada de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula diana da como resultado un incremento en el porcentaje de inmunoglobulinas reactivas con la diana en la muestra. En otro ejemplo, se expresan polipéptidos no glucosilados en células huésped bacterianas y se purifican los polipéptidos mediante la retirada de proteínas de la célula huésped; el porcentaje de polipéptidos recombinantes se incrementa de este modo en la mezcla.

### **Descripción detallada de la invención**

Las composiciones y procedimientos revelados se basan en el descubrimiento de reordenamientos de genes recurrentes en cáncer de próstata. Estas composiciones y procedimientos son útiles para aplicaciones de diagnóstico, procedimientos terapéuticos y evaluación de tratamientos terapéuticos que bien directa o bien indirectamente detectan o marcan como objetivo reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1.

#### **I. Reordenamientos de gen**

Los reordenamientos de genes recurrentes revelados en el presente documento son indicadores de cáncer de próstata. Estos reordenamientos genéticos resultan de reordenamientos cromosómicos que insertan material genético de MIPOL1 dentro del locus genético de ETV1. Estos reordenamientos genéticos recurrentes son útiles como marcadores diagnósticos y objetivos clínicos para cáncer de próstata.

En algunas realizaciones, todo o una parte del ETV1 está insertado dentro del locus de MIPOL1 (por ejemplo, dentro de un intrón). El reordenamiento genético es detectable, por ejemplo, como un reordenamiento cromosómico del ADN genómico que tiene al menos una parte de un gen ETV1 dentro de un locus de MIPOL1.

#### **II. Anticuerpos**

Los reordenamientos genéticos revelados en el presente documento dan como resultado proteínas, que incluyen fragmentos, derivados y análogos de los mismos, que pueden usarse como inmunógenos para producir anticuerpos útiles para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Tales anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, quiméricos, humanizados, de cadena simple o fragmentos Fab, que pueden estar marcados o no marcados, todos los cuales se pueden producir usando procedimientos bien conocidos y prácticas de laboratorio estándar. Véase, *por ejemplo*, Burns, ed., *Immunochemical Protocols*, 3ª ed., Humana Press (2005); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Kozbor y cols., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Köhler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975).

#### **III. Aplicaciones de diagnóstico**

Los reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 revelados proporcionan ADN, ARN y procedimientos diagnósticos basados en proteínas que detectan, bien directa o bien indirectamente, los reordenamientos genéticos o un producto hecho específicamente como un resultado del reordenamiento genético. Los reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 revelados también proporcionan composiciones útiles para propósitos diagnósticos, tales como sondas oligonucleotídicas que detectan específicamente todo o parte del reordenamiento genético. Tales composiciones pueden estar en forma de un kit.

Los procedimientos diagnósticos revelados pueden ser cualitativos o cuantitativos. Los procedimientos cuantitativos pueden, por ejemplo, discriminar entre cánceres que no causan dolor y agresivos por medio de un punto límite o nivel umbral donde la expresión por encima de ese nivel proporciona información sobre la agresividad del cáncer que proporciona información de diagnóstico y/o información de pronóstico útil para un médico de cabecera o para un paciente. Los procedimientos diagnósticos cualitativos o cuantitativos pueden incluir amplificación de un objetivo, señal o intermediario, tal como usando un cebador universal que amplifica una secuencia que sirve como un indicador de la presencia o el nivel del objetivo específico asociado con el reordenamiento genético de MIPOL1-ETV1.

Un ensayo inicial puede confirmar la presencia de un reordenamiento de genes pero no identificar el reordenamiento específico. Un ensayo secundario se llevó a cabo después para determinar la identidad del reordenamiento particular, si se desea. El segundo ensayo puede usar una tecnología de detección diferente que el ensayo inicial.

El reordenamiento genético de MIPOL1-ETV1 revelado se puede detectar junto con otros marcadores en un formato de panel o en un formato múltiple. Los marcadores se seleccionan por su valor predictivo solos o en combinación con los reordenamientos genéticos. Marcadores de cáncer de próstata ejemplares incluyen, pero no se limitan a: AMACR/P504S (Patente de los EE.UU. N.º: 6.262.245); PCA3 (Patente de los EE.UU. N.º: 7.008.765); PCGEM1 (Patente de los EE.UU. N.º 6.828.429); proteína/P501S, P503S, P504S, P509S, P510S, prostata/P703P, P710P (Publicación de los EE.UU. N.º: 20030185830); y aquellos desvelados en las Patentes de los EE.UU. N.ºs 5.854.206 y 6.034.218 y la Publicación de los EE.UU. N.º: 20030175736. Marcadores para otros cánceres, enfermedades, infecciones y afecciones metabólicas se contemplan también para su inclusión en un múltiplex de formato panel.

Los procedimientos diagnósticos como se describen en el presente documento se pueden modificar con referencia a datos que correlacionan reordenamientos de genes particulares con la fase, agresividad o progresión de la enfermedad o la presencia o riesgo de metástasis. La información proporcionada por estos procedimientos diagnósticos proporciona información útil a un médico quien, en base a esa información, puede elegir un tratamiento terapéutico apropiado para un paciente particular.

#### A. Muestra

Cualquier muestra biológica sospechosa de contener los reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1 puede ponerse a prueba de acuerdo con los procedimientos revelados. Una muestra tal puede ser una muestra de tejido (por ejemplo, muestra de biopsia de próstata o tejido obtenido por prostatectomía), sangre, orina, semen, secreciones prostáticas o una fracción de las mismas (por ejemplo, plasma, suero, sobrenadante de orina, orina, sedimento celular de orina o células de la próstata), que puede obtenerse a partir de un paciente o de otra fuente de material biológico, por ejemplo, muestra de autopsia o material forense. En realizaciones preferidas, se recogió una muestra de orina inmediatamente tras un examen rectal digital (DRE) atento, que causa que las células de la próstata se derramen en el tracto urinario desde la glándula prostática.

La muestra puede procesarse para aislar o enriquecer la muestra para los reordenamientos de genes o para las células que contienen los reordenamientos de genes. Una diversidad de técnicas de pocillos que usan prácticas de laboratorio estándar pueden usarse para este propósito, tales como, por ejemplo, centrifugación, inmunocaptura, lisis celular y captura del objetivo de ácido nucleico (véase, *por ejemplo*, la Patente EP N.º: 1 409 727).

#### B. Detección de ADN y ARN

Los reordenamientos MIPOL1-ETV1 genéticos revelados se pueden detectar como redistribuciones cromosómicas de ADN genómico o como ARNm quimérico producido a partir de un reordenamiento cromosómico usando una diversidad de técnicas de ácidos nucleicos bien conocidas que dependen de procedimientos de laboratorio estándar, tales como, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos y amplificación de ácidos nucleicos.

##### 1. Secuenciación

Ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación de terminador de cadena (Sanger) y secuenciación de terminador de tinción. Aquellos de habilidad normal en la técnica reconocerán que debido a que el ARN es menos estable en la célula y más propenso al ataque de nucleasas el ARN experimentalmente se suele transcribir de forma reversa a ADN antes de secuenciación.

La secuenciación de terminador de cadena usa terminación específica de secuencia de una reacción de síntesis de ADN usando sustratos de nucleótidos modificados. La prolongación se inició en un lugar específico sobre el ADN de plantilla usando un cebador oligonucleotídico radiactivo, o marcado de otra manera, corto complementario a la plantilla en esa región. El cebador de oligonucleótidos se amplía usando una ADN polimerasa, cuatro bases de desoxinucleótidos estándar y una concentración baja de un nucleótido de terminación de cadena, más comúnmente un di-deoxinucleótido. Esta reacción se repite en cuatro tubos separados con cada una de las bases por turnos como el di-deoxinucleótido. La incorporación limitada del nucleótido que termina la cadena por la polimerasa de ADN da como resultado una serie de fragmentos de ADN relacionados que se terminan sólo en posiciones donde se usa el dideoxinucleótido en particular. Para cada tubo de reacción, los fragmentos se separan por tamaño por electroforesis en un gel de poliacrilamida de placa o en un tubo capilar cargado con un polímero viscoso. La secuencia se determina leyendo que carril produce una marca visualizada a partir del cebador marcado según se examina desde la parte superior del gel hasta el fondo.

La secuenciación de terminador de tinción marca alternativamente los terminadores. La secuenciación completa puede realizarse en una única reacción marcando cada uno de los terminadores de cadena di-desoxinucleotídicos con una tinción fluorescente aparte, que fluoresce a una longitud de onda diferente.

##### 2. Hibridación

Ejemplos no limitantes ilustrativos de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, hibridación *in situ* (ISH), microselección y bandas de Southern o de Northern.

La hibridación *in situ* (FISH) es un tipo de hibridación que usa una hebra de ADN o ARN complementaria marcada como una sonda para localizar una secuencia de ADN o ARN específica en una parte o sección de tejido (*in situ*), o, si el tejido es lo suficientemente pequeño, el tejido entero (ISH de soporte completo). ISH de ADN se puede usar para determinar la estructura de los cromosomas. ISH de ARN se usa para medir y localizar ARNm y otros transcritos dentro de secciones de tejidos o de soportes completos. Células y tejidos de muestra se tratan usualmente para fijar los transcritos objetivo en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda. La sonda hibrida con la secuencia objetivo a temperatura elevada y después la sonda en exceso se retira por lavado. La sonda que se marcó con bien bases radiomarcadas, bien bases marcadas fluorescentemente o bien bases marcadas

antigénicamente se localiza y cuantifica en el tejido usando bien autorradiografía, bien microscopio de fluorescencia o bien inmunohistoquímica, respectivamente. ISH también pueden utilizar dos o más sondas, marcadas con radiactividad o con las otras marcas no radiactivas, para detectar simultáneamente dos o más transcritos.

## 2.1 FISH

5 En algunas realizaciones, se detectaron reordenamientos de genes usando hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). Los ensayos de FISH preferidos usan cromosomas artificiales bacterianos (BAC), que se han usado extensivamente en el proyecto de secuenciación del genoma humano (véase Nature 409: 953-958 (2001)) y clones que contienen BAC específicos están ampliamente disponibles o pueden fabricarse usando las prácticas de laboratorio estándar. A cada clon de BAC del genoma humano se le ha dado un nombre de referencia que lo  
10 identifica inequívocamente. Estos nombres pueden usarse para hallar una secuencia de Genbank correspondiente y para encargar copias del clon de un distribuidor.

Los clones de BAC específicos que pueden usarse en protocolos de FISH para detectar reordenamientos genéticos son sondas específicas para RP11-124L22 y RP11-703A4. Estas sondas, u otras sondas adecuadas, usualmente están marcadas con marcadores fluorescentes apropiados o con otros marcadores y después se usan en hibridaciones. La sección de Ejemplos proporcionada en el presente documento expone un protocolo particular que es efectivo para medir reordenamientos pero alguien de habilidad en la técnica reconocerá que muchas variaciones de este ensayo se pueden usar igualmente bien. Los protocolos específicos se conocen bien en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para detectar reordenamientos de MIPOL1-ETV1. Se proporciona una directriz con respecto a este documento en muchas referencias que incluyen: *In situ Hybridization: Medical Applications* (eds. G. R. Coulton y J. de Belleruche), Kluwer Academic Publishers, Boston (1992); *In situ Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology* (eds. J. H. Eberwine, K. L. Valentino y J. D. Barchas), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1994); *In situ Hybridization: A Practical Approach* (ed. D. G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1992); Kuo, y cols., *Am. J. Hum. Genet.* 49: 112-119 (1991); Klinger, y cols., *Am. J. Hum. Genet.* 51: 55-65 (1992); y Ward, y cols., *Am. J. Hum. Genet.* 52: 854-865 (1993)). Las patentes que proporcionan directrices sobre tal metodología incluyen documentos U.S. 5.225.326; 5.545.524; 6.121.489 y 6.573.043 y los kits comercialmente disponibles también proporcionan protocolos para llevar a cabo FISH (por ejemplo, de Oncor, Inc., Gaithersburg, MD). Todas estas referencias se pueden usar junto con referencias similares en la técnica y con la información proporcionada en la sección de Ejemplos en el presente documento para establecer etapas de procedimiento convenientes para un laboratorio particular.

## 30 2.2 Microselecciones

Diferentes clases de ensayos biológicos se denominan microselecciones incluyendo, pero no limitadas a: microselecciones de ADN (por ejemplo, microselecciones de ADNc y microselecciones de oligonucleótidos); microselecciones de proteínas; microselecciones de tejidos; microselecciones de transfección o microselecciones celulares; microselecciones de compuestos químicos; y microselecciones de anticuerpos. Una microselección de ADN, conocido comúnmente como chip de genes, chip de ADN o biochip, es una colección de manchas de ADN microscópicas unidas a una superficie sólida (por ejemplo, vidrio, plástico o chip de silicio) formando una disposición para el propósito de caracterización de los niveles de expresión o de monitorización de los niveles de expresión para miles de genes simultáneamente. Los segmentos de ADN fijados se conocen como sondas, miles de las cuales se pueden usar en una microselección de ADN única. Las microselecciones se pueden usar para identificar los genes de enfermedades comparando expresión génica en células de enfermedad y normales. Las microselecciones se pueden fabricar usando una diversidad de tecnologías incluyendo pero no limitándose: imprimir con clavijas de punta fina sobre los portaobjetos de vidrio; fotolitografía usando máscaras prefabricadas; fotolitografía usando dispositivos de microespejo dinámicos; impresión de chorro de tinta; o, electroquímica en disposiciones de microelectrodos.

Se usa la realización de pruebas de bandas de Southern y de Northern para detectar secuencias de ADN o de ARN específicas, respectivamente. El ADN o el ARN extraído a partir de una muestra está fragmentado, electroforéticamente separado en un gel de matriz y transferido a un filtro de membrana. El ADN o el ARN unido a filtro está sujeto a hibridación con una sonda marcada complementaria con la secuencia de interés. Se detecta sonda hibridada unida al filtro. Una variante del procedimiento es el de bandas de Northern reverso, en que el ácido nucleico sustrato que se fija a la membrana es una colección de fragmentos de ADN aislados y la sonda es ARN extraído de un tejido y marcado.

## 3. Amplificación

Reordenamientos cromosómicos de ADN genómico y ARNm quimérico pueden amplificarse antes de o simultáneos con detección. Ejemplos no limitantes ilustrativos de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación de desplazamiento de cadenas (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Aquellos de habilidad ordinaria en la técnica reconocerán que ciertas técnicas de amplificación (por ejemplo, PCR) requieren

que ARN se transcriba de forma reversa a ADN antes de amplificación (por ejemplo, RT-PCR), mientras que otras técnicas de amplificación amplifican directamente ARN (por ejemplo, TMA y NASBA).

La reacción en cadena de la polimerasa (Patente de los EE.UU. N.ºs 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159 y 4.965.188), referida comúnmente como PCR, usa ciclos múltiples de desnaturalización, fusión de pares de cebadores a cadenas opuestas y extensión del cebador a números de copias que se incrementan exponencialmente de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. En una variación llamada RT-PCR, se usa la transcriptasa inversa (RTR) para fabricar un ADN complementario (ADNc) a partir de ARN y el ADNc se amplifica después por PCR para producir copias múltiples de ADN. Para otras permutaciones diversas de PCR véanse, *por ejemplo*, las Patentes de los EE.UU. N.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Mullis y cols., *Meth. Enzymol.* 155: 335 (1987); y Murakawa y cols., *DNA* 7: 287 (1988).

La amplificación mediada por transcripción (Patentes de los EE.UU. N.ºs 5.480.784 y 5.399.491.), referida comúnmente como TMA, sintetiza copias múltiples de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo autocatalíticamente según condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH sustancialmente constantes en las que múltiples copias de ARN de la secuencia objetivo generan autocatalíticamente copias adicionales. Véanse, *por ejemplo*, Patentes de los EE.UU. N.ºs 5.399.491 y 5.824.518. En una variación descrita en la Publ. de los EE.UU. N.º: 20060046265 TMA incorpora opcionalmente el uso de restos de bloqueo, restos de terminación y otros restos de modificación para mejorar la sensibilidad y la seguridad del procedimiento de TMA.

La reacción en cadena de ligasa (Weiss, R., *Science* 254: 1292 (1991)), comúnmente referida como LCR, usa dos grupos de oligonucleótidos de ADN complementarios que hibridan con regiones adyacentes del ácido nucleico objetivo. Los oligonucleótidos de ADN se unen covalentemente por una ADN ligasa en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligación para producir un producto oligonucleotídico ligado de cadena doble detectable.

La amplificación de desplazamiento de hebras (Walker, G. y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 392-396 (1992); N.º de Patente de los EE.UU. 5.270.184 y 5.455.166), comúnmente referida como SDA, usa ciclos de pares de fusión de secuencias de cebador a hebras opuestas de una secuencia objetivo, extensión de cebador en presencia de un dNTPaS para producir un producto de prolongación de cebador hemifosforotioado dúplex, realización de mella mediada por endonucleasa de un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción semimodificado y prolongación de cebador mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la mella para trasladar una mella existente y para producir una hebra para la siguiente ronda de condensación de cebador, realización de mella y desplazamiento de la hebra, dando como resultado la amplificación geométrica de producto. SDA termófila (tSDA) usa endonucleasas termófilas y polimerasas a temperaturas más altas en esencialmente el mismo procedimiento (Patente EP N.º: 0 684 315).

Otros procedimientos de amplificación incluyen, por ejemplo: amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (Patente de los EE.UU. N.º 5.130.238, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad), referida comúnmente como una NASBA; uno que usa replicasa de ARN para amplificar la molécula de sonda por sí misma (Lizardi y cols., *BioTechnol.* 6: 1197 (1988)), comúnmente referida como replicasa Q $\beta$ ; un procedimiento de amplificación basado en transcripción (Kwoh y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 1173 (1989)); y replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87: 1874 (1990)). Para discusión adicional de procedimientos de amplificación conocidos véase Persing, David H., "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" en *Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications* (Persing y cols., Eds.), páginas 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC (1993)).

#### 4. Procedimientos de detección

Ácidos nucleicos de reordenamiento de genes amplificados o no amplificados se pueden detectar por cualesquiera procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden detectar los reordenamientos de genes por hibridación con una sonda marcada detectablemente y por medida de los híbridos resultantes. Se describen a continuación ejemplos no limitantes ilustrativos de procedimientos de detección.

Un procedimiento de detección ilustrativo, el Ensayo de Protección de Hibridación (HPA) implica hibridar una sonda oligonucleotídica quimioluminiscente (por ejemplo, una sonda marcada con éster de acridinio (AE)) con la secuencia objetivo, hidrolizando selectivamente la marca quimioluminiscente presente en la sonda no hibridada y midiendo la quimioluminiscencia producida a partir de la sonda que queda en un luminómetro. Véase, *por ejemplo*, Patente de los EE.UU. N.º: 5.283.174 y Norman C. Nelson y cols., *Nonisotopic Probing, Blotting, and Sequencing*, c. 17 (Larry J. Kricka ed., 2ª ed. 1995).

Otro procedimiento de detección ilustrativo mantiene evaluación cuantitativa del procedimiento de amplificación en tiempo real. La evaluación de un procedimiento de amplificación en "tiempo real" implica determinar la cantidad de amplicón en la mezcla de reacción bien continuamente o bien periódicamente durante la reacción de amplificación y usando los valores determinados para calcular la cantidad de secuencia objetivo presente inicialmente en la muestra. Una diversidad de procedimientos para determinar la cantidad de secuencia objetivo inicial presente en una

muestra basados en tiempo real de amplificación se conocen bien en la técnica. Éstos incluyen procedimientos revelados en Patentes de los EE.UU. N.ºs: 6.303.305 y 6.541.205. Otro procedimiento para determinar la cantidad de la secuencia objetivo presente inicialmente en una muestra, pero que no se basa en una amplificación en tiempo real, se revela en la Patente de los EE.UU. N.º: 5.710.029.

5 Los productos de amplificación se pueden detectar en tiempo real por el uso de diversas sondas de autohibridación, la mayoría de las cuales tienen una estructura de horquilla. Tales sondas de autohibridación están marcadas de tal forma que emiten diferentes señales detectables, dependiendo de si las sondas están en un estado autohibridado o en un estado alterado por hibridación a una secuencia objetivo. A modo de ejemplo no limitante, "antorchas moleculares" son un tipo de sonda de autohibridación que incluye distintas regiones de autocomplementariedad (referidas como "el dominio de unión" y "el dominio de límite de objetivo") que están conectadas por una región de junta (por ejemplo, engarce no nucleotídico) y que hibridan unas con otras según condiciones de ensayo de hibridación predeterminadas. En una realización preferida, las antorchas moleculares contienen regiones de bases de hebra simple en el dominio de unión de objetivo que son desde 1 hasta 20 bases de longitud y son accesibles para hibridación a una secuencia objetivo presente en una reacción de amplificación según condiciones de desplazamiento de hebra. Según condiciones de desplazamiento de hebra, la hibridación de las dos regiones complementarias, que pueden ser total o parcialmente complementarias, de la antorcha molecular se favorece, salvo en presencia de la secuencia objetivo, que se unirá a la región de hebra simple presente en el dominio de unión al objetivo y desplazará todo o una parte del dominio de límite de objetivo. El dominio de unión al objetivo y el dominio límite de objetivo de una antorcha molecular incluyen una marca detectable o un par de marcas que interactúan (por ejemplo, luminiscente/apagador) situado de tal forma que se produce una señal diferente cuando la antorcha molecular se autohibrida a la secuencia objetivo, permitiendo así la detección de dúplex sonda:objetivo en una muestra de ensayo en presencia de antorchas moleculares no hibridadas. Se conocen antorchas moleculares y muchos tipos de pares de marcas que interactúan (p. ej., la Patente de los EE.UU. N.º: 6.534.274).

25 Otro ejemplo de una sonda de detección que tienen auto-complementariedad es una "baliza molecular" (véanse las Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.925.517 y 6.150.097). Las balizas moleculares incluyen moléculas de ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria a objetivo, un par de afinidad (o brazos de ácidos nucleicos) que sujetan la sonda en una conformación cerrada en la ausencia de una secuencia de objetivo presente en una reacción de amplificación y un par de marcas que interactúan cuando la sonda está en una conformación cerrada. La hibridación de la secuencia de objetivo y la secuencia complementaria a objetivo separa los miembros del par de afinidad, cambiando de este modo la sonda a una conformación abierta. El cambio a la conformación abierta es detectable debido a una interacción reducida del par de marcas, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un apagador (por ejemplo DABCYL y EDANS).

35 Otras sondas de autohibridación se conocen bien por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, los pares de unión a sonda que tienen marcas que interactúan, (por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. N.º 5.928.862) pueden adaptarse para usar en las composiciones y procedimientos revelados en el presente documento. Los sistemas de sonda usados para detectar polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) pueden usarse también. Los sistemas de detección adicionales incluyen "cambios moleculares," (por ejemplo, véase Publ. de los EE.UU. N.º: 20050042638). Otras sondas, tales como aquellas que comprenden intercalar tinciones y/o fluorocromos, son también útiles para la detección de los productos de amplificación en los procedimientos descritos en el presente documento (por ejemplo, véase Patente de los EE.UU. N.º: 5.814.447).

### C. Análisis de datos

45 En algunas realizaciones, un programa de análisis basado en ordenador se usa para traducir los datos en bruto generados por el ensayo de detección (por ejemplo, la presencia, ausencia, o cantidad de un marcador o marcadores dados) en datos de valor predictivo para un trabajador clínico. El trabajador clínico puede acceder a los datos predictivos usando cualesquiera medios adecuados. Así, en algunas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona el beneficio adicional de que el trabajador clínico, quien no es probable que esté entrenado en genética o biología molecular, no necesita entender los datos en bruto. Los datos se presentan directamente al trabajador clínico en su forma más útil. El médico es capaz después de utilizar inmediatamente la información con el fin de optimizar la asistencia del sujeto.

50 Se puede usar cualquier procedimiento que sea capaz de recibir, procesar y transmitir la información a y desde laboratorios que llevan a cabo los ensayos, proveedores de información, personal médico y sujetos. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, una muestra (por ejemplo, una biopsia o una muestra de suero u orina) se obtiene a partir de un sujeto y se somete a un servicio de realización de perfiles (por ejemplo, laboratorio clínico en una instalación médica, empresas de realización de perfiles genómicos, etc.), localizado en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país diferente que el país donde el sujeto reside o donde la información se usa definitivamente) para generar datos en bruto. Donde la muestra comprende un tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede visitar un centro médico para tener la muestra obtenida y enviada al centro de realización de perfiles, o los sujetos pueden recoger la muestra ellos mismos (por ejemplo, una muestra de orina) y directamente enviarla a un centro de realización de perfiles. Donde la muestra comprende previamente información biológica determinada, la información podrá enviarse directamente al servicio de realización de perfiles por el sujeto (por ejemplo, una tarjeta

de información que contiene la información puede ser escaneada por un ordenador y los datos pueden ser transmitidos a un ordenador del centro de realización de perfiles usando sistemas de comunicación electrónicos). Una vez recibida por el servicio de realización de perfiles, la muestra se procesa y se produce un perfil (es decir, datos de expresión), específico para la información de diagnóstico o de pronóstico deseada por el sujeto.

5 El perfil de los datos se prepara después en un formato adecuado para interpretación por un trabajador clínico que atiende. Por ejemplo, más que proporcionar datos de expresión en bruto, el formato preparado puede representar un diagnóstico o una valoración de riesgos (por ejemplo, probabilidad de que el cáncer se presente) para el sujeto, junto con recomendaciones para opciones de tratamiento particulares. Los datos podrán presentarse al trabajador clínico por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el servicio de perfiles genera un  
10 informe que puede imprimirse por el trabajador clínico (por ejemplo, en el punto de atención) o presentarse al trabajador clínico en un monitor de ordenador.

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

20 En algunas realizaciones, el sujeto es capaz de acceder directamente a los datos usando el sistema de comunicación electrónica. El sujeto puede escoger intervención adicional o consejo adicional en base a los resultados. En algunas realizaciones, los datos se usan para uso de investigación. Por ejemplo, los datos se pueden usar para optimizar adicionalmente la inclusión o eliminación de los marcadores como indicadores útiles de una afección particular o fase particular de la enfermedad.

#### 25 **D. Formación de imágenes *in vivo***

Los reordenamientos de genes revelados en el presente documento pueden detectarse usando técnicas de formación de imágenes *in vivo*, incluyendo pero no limitados a: formación de imágenes de radionúclidos; tomografía de emisión de positrones (PET); tomografía axial computerizada, procedimiento de formación de imágenes de rayos X o de resonancia magnética; detección de fluorescencia y detección quimioluminiscente. En algunas realizaciones,  
30 las técnicas de formación de imágenes *in vivo* se usan para visualizar la presencia de o la expresión de marcadores de cáncer en un animal (por ejemplo, un mamífero humano o no humano). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ARNm marcador de cáncer o la proteína marcadora de cáncer está marcado usando un anticuerpo marcado específico para el marcador de cáncer. Se puede detectar un anticuerpo específicamente unido y marcado en un individuo usando un procedimiento de formación de imágenes *in vivo*, incluyendo, pero no limitado a, formación de  
35 imágenes de radionúclidos, tomografía de emisión de positrones, tomografía computerizada axial, procedimiento de formación de imágenes de rayos X o de resonancia magnética, detección de fluorescencia y detección quimioluminiscente. Se describen anteriormente procedimientos para generar anticuerpos para los marcadores de cáncer revelados.

Los procedimientos de formación de imágenes *in vivo* que usan las composiciones reveladas en el presente documento que detectan reordenamientos de MIPOL1-ETV1 o productos derivados de ellos son útiles en el diagnóstico de cánceres, en particular cáncer de próstata, que expresa los marcadores de cáncer descritos en el presente documento. La formación de imágenes *in vivo* visualiza la presencia de un marcador indicador del cáncer, permitiendo diagnóstico y/o pronóstico sin el uso de una biopsia desagradable. Por ejemplo, se puede detectar la presencia de un marcador indicador de cánceres que es probable que metastaticen. Los procedimientos de  
45 formación de imágenes *in vivo* se pueden usar adicionalmente para detectar cánceres metastáticos en otras partes del cuerpo.

En algunas realizaciones, reactivos (por ejemplo, anticuerpos) específicos para los marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1- ETV1 están marcados fluorescentemente. Los anticuerpos marcados se introducen en un sujeto (por ejemplo, oralmente o parenteralmente). Se detectan anticuerpos marcados fluorescentemente usando cualquier procedimiento o sistema adecuado (por ejemplo, véase Patente de los EE.UU. N.º: 6.198.107).

En otras realizaciones, los anticuerpos están marcados radiactivamente. El uso de anticuerpos para diagnóstico *in vivo* se conoce bien en la técnica, por ejemplo, usando un sistema de marcado basado en anticuerpos para formar imágenes de tumores (véanse Sumerdon y cols., Nucl. Med. Biol 17: 247-254 [1990], Griffin y cols., J. Clin. Onc. 9: 631-640 [1991] y Lauffer, Magnetic Resonance in Medicine 22: 339-342 [1991]). La marca usada con un sistema basado en anticuerpos dependerá de la modalidad de formación de imágenes escogida, por ejemplo, marcas radiactivas tales como Indio-111, Tecnecio-99m o Yodo-131 para usar con escáneres planos o con tomografía computerizada de emisión de fotón simple (SPECT), marcas que emiten positrones tales como Flúor-19 para usar

con tomografía de emisión de positrones (PET) e iones paramagnéticos tales como gadolinio (III) o manganeso (III) para usar con MRI.

5 Metales radiactivos con semividas que varían desde 1 hora hasta 3,5 días están disponibles para conjugación a anticuerpos, tales como escandio-47 (3,5 días), galio-67 (2,8 días), galio-68 (68 minutos), tecnecio-99m (6 horas) e indio-111 (3,2 días), de los que galio-67, tecnecio-99m e indio-111 son preferibles para formación de imágenes de cámara gamma, galio-68 es preferible para tomografía de emisión de positrones.

10 Un procedimiento útil de marcar anticuerpos con tales radiometales es por medio de un agente quelante bifuncional, tal como ácido dietileno-triaminopentaacético (DTPA), tal como se describe, por ejemplo, por Khaw y cols. (Science 209: 295 [1980]) para In-111 y Tc-99m y por Scheinberg y cols. (Science 215: 1511 [1982]). Otros agentes quelantes pueden usarse también, pero el 1-(p-carboximetoxibencil)EDTA y el anhídrido carboxicarbónico de DTPA son ventajosos debido a que su uso permite conjugación sin afectar la inmunorreactividad del anticuerpo sustancialmente.

15 Otro procedimiento para acoplar DTPA a proteínas es por el uso del anhídrido cíclico de DTPA, según se describe por Hnatowich y cols. (Int. J. Appl. Radiat. Isot. 33: 327 [1982]) para el marcado de albúmina con In-111, pero que puede adaptarse para marcado de anticuerpos. Se conoce un procedimiento adecuado de marcar anticuerpos con Tc-99m (p. ej., véase Crockford y cols., Patente de los EE.UU. N.º: 4.323.546)).

Un procedimiento preferido de marcar inmunoglobulinas con Tc-99m es aquel descrito por Wong y cols. (Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29: 251 [1978]) para proteína plasmática y aplicado recientemente exitosamente por Wong y cols. (J. Nuci. Med., 23: 229 [1981]) para marcar anticuerpos.

20 En el caso de los radiometales conjugados al anticuerpo específico, es asimismo deseable introducir una proporción del radiomarcador tan alta como sea posible dentro de la molécula de anticuerpo sin destruir su inmunoespecificidad. Una mejora adicional puede lograrse llevando a cabo el radiomarcado en presencia del marcador de cáncer específico asociado con un reordenamiento genético de MIPOL1-ETV1, para asegurar que el sitio de unión al antígeno en el anticuerpo está protegido. El antígeno se separó después de marcar.

25 En aún realizaciones adicionales, la formación de imágenes biofotónicas *in vivo* (Xenogen, Alameda, CA) se usa para formación de imágenes *in vivo*. Esta formación de imágenes *in vivo* en tiempo real utiliza luciferasa, una enzima que cataliza una reacción de emisión de luz. El gen de luciferasa se incorpora en células, microorganismos y animales (por ejemplo, para producir una proteína de condensación con un marcador de cáncer asociado con un reordenamiento genético de MIPOL1-ETV1), tal que cuando el marcador de cáncer está activo tiene lugar una  
30 emisión de luz que se captura como una imagen y se analiza usando una cámara CCD y un software apropiado.

### E. Composiciones y kits

Las composiciones para usar en los procedimientos diagnósticos revelados incluyen, pero no se limitan a, sondas, oligonucleótidos de amplificación y anticuerpos. Las composiciones detectan un producto sólo cuando está presente un reordenamiento MIPOL1-ETV1, preferentemente material genético de ETV1 insertado en material genético de  
35 MIPOL1. Estas composiciones incluyen, pero no se limitan a: una sonda marcada individual que comprende una secuencia que hibrida con la junta en la que está insertado ETV1 dentro del locus de MIPOL1 (es decir, abarca el reordenamiento de genes de la junta); un par de oligonucleótidos de amplificación en el que el primer oligonucleótido de amplificación comprende una secuencia que hibrida con MIPOL1 y un segundo oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida con ETV1.

40 Otras composiciones útiles, sin embargo, incluyen: un par de sondas marcadas en el que la sonda marcada primero comprende una secuencia que hibrida con MIPOL1 y la segunda sonda marcada comprende una secuencia que hibrida con ETV1.

45 Cualquiera de estas composiciones, sola o en combinación con otras composiciones reveladas en el presente documento o bien conocidos en la técnica, se puede proporcionar en forma de un kit. Por ejemplo, la sonda marcada individual y el par de nucleótidos de amplificación puede proporcionarse en un kit para la amplificación y la detección de reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1. Los kits pueden comprender adicionalmente controles y/o reactivos de detección. Uno cualquiera o más reactivos que encuentran uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en el kit.

Las composiciones de sonda y de anticuerpo se pueden proporcionar también en forma de una disposición.

### 50 IV. Solicitudes de rastreo de fármacos

En algunas realizaciones, las composiciones y procedimientos revelados se usan en ensayos de rastreo de fármacos (por ejemplo, para rastrear en busca de fármacos anticancerígenos). Estos procedimientos de rastreo usan marcadores de cáncer que incluyen aquellos asociados con reordenamientos de genes MIPOL1-EVT1, pero no se limitan solamente a aquellos reordenamientos genéticos. Por ejemplo, una realización puede rastrear en busca de

compuestos que alteran (por ejemplo, disminuyen) la expresión de genes marcadores de cáncer, incluyendo aquellos asociados con reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1. Los compuestos o agentes a rastrearse pueden interferir con transcripción (por ejemplo, interactuando con una región promotora), pueden interferir con ARNm producido a partir del reordenamiento (por ejemplo, por interferencia de ARN, tecnologías antisentido, etc.), o pueden interferir con rutas que están anteriormente en la cadena de la actividad biológica del reordenamiento de genes o más adelante en la cadena de la actividad biológica del reordenamiento de genes. En algunas realizaciones, los compuestos candidatos son ARN antisentido o agentes que interfieren con el ARN (por ejemplo, oligonucleótidos) dirigidos contra marcadores de cáncer. En otras realizaciones, los compuestos candidatos son anticuerpos o moléculas pequeñas que se unen específicamente a un regulador de marcadores de cáncer o a un producto de expresión asociado con reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1 e inhiben su función biológica.

En algunas realizaciones, los compuestos candidatos se evalúan en su capacidad para alterar expresión marcadora de cáncer poniendo en contacto un compuesto con una célula que expresa un marcador de cáncer y ensayando después el efecto de los compuestos candidatos sobre expresión. En algunas realizaciones, el efecto de los compuestos candidatos sobre la expresión de un gen marcador de cáncer se ensaya detectando el nivel de ARNm de marcador de cáncer expresado por la célula. La expresión de ARNm puede detectarse por cualquier procedimiento adecuado. En otras realizaciones, el efecto de los compuestos candidatos sobre expresión de genes marcadores de cáncer se ensaya midiendo el nivel de polipéptido codificado por los marcadores de cáncer. El nivel de polipéptido expresado puede medirse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo pero no limitado a, aquellos descritos en el presente documento.

Los compuestos de ensayo pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluidas bibliotecas biológicas; bibliotecas de peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con un armazón no peptídico, novedoso, que son resistentes a degradación enzimática pero que no obstante permanecen bioactivas; véase, por ejemplo, Zuckermann y cols., J. Med. Chem. 37: 2678-85 [1994]); bibliotecas en fase sólida o en fase de solución paralelas dirigibles en el espacio; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el procedimiento de bibliotecas 'una perla, un compuesto'; y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. Se prefieren los enfoques de bibliotecas biológicas y bibliotecas de peptoides para uso con bibliotecas de péptidos, mientras que pueden aplicarse otros cuatro enfoques a bibliotecas de compuestos de oligómeros peptídicos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145).

Pueden encontrarse en la técnica ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares, por ejemplo en: DeWitt y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6909 [1993]; Erb y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91: 11422 [1994]; Zuckermann y cols., J. Med. Chem. 37: 2678 [1994]; Cho y cols., Science 261: 1303 [1993]; Carrell y cols., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059 [1994]; Carrell y cols., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061 [1994]; y Gallop y cols., J. Med. Chem. 37: 1233 [1994].

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten, Biotechniques 13: 412-421 [1992]), o sobre perlas (Lam, Nature 354: 82-84 [1991]), chips (Fodor, Nature 364: 555-556 [1993]), bacterias o esporas (Patente de EE. UU. N.º: 5.223.409), plásmidos (Cull y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 1865-1869 [1992]) o en fagos (Scott y Smith, Science 249: 386-390 [1990]; Devlin Science 249: 404-406 [1990]; Cwirla y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382 [1990]; Felici, J. Mol. Biol. 222: 301 [1991]).

## VI. Aplicaciones terapéuticas

Algunas realizaciones proporcionan terapias para el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). Las realizaciones de terapia preferidas tienen como objetivo directa o indirectamente marcadores de cáncer, incluyendo aquellos asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1.

### A. Terapias de ARN de interferencia y antisentido

Algunas realizaciones tienen como objetivo la expresión de marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1. Algunas realizaciones emplean composiciones que comprenden compuestos antisentido oligoméricos o compuestos de ARNi, particularmente oligonucleótidos (*por ejemplo*, aquellos identificados en los procedimientos de examen de fármacos descritos anteriormente) para usar en modular la función de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1, que modulan en última instancia la cantidad de marcador de cáncer expresada.

#### 1. ARN de interferencia (ARNi)

En algunas realizaciones, ARNi se usa para inhibir expresión de reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1. ARNi representa una defensa celular conservada en la evolución para controlar la expresión de genes extraños en la mayoría de los eucariotas, incluyendo seres humanos. ARNi se activa típicamente por ARN bicatenario (ARNds) y causa degradación de ARNm específica de secuencia de ARNs objetivo de cadena simple homólogo en respuesta a ARNds. Los mediadores de degradación de ARNm son dúplex de ARN de interferencia pequeños (ARNip), que se

producen normalmente a partir de ARNds largo por escisión enzimática en la célula. Los ARNip son generalmente aproximadamente de veintidós nucleótidos de longitud (*por ejemplo* 21-23 nucleótidos de longitud) y tienen una estructura de pares de bases caracterizada por dos salientes 3' nucleotídicos. Tras la introducción de un ARN pequeño, o ARNi, en la célula, se cree que la secuencia se administrará a un complejo enzimático llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). RISC reconoce el objetivo y lo escinde con una endonucleasa. Se señala que si las secuencias de ARN más grandes se administran a una célula, enzima ARNasa III (*Dicer*) convierte ARNds más largo en fragmentos de ARNip ds de 21-23 nt. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ARNi están diseñados para tener como objetivo la región de junta de reordenamientos génicos.

Los ARNip sintetizados químicamente han llegado a ser reactivos poderosos para análisis en todo el genoma de función de genes de mamíferos en células somáticas cultivadas. Más allá de su valor para la validación de la función génica, los ARNip también tienen potencial grande como agentes terapéuticos específicos de genes (Tuschl y Borkhardt, *Molecular Intervent.* 2002; 2 (3): 158-67).

La transfección de ARNip en células animales da como resultado la potente, silenciamiento postranscripcional a largo plazo de genes específicos (Caplen y cols., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2001; 98: 9742-7; Elbashir y cols., *Nature.* 2001; 411: 494-8; Elbashir y cols., *Genes Dev.* 2001;15: 188-200; y Elbashir y cols., *EMBO J.* 2001; 20: 6877-88 ). Se conocen procedimientos y composiciones para llevar a cabo ARNi con ARNip (p. ej., véase Patente de los EE.UU. 6.506.559).

ARNip son extraordinariamente efectivos en bajar las cantidades de ARN tomado como objetivo y por proteínas de prolongación, frecuentemente a niveles indetectables. El efecto de silenciamiento puede durar varios meses y es extraordinariamente específico, debido a que un apareamiento erróneo de nucleótidos entre el ARN objetivo y la región central del ARNip es frecuentemente suficiente para impedir la silenciamiento (Brummelkamp y cols., *Science* 2002; 296: 550-3; Holen y cols., *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 1757-66 ).

Un factor importante en el diseño de ARNip es la presencia de sitios accesibles para unión de ARNip. Bahoia y cols., (*J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 15991-15997) describen el uso de un tipo de disposición de ADN llamado una disposición de examen para encontrar sitios accesibles en ARNm para diseñar ARNip efectivos. Estas disposiciones comprenden oligonucleótidos que varían en tamaño a partir de monómeros hasta un cierto máximo, usualmente de 7 a 25 nucleótidos, sintetizados usando una barrera física (máscara) por adición por etapas de cada base en la secuencia. Así las disposiciones representan un complemento de oligonucleótido completo de una región del gen objetivo. La hibridación del ARNm objetivo a estas disposiciones proporciona un perfil de accesibilidad exhaustivo de esta región del ARNm objetivo. Tales datos son útiles en el diseño de oligonucleótidos antisentido (que varían de 7meros a 25meros), que es importante para lograr un compromiso entre longitud de oligonucleótidos y afinidad de unión, para mantener eficacia y especificidad de objetivo (Sohail y cols., *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29 (10): 2041- 2045). Los procedimientos adicionales y cuestiones adicionales para seleccionar los ARNip se describen por ejemplo, en los documentos WO 05054270, WO05038054A1, WO03070966A2, *J Mol Biol.* 13 de mayo de 2005; 348 (4): 883-93, *J Mol Biol.* 13 de mayo de 2005; 348 (4): 871-81 y *Nucleic Acids Res.* 1 de agosto de 2003; 31 (15): 4417-24. Además, el software (*por ejemplo*, la herramienta de diseño de ARNip siMAX de MWG online) está disponible comercial o públicamente para usar en la selección de los ARNip.

## 2. Antisentido

En otras realizaciones, la expresión de reordenamientos de genes MIPOL1-ETV1 está modulada usando compuestos antisentido que hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos MIPOL1- ETV1. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico objetivo interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico objetivo por compuestos que específicamente hibridan con él se refiere generalmente como "antisentido". Las funciones de ADN a interferirse incluyen replicación y transcripción. Las funciones de ARN a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación de ARN al sitio de traducción de la proteína, traducción de proteína a partir de ARN, ajuste de ARN para proporcionar una o más especies de ARNm y actividad catalítica que puede estar involucrada en o facilitarse por el ARN. El efecto general tal interferencia con la función de ácido nucleico objetivo es la modulación de la expresión de marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1. En el presente documento, "modulación" quiere decir bien un incremento (estimulación) o bien una disminución (inhibición) en la expresión de un gen. Por ejemplo, la expresión puede estar inhibida para evitar potencialmente proliferación de tumores.

Los procedimientos antisentido preferentemente toman como objetivo ácidos nucleicos específicos. "Tomar como objetivo" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular se refiere usualmente a un procedimiento multietapa que comienza con identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función está para modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o un ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión esté asociada con un trastorno o estado morboso particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En el presente documento, el objetivo es una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador de cáncer asociado con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1. El proceso de tomar como objetivo incluye también la determinación de un sitio o sitios dentro de este gen para que la interacción antisentido tenga lugar de tal forma que

el efecto deseado, *por ejemplo*, la detección o la modulación de expresión de la proteína, dé resultado. En el presente documento, un sitio intragénico preferido es la región que abarca el codón de iniciación o terminación de la traducción de la fase de lectura abierta (ORF) de los genes. Dado que el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina como "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes que tienen un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG han mostrado funcionar *in vivo*. Así, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden abarcar muchas secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede usarse preferencialmente para iniciación de la traducción en un tipo o tejido celular particular, o según un grupo particular de condiciones. En el presente documento, "codón de inicio" y "codón de iniciación de traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica un antígeno tumoral asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1, independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones.

El codón de terminación de la traducción (o "codón de detención") de un gen puede tener una de tres secuencias (es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA; las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Las expresiones "región de codón de inicio" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de iniciación de la traducción. De modo similar, las expresiones "región de codón de detención" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se refiere a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región que puede ser marcada como objetivo eficazmente. Otras regiones objetivo incluyen la región no traducida 5' (5' UTR), que hace referencia a la parte de un ARNm en la dirección 5' a partir de un codón de iniciación de la traducción y que incluye así nucleótidos entre el sitio de remate 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen y la región no traducida 3' (3' UTR), que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección 3' a partir del codón de iniciación de la traducción y que incluye así nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen. El sitio de remate 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina metilada en N7 unido al resto más 5' del ARNm por medio de un engarce 5'-5' trifosfato. La región de remate 5' de un ARNm se considera que incluye la estructura de remate 5' en sí misma así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al remate. La región de remate también puede ser una región objetivo preferida.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariótico se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones" que se escinden de un transcrito antes de traducirse. Las regiones que quedan (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se empalman conjuntamente para formar una secuencia de ARNm continua. Sitios de ajuste de ARNm (es decir, juntas intrón-exón) también pueden ser regiones objetivo preferentes y son particularmente útiles *en situaciones* donde el ajuste aberrante está implicado en la enfermedad, o donde una sobreproducción de un producto de ajuste de ARNm particular está implicada en la enfermedad. Las juntas de condensación aberrantes debidas a reordenamientos o deleciones también son objetivos preferidos. También se ha encontrado que los intrones pueden ser también efectivos y por lo tanto regiones objetivo preferidas para compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

En algunas realizaciones, los lugares diana para inhibición antisentido se identifican usando programas de software comercialmente disponibles (por ejemplo, Biagnostik, Göttingen, Alemania; SysArris Software, Bangalore, India; Antisense Research Group, Universidad de Liverpool, Liverpool, Inglaterra; GeneTrove, Carlsbad, CA). En otras realizaciones, los sitios objetivo para la inhibición antisentido se identifican usando el procedimiento de sitio accesible descrito en la Publ. PCT N.º: WO0198537A2.

Una vez una o varias regiones se han identificado, se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios al objetivo (es decir, que hibridan suficientemente bien y con especificidad suficiente) para dar el efecto deseado. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, los oligonucleótidos antisentido están dirigidos a o cerca del codón de iniciación asociados con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1.

En el contexto de esta invención, "hibridación", con respecto a las composiciones y procedimientos antisentido, significa formación de enlaces de hidrógeno, que puede ser formación de enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen reversos, entre nucleósidos complementarios o bases nucleotídicas. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se aparean por la formación de enlaces de hidrógeno. Se entiende que la secuencia de un compuesto antisentido no necesita ser complementaria al 100 % a aquella de su ácido nucleico objetivo para ser hibridable específicamente. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo para causar una pérdida de utilidad y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no

específica del compuesto antisentido a las secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica (es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico y en el caso de ensayos *in vitro*, según las condiciones en las que se lleven a cabo los ensayos).

5 Los compuestos antisentido se usan comúnmente como reactivos de investigación y compuestos diagnósticos. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad, se pueden usar para elucidar la función de genes particulares. Los compuestos antisentido se usan también, por ejemplo, para distinguir entre las funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

10 La especificidad y sensibilidad de compuestos antisentido también se aplica para usos terapéuticos. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido se han empleado como restos terapéuticos en el tratamiento de estados morbosos en animales y en el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado de forma segura y de forma efectiva a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están en proceso actualmente. Se establece así que los oligonucleótidos son modalidades terapéuticas útiles que se pueden configurar para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

15 Mientras que se prefieren los oligonucleótidos antisentido, pueden usarse otros compuestos oligoméricos antisentido, incluyendo pero no limitados a compuestos miméticos de oligonucleótidos, tal como se describe más adelante. Compuestos antisentido preferidos comprenden desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30 bases nitrogenadas (es decir, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 30 bases enlazadas), aunque se pueden usar tanto secuencias más largas como secuencias más cortas. Compuestos antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido, incluso más preferentemente aquellos que comprenden de  
20 aproximadamente 12 a aproximadamente 25 bases nitrogenadas.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos incluyen oligonucleótidos que contienen armazones modificados o engarces internucleosídicos no naturales. Según se definen en el presente documento, los oligonucleótidos que tienen armazones modificados incluyen aquellos que mantienen un átomo de fósforo en el armazón y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el armazón. Para los propósitos de esta memoria  
25 descriptiva, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su armazón internucleosídico también puede considerarse que son oligonucleótidos.

Los armazones de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquilfosfonatos que incluyen 3-  
30 alquilenofosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen engarces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de éstos y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades nucleosídicas están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mezcladas y formas de ácido libres.

Los armazones de oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen  
35 armazones que están formados por engarces internucleosídicos de alquilo o de cicloalquilo de cadena corta, uniones internucleosídicas mixtas de heteroátomos y de alquilo o de cicloalquilo, o uno o más engarces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen los que tienen engarces de morfolino (formados en parte desde la parte de azúcar de un nucleósido); armazones de siloxano, armazones de sulfuro, sulfóxido y sulfona; armazones de formacetilo y tioformacetilo; armazones de metileno formacetilo y tioformacetilo; armazones que  
40 contienen alqueno; armazones de sulfamato; armazones de metilenoimino y metilenoimidazino; armazones de sulfonato y sulfonamida; armazones de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH<sub>2</sub> mezcladas.

En otros compuestos miméticos de oligonucleótido preferidos, tanto el azúcar como el engarce internucleosídico (es decir, el armazón), de las unidades nucleotídicas están reemplazados con grupos novedosos. Las unidades de bases se mantienen para hibridación con un compuesto objetivo de ácido nucleico apropiado. Un compuesto  
45 oligomérico tal, un compuesto mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se refiere como un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos PNA, el armazón de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con un armazón que contiene amida, en particular un armazón de aminoetilglicina. Las bases nitrogenadas se mantienen y están unidas directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida del armazón. Los procedimientos para la preparación de compuestos de PNA se conocen bien (por ejemplo, véase Patente de los EE.UU. N.ºs: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262 y Nielsen y cols., Science 254: 1497 (1991)). La mayoría de las realizaciones preferidas de la invención son oligonucleótidos con  
50 armazones de fosforotioato y oligonucleósidos con armazones de heteroátomos y en particular -CH<sub>2</sub>-, -NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [conocidos como metileno (metilimino) o armazón MMI], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [en los que el armazón de fosfodiéster nativo está representado como -O-P-O-CH<sub>2</sub>-], armazón amídico y estructuras de armazón de morfolino, todas las cuales se conocen bien (por ejemplo, véanse Patentes de los EE.UU. N.ºs: 5.489.677, 5.602.240 y 5.034.506).

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los grupos siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-,

S- o N-alqueniilo; O-, S- o N-alquiniilo; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueniilo y alquiniilo pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueniilo y alquiniilo C2 a C10 sustituidos o insustituidos. Se prefieren particularmente  $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ ,  $O(CH_2)_nOCH_3$ ,  $O(CH_2)_nNH_2$ ,  $O(CH_2)_nCH_3$ ,  $O(CH_2)_nONH_2$  y  $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ , donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo, alcarilo, aralquilo, o-alcarilo o O-aralquilo inferiores sustituidos, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo comunicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y cols., Helv. Chim. Acta 78: 486 [1995]), es decir, un grupo alcoxicoxi. Una modificación preferente incluye 2'-dimetil-aminoxietoxi (es decir, un grupo  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ ), también conocido como 2'-DMAOE, 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2.

Otras modificaciones preferidas incluyen la 2'-metoxi(2'-O-CH3), 2'-aminopropoxi(2'-OCH2CH2CH2NH2) y 2'-fluoro (2'-F). Modificaciones similares se pueden hacer también en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos pueden tener también miméticos de azúcares tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentafuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nitrogenadas (a menudo referidas en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usan en el presente documento, bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nitrogenadas modificadas se conocen bien (por ejemplo, véase la Patente de los EE.UU. N.º: 3.687.808) e incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales (por lo que las abreviaturas A, G, T, C y U para las bases se usan en los siguientes ejemplos), tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-C, xantina, hipoxantina, 2-amino-A, 6-metil- o 2-propil- y otros derivados alquílicos de A y G, 2-tio-U, 2-tio-T y 2-tio-C, 5-halo-U y 5-halo-C, 5-propinil-U y 5-propinil-C, 6-azo-U, 6-azo-C y 6-azo-T, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tio-U, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras A y G 8-sustituidas, U y C 5-halosustituidas, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otras U y C 5-sustituidas, 7-metil-G y 7-metil-A, 8-aza-G y 8-aza-A, 7-deaza-G y 7-deaza-A y 3-deaza-G y 3-deaza-A. Ciertas de estas bases nitrogenadas son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propinil-U y 5-propinil-C. Se conocen sustituciones de 5-metil-C para incrementar estabilidad de dúplex de ácido nucleico y son sustituciones de bases preferidas en algunas realizaciones, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares de 2'-O-metoxietilo.

Otra modificación de los oligonucleótidos implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen pero no se limitan a restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, (por ejemplo, 5-S-tritilitiol), un tiocolesterol, una cadena alifática, (por ejemplo, residuos de dodecandiol o de undecilo), un fosfolípido (por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio, 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato), una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido acético de adamantano, un resto de palmitilo, o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Un experto en la técnica relevante sabe bien cómo generar oligonucleótidos que contengan las modificaciones descritas anteriormente. La presente invención no está limitada a los oligonucleótidos antisentido descritos anteriormente. Se puede usar cualquier modificación o sustitución adecuada.

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto dado modificarse uniformemente y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un compuesto individual o incluso en un nucleósido individual dentro de un oligonucleótido. Los compuestos antisentido pueden ser compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras," como se usan en el presente documento, son compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado tal como para conferir al oligonucleótido resistencia incrementada a la degradación por nucleasas, captación celular incrementada, y/o afinidad de unión incrementada por el ácido nucleico objetivo. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la ARNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ARN objetivo, potenciando grandemente de este modo la eficiencia de la inhibición oligonucleotídica de la expresión génica. Por consiguiente, pueden obtenerse a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, comparados con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma

región objetivo. La escisión del objetivo de ARN puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y si es necesario por técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

Los compuestos antisentido quiméricos pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos tal como se ha descrito anteriormente.

Otras realizaciones incluyen composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido como se describen en el presente documento.

## B. Terapia génica

Las realizaciones puede usar cualquier manipulación genética para modular la expresión de marcadores de cáncer asociados con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 descritos en el presente documento. Ejemplos de manipulación genética incluyen, pero no se limitan a, inactivación génica (tal como eliminando el reordenamiento genético del cromosoma que se usa, por ejemplo, por recombinación), expresión de construcciones antisentido con o sin promotores inducibles y similares. La administración de construcción de ácido nucleico a células *in vitro* o *in vivo* se puede llevar a cabo usando cualquier procedimiento adecuado. Un procedimiento adecuado es uno que introduce la construcción de ácido nucleico en la célula de tal forma que tiene lugar el suceso deseado (por ejemplo, expresión de una construcción antisentido). La terapia genética también se puede usar para administrar ARNip u otras moléculas interferidoras que se expresan *in vivo* (por ejemplo, después de estimulación por un promotor inducible (por ejemplo, un promotor que responde a andrógenos)).

La introducción de moléculas que llevan información genética dentro de las células se logra por cualquiera de diversos procedimientos incluyendo, pero no limitados a, inyección dirigida de construcciones de ADN desnudo, bombardeo con partículas de oro cargadas con dichas construcciones y transferencia génica mediada por macromoléculas usando, por ejemplo, liposomas, biopolímeros y similares. Los procedimientos preferidos usan vehículos de administración de genes derivados de virus, incluyendo, pero no limitados a, adenovirus, retrovirus, virus vaccinia y virus adenoasociados. Debido a la eficiencia superior en comparación con retrovirus, los vectores derivados de adenovirus son los vehículos de administración de genes preferidos para transferir moléculas de ácido nucleico en células huésped *in vivo*. Se conocen bien vectores adenovirales y su uso en la transferencia de genes (por ejemplo, véanse las publicaciones PCT WO 00/12738 y WO 00/09675 y las Patentes de los EE.UU. N.º: 6.033.908, 6.019.978, 6.001.557, 5.994.132, 5.994.128, 5.994.106, 5.981.225, 5.885.808, 5.872.154, 5.830.730 y 5.824.544). Tales vectores y procedimientos han estado mostrando proporcionar transferencia génica *in vivo* muy eficiente en una diversidad de modelos animales y dentro de xenoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones inmunodeficientes.

Los vectores se pueden administrar al sujeto en una diversidad de formas bien conocidas, por ejemplo, se pueden administrar en tumores o tejidos asociados con tumores usando inyección directa o administración por medio de la circulación sanguínea o linfática (véase *por ejemplo*, la publicación PCT 99/02685). Niveles de dosis ejemplares de vector adenoviral son preferentemente  $10^8$  a  $10^{11}$  partículas de vectores añadidas al perfundido.

## C. Terapias de anticuerpos o de moléculas pequeñas

Algunas realizaciones son o usan anticuerpos y/o moléculas pequeñas que tienen como objetivo de tumores de próstata que expresan un marcador de cáncer asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1. En algunas realizaciones, el régimen terapéutico se selecciona en base a un resultado de diagnóstico y usa un anticuerpo adecuado (por ejemplo, monoclonal, policlonal, o sintético) en los procedimientos terapéuticos. En realizaciones preferidas, los anticuerpos usados para terapia del cáncer son anticuerpos humanizados. Se conocen bien procedimientos para humanizar anticuerpos (véanse *por ejemplo*, las Patentes de los EE.UU. N.ºs: 6.180.370, 5.585.089; 6.054.297 y 5.565.332).

En algunas realizaciones, los anticuerpos terapéuticos comprenden un anticuerpo generado contra el marcador de cáncer asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1, en los que el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico. En tales realizaciones, se genera un agente terapéutico específico tumoral que no tiene como objetivo células normales, reduciendo así muchos de los efectos secundarios perjudiciales de la quimioterapia tradicional. Para ciertas aplicaciones, se prevé que los agentes terapéuticos serán agentes farmacológicos que servirán como agentes útiles para unión a anticuerpos, en particular agentes citotóxicos o agentes anticelulares de otro modo que tienen la capacidad para destruir o suprimir el crecimiento o la división celular de células endoteliales. Las realizaciones puede usar cualquier agente farmacológico que se pueda conjugar a un anticuerpo y pueden administrarse en forma activa. Agentes anticelulares ejemplares incluyen agentes quimioterapéuticos, radioisótopos y citotoxinas. Tales anticuerpos terapéuticos pueden incluir una diversidad de restos citotóxicos, incluyendo pero no limitados a, isótopos radiactivos (por ejemplo, yodo-131, yodo-123, tecnecio-99m, indio-111, renio-188, renio-186, galio-67, cobre-67, itrio-90, yodo-125 o astatina-211), hormonas tales como un esteroide, antimetabolitos tales como citosinas (por ejemplo, arabinósido, fluorouracilo, metotrexato o aminopterina; una antraciclina, mitomicina C), alcaloides de vinca (p. ej., demecolcina; etopósido, mitramicina) y agente de alquilación antitumoral tal como

clorambucilo o melfalán. Otras realizaciones pueden incluir agentes tales como un coagulante, una citoquina, factor de crecimiento, endotoxina bacteriana del resto de lípido A de endotoxina bacteriana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los agentes terapéuticos incluirán toxinas derivadas de plantas, hongos o bacterias, tales como toxinas de cadena A, una proteína inactivadora de ribosomas,  $\alpha$ -sarcina, aspergilina, restrictocina, una ribonucleasa, toxina diftérica o exotoxina de pseudomonas, por mencionar sólo unos pocos ejemplos. En algunas realizaciones preferidas, se usa cadena A de ricino deglicosilada.

En cualquier caso, se propone que agentes tales como éstos puedan, si se desea, estar conjugados exitosamente con un anticuerpo, de manera que permitan su marcado como objetivo, su internalización, su liberación o su presentación a componentes sanguíneos en el sitio de las células tumorales marcadas como objetivo según se requiera usando tecnología de conjugación conocida (véase, *por ejemplo*, Ghose y col., *Methods Enzymol.*, 93: 280 [1983]).

Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan inmunotoxinas dirigidas contra marcador de cáncer asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1. Las inmunotoxinas son conjugados de un agente dirigido específico típicamente un anticuerpo o fragmento dirigido a tumores, con un agente citotóxico, tal como un resto de toxina. El agente dirigido dirige la toxina a y mata selectivamente de este modo, células que llevan el antígeno marcado. En algunas realizaciones, anticuerpos terapéuticos emplean reticulantes que proporcionan estabilidad *in vivo* alta (Thorpe y cols., *Cancer Res.*, 48: 6396 [1988]).

En otras realizaciones, en particular aquellas que implican el tratamiento de tumores sólidos, los anticuerpos están diseñados para tener un efecto citotóxico o un efecto anticelular de otro modo contra la vasculatura tumoral, suprimiendo el crecimiento o la división celular de las células endoteliales vasculares. Este ataque se desea para conducir a un colapso vascular localizado en el tumor, privando a las células tumorales, particularmente aquellas células tumorales distales de la vasculatura, de oxígeno y nutrientes, conduciendo en última instancia a muerte celular y a necrosis tumoral.

En realizaciones preferidas, los compuestos terapéuticos basados en anticuerpos se formulan como composiciones farmacéuticas como se describe en este documento. En realizaciones preferidas, la administración de una composición de anticuerpos que marca como objetivo un resto asociado con reordenamientos genéticos MIPOL1-ETV1 da como resultado un decrecimiento medible en cáncer (*por ejemplo*, decrecimiento o eliminación de tumor).

## VII. Animales transgénicos

Las realizaciones incluyen la generación de animales transgénicos que comprenden un gen marcador de cáncer exógeno que es idéntico a o representante de un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 descrito en el presente documento, que incluye mutantes y variantes de los mismos (*por ejemplo*, truncaciones o polimorfismos de nucleótido individual). En realizaciones preferidas, el animal transgénico presenta un fenotipo alterado (por ejemplo, presencia incrementada o disminuida de marcadores asociados con reordenamientos genéticos de MIPOL1-ETV1) según se compara con animales de tipo silvestre. Los procedimientos para analizar la presencia o ausencia de tales fenotipos incluyen, pero no se limitan a, aquellos revelados en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas, los animales transgénicos presentan adicionalmente un crecimiento incrementado o disminuido de tumores o evidencia de cáncer.

Tales animales transgénicos son útiles en rastreos de fármacos (por ejemplo, terapia del cáncer). En algunas realizaciones, se administran compuestos de ensayo (por ejemplo, un fármaco que se sospecha que es útil para tratar cáncer) y compuestos de control (*por ejemplo*, un placebo) a los animales transgénicos y a los animales control y se evalúan los efectos.

Los animales transgénicos pueden generarse a través de una variedad de procedimientos. En algunas realizaciones, se usan células embrionarias en diversas fases del desarrollo para introducir transgenes para la producción de animales transgénicos. Se usan diferentes procedimientos dependiendo de la fase del desarrollo de la célula embrionaria. El cigoto es el mejor objetivo para la microinyección. En el ratón, el pronúcleo masculino alcanza el tamaño de aproximadamente 20 micrómetros de diámetro que permite la inyección reproducible de 1-2 picolitros (pl) de solución de ADN. El uso de cigotos como objetivo para transferencia génica tiene una ventaja principal en que en la mayoría de los casos, el ADN inyectado se incorporará en el genoma del huésped antes de la primera escisión (Brinster y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 4438-4442 [1985]). Como consecuencia, todas las células del animal no humano transgénico llevarán el transgén incorporado. Esto se refleja en la transmisión eficiente del transgén a la descendencia del fundador ya que el 50 % de las células germinales albergan el transgén en base a la genética mendeliana estándar. Se conocen bien procedimientos para fabricar compuestos transgénicos (por ejemplo, véase la Patente de los EE.UU. N.º: 4.873.191).

En otras realizaciones, se usa la infección retroviral para introducir transgenes en un animal no humano. En algunas realizaciones, el vector retroviral se usa para transfectar oocitos inyectando el vector retroviral en el espacio perivitelino del oocito (Patente de los EE.UU. N.º: 6.080.912). En otras realizaciones, el embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta la fase de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser

objetivos para la infección retroviral (Janenich, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 73: 1260 [1976]). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Hogan y col., en *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986]). El sistema de vector vírico usado para introducir el transgén es normalmente un retrovirus de replicación defectiva que porta el transgén (Jahner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 6927 [1985]). La transfección se obtiene fácilmente y eficazmente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células productoras de virus (Stewart, y col., EMBO J., 6: 383 [1987]). Alternativamente, la infección pueden realizarse en una fase posterior. Los virus o las células productoras de virus pueden inyectarse en el blastocelo (Jahner y cols., Nature 298: 623 [1982]). La mayoría de los fundadores serán mosaico para el transgén, ya que la incorporación tiene lugar sólo en un subconjunto de las células que forman el animal transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones del genoma que generalmente se separarán en la descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal, aunque con baja eficiencia, por infección retroviral intrauterina del embrión a la mitad de la gestación (Jahner y cols., *supra* [1982]). Los medios adicionales de uso de retrovirus o vectores retrovirales para crear animales transgénicos conocidos en la técnica implican la microinyección de partículas retrovirales o células tratadas con mitomicina C que produzcan retrovirus en el espacio perivitelino de huevos fecundados y embriones tempranos (en la solicitud internacional PCT WO 90/08832 [1990]), y Haskell y Bowen, Mol. Reprod. Dev., 40: 386 [1995]).

En otras realizaciones, el transgén se introduce en células madre embrionarias y las células madre transfectadas se usan para formar un embrión. Las células ES se obtienen cultivando embriones preimplantacionales *in vitro* según condiciones apropiadas (Evans y cols., Nature 292: 154 [1981]; Bradley y cols., Nature 309: 255 [1984]; Gossler y cols., Proc. Acad. Sci. EE.UU. 83: 9065 [1986]; y Robertson y cols., Nature 322: 445 [1986]). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en células ES mediante transfección de ADN o por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos la coprecipitación con fosfato de calcio, la fusión de protoplastos o esferoplastos, la lipofección y la transfección mediada por DEAE-dextrano. Los transgenes también pueden introducirse en células ES mediante transducción mediada por retrovirus o por microinyección. Tales células ES transfectadas pueden colonizar después un embrión tras su introducción en el blastocelo de un embrión en fase de blastocisto y contribuir a la línea germinal del animal quimérico resultante (para revisión, véase, Jaenisch, Science 240: 1468 [1988]). Antes de la introducción de células ES transfectadas en el blastocelo, las células ES transfectadas pueden someterse a diversos protocolos de selección para un enriquecimiento en células ES que han integrado el transgén, asumiendo que el transgén proporciona un medio para tal selección. Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa puede usarse para seleccionar células ES que han integrado el transgén. Esta técnica evita la necesidad de que crezcan las células ES transfectadas según condiciones selectivas apropiadas antes de transferirlas al blastocelo.

En aún otras realizaciones, la recombinación homóloga se usa para inactivar la función génica o para crear mutantes de delección (por ejemplo, mutantes por truncación), usando procedimientos bien conocidos (véase Patente de los EE.UU. N.º: 5.614.396).

### Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar ciertas realizaciones y aspectos preferidos de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, pero no son para interpretarse como limitantes del alcance de la invención reivindicada.

#### Ejemplo 1: Reordenamientos genéricos de ETV1 en líneas celulares

Este ejemplo muestra que las líneas celulares LNCaP y MDA-PCa 2B albergan reordenamientos que localizan el locus de ETV1 a 14q13.3-14q21.1.

Los experimentos se diseñaron para identificar modelos de líneas celulares de activación aberrante de ETV1. La línea celular de cáncer de próstata LNCaP ha sobreexpresado ETV1 notablemente, pero RLM-RACE reveló expresión de sólo el transcrito de tipo silvestre (Tomlins y cols., Science 310, 644-8 (2005)). Estos experimentos se diseñaron para identificar células LNCaP en un reordenamiento novedoso que afecta a la expresión de ETV1. Por tanto, una estrategia de FISH de sonda de escisión, constituida por una sonda en el locus de ETV1 y una sonda 5' con respecto al locus de ETV1, se usó buscando reordenamientos grandes que involucren ETV1 (FIG. 1).

FISH de interfase en secciones de tejidos (FFPE) incrustadas en parafina fijadas en formalina se llevó a cabo usando procedimientos conocidos (sustancialmente como se ha descrito previamente en Tomlins y cols., Cancer Res 66, 3396-400 (2006)). Se evaluaron un mínimo de 50 núcleos por ensayo. Las dispersiones de metafase de LNCaP y MDA-PCa 2B se prepararon usando técnicas de citogenética estándar. Se pretrataron los portaobjetos en SSC 2x durante 2 minutos; etanol al 70 % durante 2 minutos y etanol al 100 % durante 2 minutos y se secaron al aire. Las muestras de portaobjetos y las sondas se co-desnaturalizaron a 75°C durante 2 minutos y se hibridaron durante toda una noche a 37°C. La post-hibridación fue en SSC 0,5x a 42°C durante 5 minutos, seguida por 3 lavados en PBST. La detección fluorescente se llevó a cabo usando una anti-digoxigenina conjugada con fluoresceína (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) y estreptavidina conjugada con un fluoróforo (Alexa Fluor 594, Invitrogen). Los portaobjetos se contratiñeron y montaron usando reactivos estándar y procedimientos estándar

(en reactivo ProLong Gold Antifade con DAPI, Invitrogen). Los portaobjetos se examinaron usando un microscopio de fluorescencia (Axio Imager Z1, Zeiss, Thornwood, NY) y se obtuvo imagen con una cámara CCD usando un algoritmo estándar analizando los resultados (ISIS software, Metasystems, Altlussheim, Alemania). BAC (enumerados en la Tabla 2, obtenidos a partir del Centro de Recursos de BACPAC (Oakland, CA)) se usaron preparando sondas usando procedimientos descritos previamente (Tomline y cols., 2006, supra). Se usaron también centrómeros del cromosoma 7 premarcado y sondas teloméricas 7p (de Vysis Corp., Des Plaines, IL). La integridad y localización correcta de todas las sondas se verificaron por hibridación a dispersiones metafásicas de linfocitos periféricos normales.

Sobre las metafases de LNCaP, este ensayo reveló dos pares de señales de co-localización en el locus de ETV1 en 7p y dos señales de escisión donde las señales 5' permanecieron en 7p, mientras dos copias del locus de ETV1 se insertaron dentro de otro cromosoma (FIG. 1c). Este reordenamiento en 2 de 4 copias de cromosoma 7 es consistente con otros reordenamientos observados por cariotipado de bandas G o por cariotipado espectral (SKY) en células LNCaP tetraploides (Beheshti y cols., Mol Diagn 5, 23-32 (2000); Beheshti y cols., Neoplasia 3, 62-9 (2001); Gibas y cols., Cancer Genet Cytogenet 11, 399-404 (1984); van Bokhoven y cols., Prostate 57, 226-44 (2003)). El análisis citogenético indicó que ETV1 se insertó en el cromosoma 14 y esto se confirmó usando un BAC mapeado por FISH localizado previamente a 14q (FIG. 2). Se usaron ensayos de FISH subsiguientes determinando que la ruptura en el cromosoma 7 se localizó completamente 5' con respecto al locus de ETV1, consistente con RACE revelando sobre-expresión de ETV1 de longitud total (FIG. 3).

Para localizar el punto de corte, se llevó a cabo prueba de bandas de Southern usando 22 sondas a través de la región implicada de 7p. Se digirió ADN genómico (10 µg) con EcoRI o PstI (New England Biologicals, Ipswich, MA) durante toda una noche. Los fragmentos se redisolviéron en un gel de agarosa al 0,8 % a 40 V durante toda una noche, se transfirieron a una membrana de nailon (Hybond NX), se prehibridaron, se hibridaron con sonda y se lavaron de acuerdo con procedimientos de laboratorio estándar. Una serie de 22 sondas que cruzan la región de cromosoma 7 implicada por FISH (entre RP11-313C20 y RP11-703A4) se generaron por amplificación con PCR usando ADN genómico masculino humano normal como plantilla, una enzima polimerasa de alta fidelidad (Taq de platino de alta fidelidad) y los cebadores enumerados en la Tabla 1. Los veinticinco ng de cada sonda se marcaron con dCTP-P32 y se usaron para la hibridación.

Una sonda individual (Sonda A, véase Tabla 1, "Sonda de Southern") mostró evidencia de un reordenamiento, tanto con ADN de LNCaP digerido con EcoRI como con ADN de LNCaP digerido con PstI mostrando bandas adicionales (FIG. 3).

ADN digerido con PstI se usó después para PCR reversa identificando la secuencia del punto de ruptura genómico en el cromosoma 7 así como la secuencia compañera (FIG. 4). Los cebadores A1, A2, A3, que se complementan de forma reversa a partir de la secuencia de tipo silvestre inversa y son divergentes con respecto a B1, B2, B3, se usaron para PCR inversa en ADN digerido con PstI y religado (ligación intramolecular) usando la plantilla de ADN genómico de LNCaP. Se llevaron a cabo las PCR anidadas en el siguiente orden de combinaciones de cebadores: A1 y B1, después A2 y B2 y finalmente A3 y B3. El producto de condensación se amplificó usando procedimientos de amplificación de PCR y procedimientos estándar de laboratorio (Sistema de PCR Expand 20 kbplus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante). La banda de 3 Kb enriquecida en PCR anidadas se clonó en un vector (pCR8/GW/TOPO, Invitrogen) y el ADN aislado a partir de diversos clones se rastreó para insertos y los clones positivos se secuenciaron usando procedimientos estándar de laboratorio (por el Laboratorio Central de Secuenciación de la Universidad de Michigan, Ann Arbor, MI). Los clones de las secuencias de condensación se confirmaron por amplificación de PCR (sistema de alta fidelidad de Taq de platino) usando cebadores específicos de condensación (condensación genómica f y r; Tabla 1).

La secuenciación del producto amplificado confirmó el punto de ruptura en el cromosoma 7p situado en una región identificada usando realización de análisis de bandas de Southern y el punto de inserción fue una secuencia intrónica del locus MIPOL1 en el cromosoma 14q13.3-14q21.1 (FIG. 1b y FIG. 4), consistente con los resultados obtenidos por análisis de FISH descritos anteriormente. Este reordenamiento se confirmó por amplificación con PCR de un producto hecho usando ADN genómico de LNCaP no digerido como plantilla, aislado a partir de dos pasos diferentes, mientras que no se amplificó ningún producto de ADN genómico de VCap, ADN genómico masculino normal, o ADN genómico de placenta normal (FIG. 4). En consonancia con los datos citogenéticos y de SKY que no revelan reordenamientos grandes en cromosomas 7 ó 14 en células de LNCaP 29-32, los análisis de FISH usando sondas de escisión alrededor del locus 14q13.3-14q21.1 mostraron señales no colocadas (FIG. 1c). Estos resultados son consistentes con la interpretación de que una inserción limitada tuvo lugar alrededor de ETV1, o de que se suprimió todo el brazo 7p telomérico a ETV1 (aproximadamente 14 MB). La última posibilidad se excluyó porque aCGH de alta densidad, no reveló la presencia de cualesquiera deleciones teloméricas a ETV1 y FISH mostró secuencia telomérica 7p intacta en todas las copias del cromosoma 7 (FIG. 5). Por lo tanto, estos resultados confirman la inserción críptica de una región mínima alrededor de ETV1 en 14q13.3-14q21.1 en LNCaP.

Las líneas celulares de cáncer de próstata adicionales se analizaron rastreando en busca de expresión de ERG y ETV1 por PCR cuantitativa (qPCR), para identificar redistribuciones genéticas adicionales. Se pusieron a prueba las siguientes células: una línea celular epitelial prostática benigna inmortalizada (RWPE) y 8 líneas celulares de cáncer

de próstata (MDA-PCa 2B, LNCaP, VCaP, LAPC4, 22Rv1, NCI-H660, PC3 y DU145). Se llevó a cabo PCR cuantitativa (QPCR) usando los cebadores de oligonucleótidos que se muestran en Tabla 1 (secciones de "QPCR de Condensación" y "QPCR de Andrógeno") con procedimientos estándar de laboratorio y reactivos (Power SYBR Green Mastermix y sistema de PCR en Tiempo Real 7300, Applied Biosystems, Foster City, CA). Todos los cebadores de oligonucleótidos se sintetizaron por procedimientos estándar (llevados a cabo por Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Los cebadores HMBS y GAPDH5 y PSA6 fueron como se describen anteriormente (Vandesompele y cols., *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034 (2002); Specht y cols., *Am J. Pathol.* 158: 419 (2001)). Las reacciones de estimulación andrógena se llevaron a cabo por cuadruplicado y todas las otras reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

5 Se detectó sobre-expresión marcada de ETV1 en células LNCaP3 y se detectó sobreexpresión de ERG en VCaP y en células NCI-H660, que son ambas positivas en TMPRSS2:ERG (Tomlins y cols., *Science* 310, 644-8 (2005)). Los resultados mostraron que células MDA-PCa 2B expresaron niveles más altos de ETV1 que células LNCaP (FIG. 7).

10 Las células MDA-PCa 2B también se analizaron para reordenamiento genético que implica el locus de ETV1. El análisis por RLM-RACE reveló sólo ETV1 de longitud completa fabricado en las células MDA-PCa 2B, indicando que el reordenamiento implica el locus de ETV1 completo. Un análisis anterior de SKY y de bandas G de ADN a partir de células MDA-PCa 2B demostró la presencia de un t(7;14)(p21;q21)32 equilibrado, las localizaciones de los loci de ETV1 y de MIPOL1. El mismo análisis de FISH se llevó a cabo para células MDA-PCa 2B como se describe anteriormente para células LNCaP, usando sondas de escisión alrededor del locus ETV1 y de las regiones 14q13.3-14q21.1. Los resultados demostraron que las células MDA-PCa 2B también albergan un reordenamiento que implica ETV1, en el que el locus de ETV1 completo se transloca al cromosoma d4 (FIG. 1d). FISH reveló que la región 14q13.3-14q21.1 de 1,5 MB es la compañera de esta traslocación equilibrada, ya que la sonda de 14q13.3-14q21.1 telomérica se transloca al cromosoma d7 (FIG. 1d).

### Ejemplo 2: Expresión aberrante de *etv1* asociada con reordenamientos genéticos

25 Este ejemplo muestra que la región 14q13.3-14q21.1 está regulada coordinadamente en células de cáncer de próstata y en células LNCaP.

La existencia de reordenamientos mecánicamente distintos que da como resultado la localización de ETV1 a 14q13.3-14q21.1 (FIG. 1, e-g) en líneas celulares de cáncer de próstata con expresión de valor extremo de ETV1 indica que los elementos en esta región median la transcripción de ETV1 aberrante. La estructura de la reordenación genética en células LNCaP indica que ETV1 no adquiere un promotor proximal nuevo después de inserción dentro del locus 14q13.3-14q21.1 debido a que aproximadamente 200 kb de la secuencia anteriormente en cadena 5' se insertan con el locus de ETV1 (véase la FIG. 1a). Además, mientras que la expresión de MIPOL1 en la próstata no se ha descrito, FOXA1, inmediatamente adyacente a MIPOL1, se expresa fuertemente durante todo el desarrollo de próstata humano y murino y actúa como un potenciador transcripcional para expresión de genes regulados por andrógenos (Mirosevich y cols., *Prostate* 66, 1013-28 (2006); Mirosevich et al., *Prostate* 62, 339-52 (2005)). La sobreexpresión de ETV1 en estas líneas puede dirigirse por elementos potenciadores que confieren especificidad de próstata coordinada o regulación de andrógenos a esta región. Para probar esta hipótesis, se evaluó la expresión de cuatro transcritos contiguos en la región 14q13.3-14q21.1 de 1,5 MB (SLC25A21, MIPOL1, FOXA1 y TTC6) usando datos en el conjunto de datos de expO (proyecto de expresión del Consorcio de Genómica Internacional (IGC) para Oncología (expO)). El conjunto de datos de expO es un conjunto de datos de expresión génica multi-tumoral generado por un consorcio de laboratorios incluyendo TGEN y se ha incluido en Oncomine (Rhodes y cols., *Neoplasia* 6, 1-6 (2004)). Todos los cuatro transcritos mostraron sobreexpresión significativa en cáncer de próstata comparado con todos los otros cánceres (FIG. 6a). Además, cuando todos los genes medidos en cromosoma 14 se clasificaron por sobreexpresión significativa en pacientes con cáncer de próstata comparados con todos los otros cánceres en este conjunto de datos, MIPOL1 se clasificó segundo, FOXA1 se clasificó quinto y TTC6 se clasificó vigésimotercero.

Aunque los cuatro transcritos se sobreexpresaron en cáncer de próstata, la estimulación de LNCaP con R1881 incrementó mínimamente la expresión de FOXA1 (1,3 veces,  $p = 0,05$ ), mientras que SLC25A21 (0,75 veces,  $p = 0,008$ ), MIPOL1 (1,2 veces,  $p = 0,08$ ) y TTC6 (0,70 veces,  $p = 0,10$ ) no mostraron ningún cambio significativo o expresión reducida tras estimulación con R1881 (FIG. 6b). Sin embargo, la estimulación de LNCaP con R1881 dio como resultado expresión significativamente incrementada de ETV1 (1,8 veces,  $p = 0,0004$ , FIGURA 6c), indicando que la reorganización de esta región confiere responsividad a andrógeno a ETV1, además de expresión aberrante. Conjuntamente, estos resultados muestran sobreexpresión coordinada en cáncer de próstata para los genes en esta región (y ETV1 cuando se inserta en ellos), con regulación adicional mediada por andrógeno.

55 Realizando un modelo de la progresión a enfermedad metastática refractaria a hormonas, las células LNCaP se han cultivado previamente en ausencia de andrógeno y se seleccionaron clones que son insensibles a andrógenos. Estos sistemas modelo están relacionados así con niveles de expresión de componentes genéticos y con expresión regulada por andrógenos de componentes genéticos en las células, que incluirían ETV1 y genes en la región 14q13.3-14q21.1 contenida en la línea celular LNCaP y en los clones derivados fabricados a partir de esta línea celular. La investigación de los autores de la presente invención de todas estas líneas celulares derivadas

independientemente para las que están disponibles datos de identificación de expresión públicamente disponibles, ETV1 muestra una marcada regulación a la baja en derivadas insensibles a andrógenos de células LNCaP36-39. Para confirmar estos hallazgos, la expresión génica en LNCaP y en sus derivadas insensibles a andrógenos C4-2B40 se identificó usando un ensayo basado en hibridación examinando expresión génica (Microselecciones de Genoma Completo de Agilent). Como se muestra en la FIG. 6d, ETV1 fue la cuarta característica más expresada en las LNCaP comparadas con las C4-2B (diferencia de 307 veces). Cuando se midió usando qPCR, la regulación a la baja de ETV1 en C4-2B (aproximadamente 22.500 veces), comparada con la línea celular LNCaP parental se confirmó (FIG. 6e). Además, qPCR también demostró que las células C4-2B expresan menos PSA (3 veces menos) y los cuatro genes en 14q13.3-14q21.1, cuando se comparan con células LNCaP (FIG. 6, f-g). Estos resultados demuestran regulación coordinada de genes inducidos por andrógenos y genes en 14q13.3-14q21.1. Estos resultados indican que ETV1 está marcadamente regulado a la baja en derivados de LNCaP insensibles a andrógenos bien debido a delección o bien a mecanismos transcripcionales, o se seleccionan clones que no albergan el ins(7;14) usando el procedimiento de privación de androgénica usado derivando estos clones a partir de la línea celular LNCaP. Usando análisis de FISH y de PCR sobre ADN genómico, los datos confirmaron que las células C4-2B albergan el mismo reordenamiento de ETV1 que las células LNCaP (FIG. 8 y 9), conduciendo a la conclusión de que la regulación a la baja de ETV1 se debe a mutación o a cambios transcripcionales en los clones derivados.

Tabla 1

	Gen /Región	Secuencia (N.º de acceso)	Bases en secuencia	Nombre del cebador	Secuencia de oligonucleótidos (5' a 3')	SEC ID N.º
Andrógeno/Expresión QPCR	ETV1	NM_004956.3	624-645	ETV1_exon 6-7_f	CTA0CCCATGGACCACAG ATTT	1
Andrógeno/Expresión QPCR	ETV1	NM_004956.3	771-750	ETV1_exon 6-7_r	CTTAAAGCCTTGTGGTGG GAAG	2
Expresión QPCR	ERG	NM_004449.3	574-597	ERG_exon 5-6_f	CGCAGAGTATCGTGCCA GCAGAT	3
Expresión QPCR	ERG	NM_004449.3	659-636	ERG_exon 5-6_r	CGATATCTTTCACCGCC CACTCC	4
RLM-RACE	NA		NA	Generacer 5'_f	CGACTGGAGCACGAGGA CACTGA	5
RLM-RACE	ETV1	NM_004449.3	374-351	ETV1_exon 4-5_r	CATGGACTGTGGGTTCT TTCTTG	6
RLM-RACE	ETV1	NM_004449.3	735-710	ETV1_exon 7-r	AGACATCTGGCGTGGTA CATAGGAC	7
Fusión QPCR	HERV-K_22q11.23	BC020811.1	303-327	HERV-K.ETV1-f	GAGTCCCAAGTACGTCCA CGGTACG	8
Fusión QPCR	ETV1	NM_004956.3	371-345	HERV-K.ETV1-r	TTGATTTTC TGGCAG	9
Fusión QPCR	HNRPA2B1	NM_002137.2	136-155	HNRPA2B1-ETV1-f	TGCGGGAATCGGGCTGA AG	10
Fusión QPCR	ETV1	NM_004956.3	181-154	HNRPA2B1ETV1-r	TTTTCTGACATTTGTTGG TTTCTGTT	11
Fusión QPCR	SLC45A3	NM_033102.2	74-92	SLC45A3-ETV1-f	CCCTGGCTCCGGGTGACA G	12
Fusión QPCR	ETV1	NM_004956.3	366-340	SLC45A3-ETV1-r	GTGGGTTGTTTCTTGATT TTCAGTGG	13
Fusión QPCR	C15ORF21	NM_001005266.1	313-336	C15ORF21-ETV1-f	CAACTAACACTCCGGCTT CCTGAG	14
Fusión QPCR	ETV1	NM_004956.3	483-461	C15ORF21-ETV1-r	CATTCACACTTGTGGCTT CTGAT	15
Andrógeno QPCR	TMPRSS2	NM_005656.2	1539-1563	TMPRSS2-f	CAGGAGTGTACGGGAAT GTGATGGT	16
Andrógeno QPCR	TMPRSS2	NM_005656.2	1608-1585	TMPRSS2-r	GATTAGCCGCTCGCCCTC ATTTGT	17
Andrógeno QPCR	TTC6	NM_001007795.1	1080-1108	TTC6-f	TGCCATGAAGATCAGTAC	18

Andrógeno	QPCR	TTC6	NM_001007795.1	1150-1125	TTC6-r	TACAGCAGAAT GTGGCCCAATAAACTCATG AATCACC	19
Andrógeno	QPCR	SLC25A21	NM_030631.1	356-377	SLC25A21-f	CAGATCGTGGCCGGTGGT TCT	20
Andrógeno	QPCR	SLC25A21	NM_030631.1	408-483	SLC25A21-r	GGGTGCATCAGGCAAATT TCTACAAG	21
Andrógeno	QPCR	MIPOLI	NM_138731.2	1607-1633	MIPOLI-f	CAACAACAAAATGAGGA ACTGGCTACT	22
Andrógeno	QPCR	MIPOLI	NM_138731.2	1673-1649	MIPOLI-r	ATCCATATTTGCTCGCTC TGTGAG	23
Andrógeno	QPCR	FOXA1	NM_004496.2	327-350	FOXA1-f	GAAGATGGAAGGGCATG AAACCAG	24
Andrógeno	QPCR	FOXA1	NM_004496.2	408-389	FOXA1-r	GCTGACCGGGACGGAGG AGT	25
Andrógeno	QPCR	SLC45A3	NM_033102.2	1223-1242	SLC45A3-f	TCGTGGGGCAGGGGCTGT A	26
Andrógeno	QPCR	SLC45A3	NM_033102.2	1308-1284	SLC45A3-r	CATCCGAAACGCCCTTCATC ATAGTGT	27
Andrógeno	QPCR	HERV- K_22q11.23	BC020811.1	168-194	HERV- K_22q11.23-f	CTTTTCTCTAGGGTGAAG GGAECTCTCG	28
Andrógeno	QPCR	HERV- K_22q11.23	BC020811.1	263-238	HERV- K_22q11.23-r	CTTCACCCACAAGGCTCA CTGTAGAC	29
Andrógeno	QPCR	HNRPA2B1	NM_002137.2	594-620	HNRPA2B1-f	GCTTTGGCTTTGTTACTTT TGATGACC	30
Andrógeno	QPCR	HNRPA2B1	NM_002137.2	693-665	HNRPA2B1-r	GCCITTTCTACTTCTGCAT TATGACCATT	31
Andrógeno	QPCR	C15ORF21	NM_001005266.1	219-243	C15ORF21-f	AAGGACGTGCAAGGATG TTTTTATT	32
Andrógeno	QPCR	C15ORF21	NM_001005266.1	293-274	C15ORF21-r	ATGGGAAGATGGGGGCT GTT	33
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,685,335-13,685,364	LNCAP_A-f	GTCAAATGGCTAAAAGAATG GATAAAAGTGGIA	34	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,686,833-13,686,804	LNCAP_A-r	CAGATAGAAAGAGGGGT AGCAAAAATGTGTT	35	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,690,754-13,690,779	LNCAP_B1-f	CAGAAGGCAAAATGTGAG AGGATAGTC	36	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,691,679-13,691,657	LNCAP_B1-r	CTGGATCTGTAAACCCCG TGAGC	37	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,693,600-13,693,625	LNCAP_B2-f	AAAAAGCAAAAGACAAGA CGTGGATT	38	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,695,054-13,695,028	LNCAP_B2-r	GAACTAAGTGGGTGCTGA CTTGGAGAT	39	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,699,772-13,699,801	LNCAP_C-f	AAAAGGCCAAAGAGGGGT TAAAACATACATA	40	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,700,641-13,700,618	LNCAP_C-r	AACCCCTGCTTCCACTTCT CCACT	41	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,705,005-13,705,034	LNCAP_D-f	TGGAGGCATAGAAAAGC TGAGAAATAAG	42	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,705,856-13,705,830	LNCAP_D-r	TGGTGCTAGAAAGAACTG GGAGAAC	43	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,711,265-13,711,291	LNCAP_E-f	GAAAATCAGGGGCACAT ATAGATTAGAG	44	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,712,112-13,712,089	LNCAP_E-r	GCCTCCGCATACAGTHT CTCCTT	45	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,708,247-13,708,275	LNCAP_F-f	AAGTTCGTTAAGCCCAAG ATCGTAAUTA	46	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,709,539-13,709,514	LNCAP_E-r	ATATGAAGCCAGCAGCCA GGTAGCA	47	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,719,560-13,719,587	LNCAP_G-f	TTAGATAAACTGAAAGCC GAACTGAAC	48	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,720,465-13,720,441	LNCAP_G-r	CAAACTGGCAAGCAATGT GAACTGT	49	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,723,503-13,723,615	LNCAP_H-f	TCACCGACAAAACCCATA GAGAAAAGAT	50	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,724,850-13,724,823	LNCAP_H-r	TTAAAATGGTAGGCAATG AGGAAAAGTG	51	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,727,707-13,727,735	LNCAP_I-f	TGCTCAATGCTTCTCC CCTACACTAA	52	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,729,407-13,729,387	LNCAP_I-r	TCCCAAGCAACCAACATC CTC	53	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,730,205-13,730,233	LNCAP_J1-f	CTGGGGGAAAAGCAAGT AGGAAAAGTA	54	
Sonda de Southern	ETV1	NT_007819.16	13,731,073-13,731,047	LNCAP_J1-r	ACAAGAGTTAGTCACCGC AAAGGAGTT	55	

Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,733,199-13,733,220	LNCAP_J2-f	GCDCCTTGGCCCATGAGAA GTAA	56
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,734,028-13,734,003	LNCAP_J2-r	TCCGAGAAGAGATGATAT GAGGTGTC	57
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,737,833-13,737,881	LNCAP_K-f	TCAGTCCCATCTGCCCT AAACCA	58
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,739,203-13,739,180	LNCAP_K-r	CACCACTCTCACCCGACC ACAATTG	59
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,743,031-13,743,060	LNCAP_L-f	TGTAAACTGCCAATGAAAA GAAAAGAAAAAG	60
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,744,016-13,743,957	LNCAP_L-r	CAAGAGATGGGAGAGHA AGAAATGAATAATA	61
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,746,316-13,746,343	LNCAP_M-f	CTATCTAGTCCCTTACGC TGTCCCTGTC	62
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,747,129-13,747,116	LNCAP_M-r	CATTIAGCATTTGGCCCTT GGTCA	63
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,754,360-13,754,384	LNCAP_N1-f	TGCCCTCCGATAAAGTGAC CAATCTC	64
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,755,734-13,755,705	LNCAP_N1-r	CGTGTATCTAAACCTGG ACTTCTCATCAA	65
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,756,219-13,756,246	LNCAP_N2-f	CTTGTTTATTTGGCCTAGTC CTTTGTCT	66
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,757,204-13,757,179	LNCAP_N2-r	GCTTTGTGGGTAGTCCCTG TCTGAGTG	67
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,760,623-13,760,642	LNCAP_O1-f	GGCCCATCCGGTTTGTCT AA	68
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,761,824-13,761,798	LNCAP_O1-r	GTTTCCCAACCACCTCTT TCTATGTC	69
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,764,345-13,764,369	LNCAP_O2-f	GCACAAGACATACAGCC AGATACAC	70
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,765,703-13,765,678	LNCAP_O2-r	AACGCTGGACTATGGAAC TTTACCTG	71
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,767,646-13,767,674	LNCAP_P1-f	TCTTUTCATTCATTTTGA TTTGTTTAC	72
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,768,543-13,768,519	LNCAP_P1-r	GGCTTTGAAGGGAATTACTG GGTTGTCTT	73
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,770,883-13,770,905	LNCAP_P2-f	GCAGGGCAAAGAAGCAG TAGG	74
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,772,453-13,772,428	LNCAP_P2-r	GGATCCCAATTTAGTTTC AAGTTACG	75
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,774,561-13,774,586	LNCAP_Q-f	ATGTGCTGGCTAGATTGG ACTGAAAA	76
Sonda de Southern	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,775,272-13,775,244	LNCAP_Q-r	CAATAAAGCTGGAGGGG TGATAAATAAAT	77
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,685,817-13,685,793	A1 inversa	TTAGAAGGAGACAATCTT ATTCCAG	78
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,685,657-13,685,634	A2 inversa	CTCTTAAAGAGATGAAGC AGGGAG	79
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,685,626-13,685,603	A3 inversa	TTGGCTAGATACAGGGTG AATATT	80
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,685,833-13,685,856	B1 inversa	TGAATTCATGTGTGTAGC TGAGCC	81
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,685,860-13,685,883	B2 inversa	TGACAGCGGAATAAAG TACATGC	82
PCR inversa	Chr 7 ( Sonda A)	NT_007819.16	13,686,095-13,686,118	B3 inversa	GTTGGGAGGTTTACTTGC CAATTA	83
Condensación del genoma	Chr 7 (5' to ETV1)	NT_007819.16	13,056,507-13,056,832	Condensación genómica-f	ACATTTTGGTAACCCCTC TTCATCT	84
Condensación del genoma	Chr 14 (MIPOL1)	NT_026437.11	18,985,248-18,985,272	Condensación genómica-r	TCAACCTCAAAAATAAAT GGCATCT	85
RWPE-ETV1	SERPINA1	NM_000602.1	1181-1200	SERPINA1-f	GCATGGCCCCCGAGGAG AT	86
RWPE-ETV1	SERPINA1	NM_000602.1	1270-1248	SERPINA1-r	CTTGGCCCATGAAAAAGGA CTGTT	87
RWPE-ETV1	TGFB1	NM_000358.1	1506-1528	TGFB1-f	AGGTACGGGACCCCTGTTC ACCAT	88
RWPE-ETV1	TGFB1	NM_000358.1	1605-1580	TGFB1-r	CTACCAGCATGCTAAAGC GATTGTCT	89
RWPE-ETV1	IGFBP3	NM_000598.4	738-762	IGFBP3-f	CGAGTCCAAGCGGGAGA CAGAATA	90
RWPE-ETV1	IGFBP3	NM_000598.4	837-814	IGFBP3-r	TACACCCCTGGGACTCAG CACATT	91
RWPE-ETV1	MMP3	NM_002422.3	1055-1080	MMP3-f	TTCATTTTGCCATCTCTT CCTTCAG	92
RWPE-ETV1	MMP3	NM_002422.3	1181-1155	MMP3-r	TATCCAGCTCGTACCTCA	93

RWPE-ETVI	SPOCK1	NM_004598.3	829-848	SPOCK1-f	TTTCCTCT GCCACCAGCTCCAACAC	94
RWPE-ETVI	SPOCK1	NM_004598.3	951-928	SPOCK1-r	AG GAAGGGTCAAGCAGGAG	95
RWPE-ETVI	BCL2	NM_000633.2	1014-1039	BCL2-f	GTCATAG CCCTGTGGATGACTGAGT	96
RWPE-ETVI	BCL2	NM_000633.2	1084-1064	BCL2-r	ACCTGAAC GGCATCCAGCCTCCGTT	97
RWPE-ETVI	MMP14	NM_004995.2	1036-1059	MMP14-f	ATC AATTTTGTGCTGCCCGAT	98
RWPE-ETVI	MMP14	NM_004995.2	1151-1129	MMP14-r	GATGAC GGAACAGAAGCCGGGA	99
RWPE-ETVI	MMP2	NM_004530.2	953-974	MMP2-f	GGTAGT GAAGCCCAAGTGTCCGT	100
RWPE-ETVI	MMP2	NM_004530.2	1044-1019	MMP2-r	GTGA CAGCTGTTGTACTCCTTG	101
RWPE-ETVI	ADAM19	NM_023038.3	2146-2165	ADAM19-f	CCATTGAA GCCTATGCCCCCTGAGAG	102
RWPE-ETVI	ADAM19	NM_023038.3	2271-2245	ADAM19-r	TG GCITGAGTTGGCTAGTT	103
RWPE-ETVI	MMP9	NM_004994.2	1181-1201	MMP9-f	TGTTGTTT TGCCCCGACCAAGGATAC	104
RWPE-ETVI	MMP9	NM_004994.2	1239-1221	MMP9-r	AGT AGCGCGTGGCCGAACTCA	105
RWPE-ETVI	PLAU	NM_002658.2	1169-1194	PLAU-f	T TACGGCTCTGAAGTCACC	106
RWPE-ETVI	PLAU	NM_002658.2	1308-1286	PLAU-r	ACCAAAAT CCCAGCTCACAAATCCA	107
					GTCAA	

Tabla 2

N.º de sonda:	Gen/Región	Localización	Sonda
1	ETV1	3'	RP11-124L22
2	ETV1	5'	RP11-703A4
3	Rhc 14q13.3-14q21.1	C	RP11-945C4
4	Rhc 14q13.3-14q21.1	T	RP11-107E23
5	HNRPA2B1 3'	3'	RP11-11F13
6	HNRPA2B1 5'	5'	RP11-379M24
7	HERV-K_22q11.23 5'	5'	RP11-61N10
8	HERV-K_22q11.23 3'	3'	RP11-71G19
9	SLC45A3	3'	RP11-249h15
10	SLC45A3	5'	RP11-131E5
11	C15ORF21	5'	RP11-474E1
12	C15ORF21	3'	RP11-626F7
13	14q32	3'	RP11-483K13
14	ETV1	5'	RP11-313C20
15	Centrómero del cromosoma 7	C	CEP 7
16	Telómero del cromosoma 7p	T	TelVysion 7p
17	TMPRSS2	5'	RP11-35C4

Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas, debería entenderse que la invención según se reivindica no debería limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Las modificaciones y variaciones de las composiciones y procedimientos de la invención descritos que no cambian significativamente las características funcionales de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento se desea que estén dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para detectar cáncer de próstata que comprende detectar la presencia de un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 en una muestra biológica, en el que la presencia en la muestra del reordenamiento genético es indicadora de cáncer de próstata en un individuo de quien se deriva la muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la reordenación genética MIPOL1-ETV1 comprende detectar un reordenamiento cromosómico del ADN genómico que comprende material genético de MIPOL1 y material genético de ETV1 en la misma región genómica.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el reordenamiento cromosómico de ADN genómico usa una técnica de secuenciación de ácidos nucleicos.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que detectar el reordenamiento cromosómico de ADN genómico usa una técnica de hibridación de ácidos nucleicos.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que detectar el reordenamiento cromosómico de ADN genómico usa una técnica de hibridación de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en: hibridación *in situ* (ISH), análisis de hibridación con una microselección de sondas y análisis de bandas de Southern.
6. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que detectar el reordenamiento cromosómico de ADN genómico usa un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos usado se selecciona del grupo que consiste en: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación de desplazamiento de hebras (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA).
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, orina, sobrenadante de orina, sedimento celular de orina, semen, secreciones prostáticas y células de próstata.
9. Una composición para detectar un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 asociado con cáncer de próstata que comprende al menos una de las siguientes:
  - a) una sonda que comprende una secuencia que hibrida específicamente a una junta en la que se inserta un gen ETV1 dentro de un gen MIPOL1; o
  - 30 b) un primer oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen MIPOL1 y un segundo oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen ETV1, oligonucleótidos que amplifican el reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 y un medio para detectar un producto amplificado.
- 35 10. La composición de la reivindicación 9, en la que el medio para detectar un producto amplificado en (b) se selecciona del grupo que consiste en sondas, tinciones intercalantes y oligonucleótidos de amplificación marcados.
11. Uso de una composición que comprende una sonda, comprendiendo dicha sonda una secuencia que hibrida específicamente con una junta en la que un gen ETV1 se inserta dentro de un gen MIPOL1, con el objeto de detectar un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 asociado con cáncer de próstata.
- 40 12. Uso de una composición que comprende:
  - a) una primera sonda que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen MIPOL1; y
  - b) una segunda sonda que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen ETV1,
 con el objeto de detectar un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 asociado con cáncer de próstata.
- 45 13. Uso de una composición que comprende:
  - a) un primer oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen MIPOL1; y
  - b) un segundo oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia que hibrida específicamente con un gen ETV1, oligonucleótidos que amplifican el reordenamiento genético MIPOL1-ETV1; y

c) un medio para detectar un producto amplificado, con el objeto de detectar un reordenamiento genético MIPOL1-ETV1 asociado con cáncer de próstata.

Figura 1

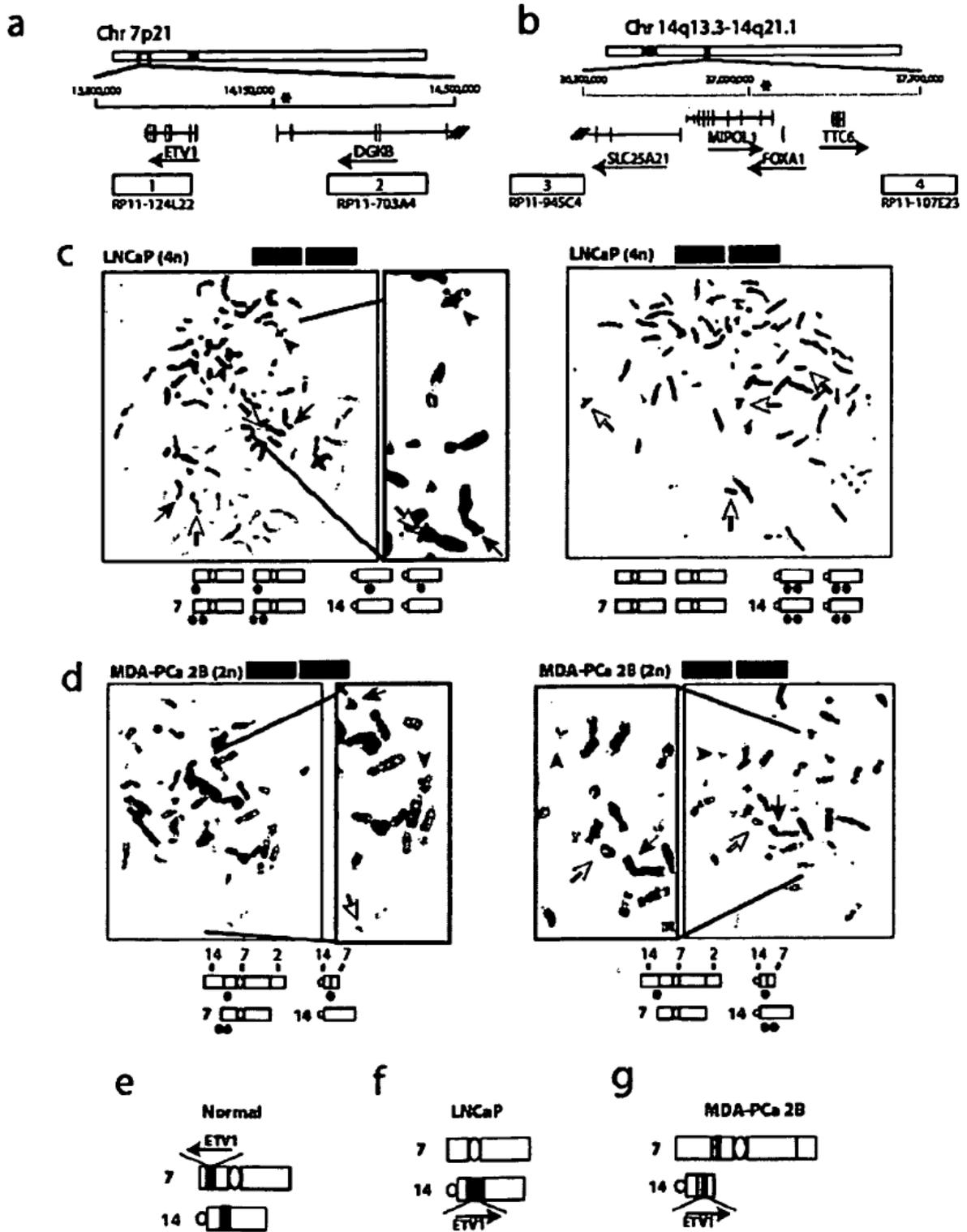


Figura 2

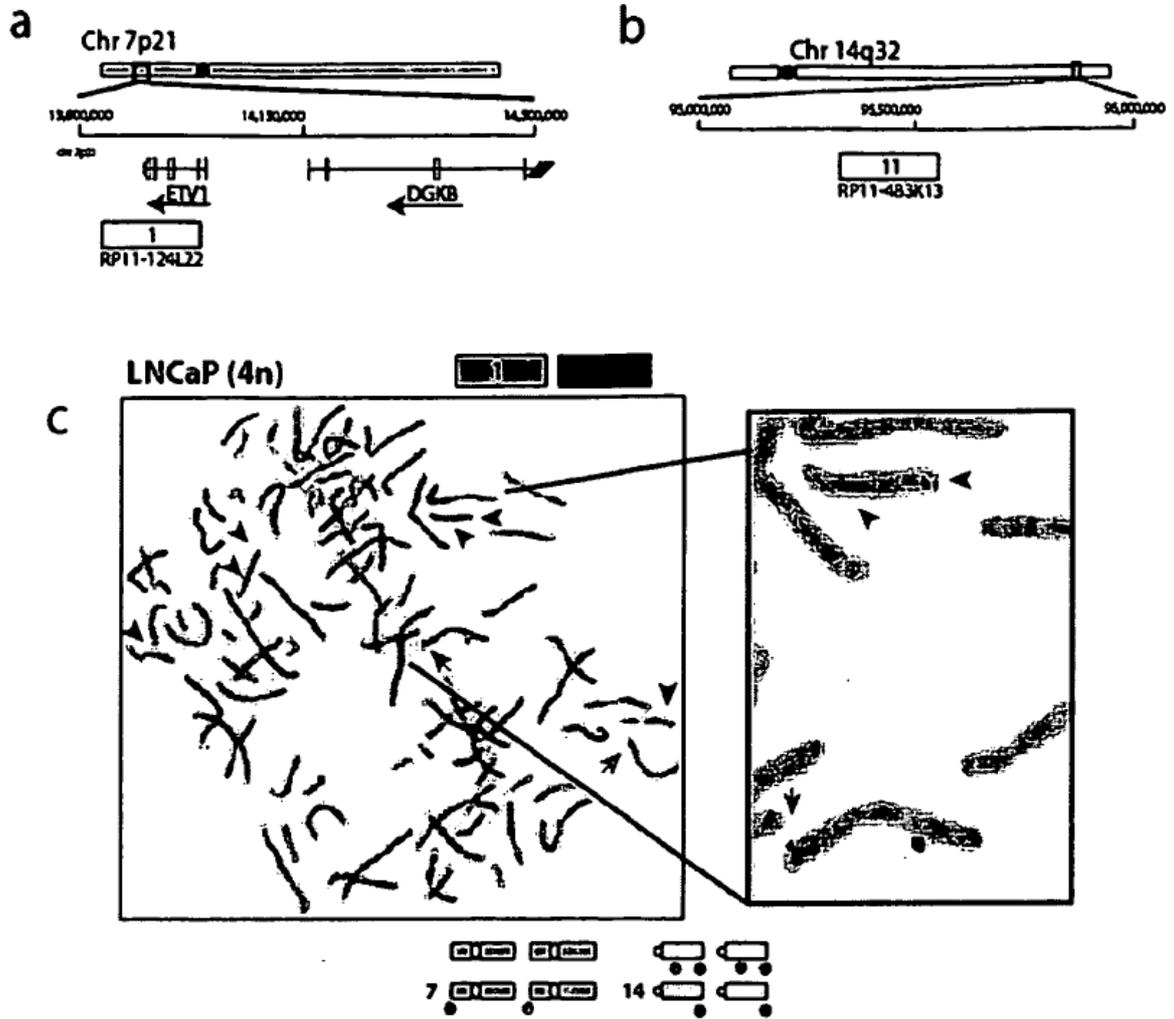


Figura 3

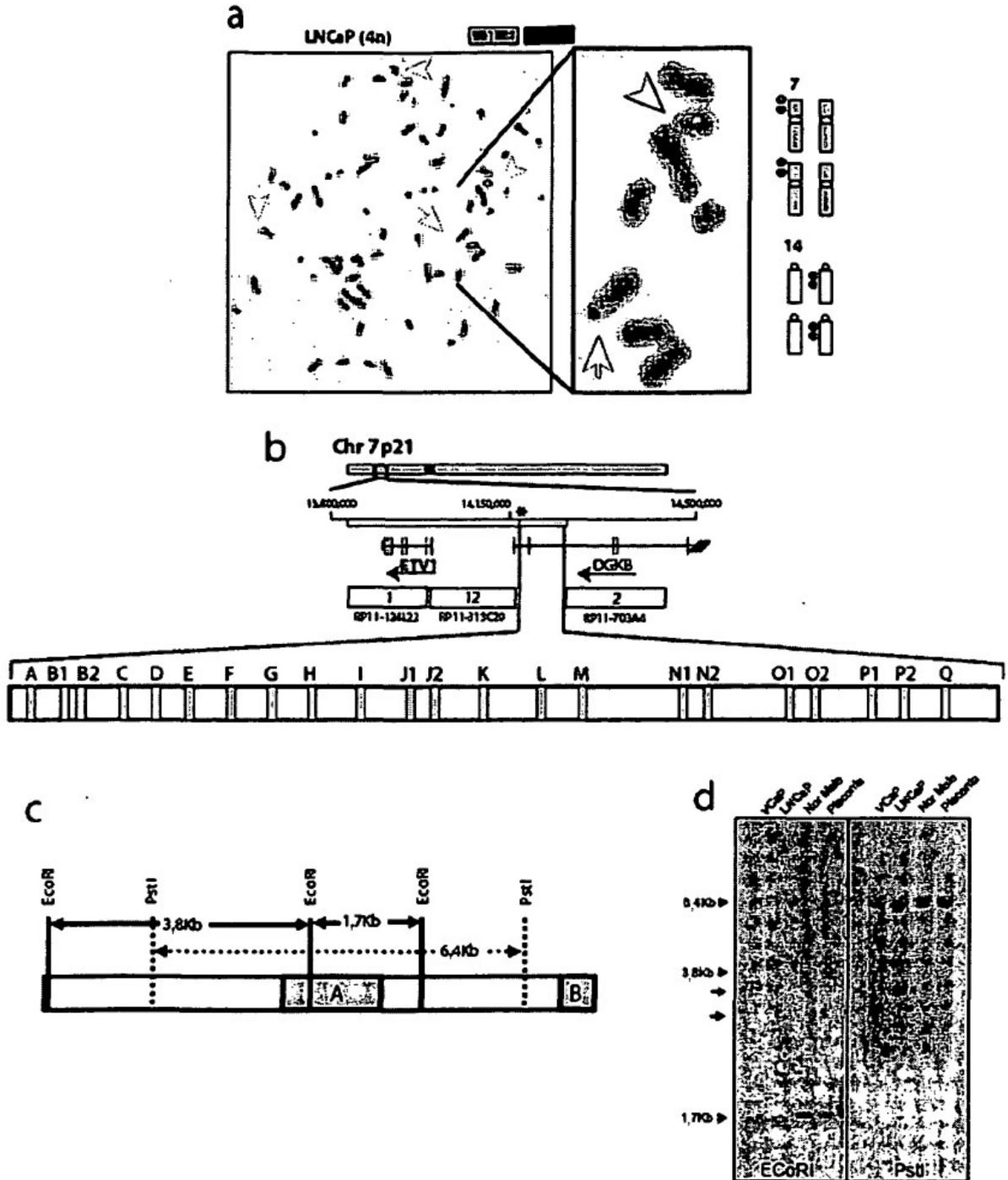


Figura 4

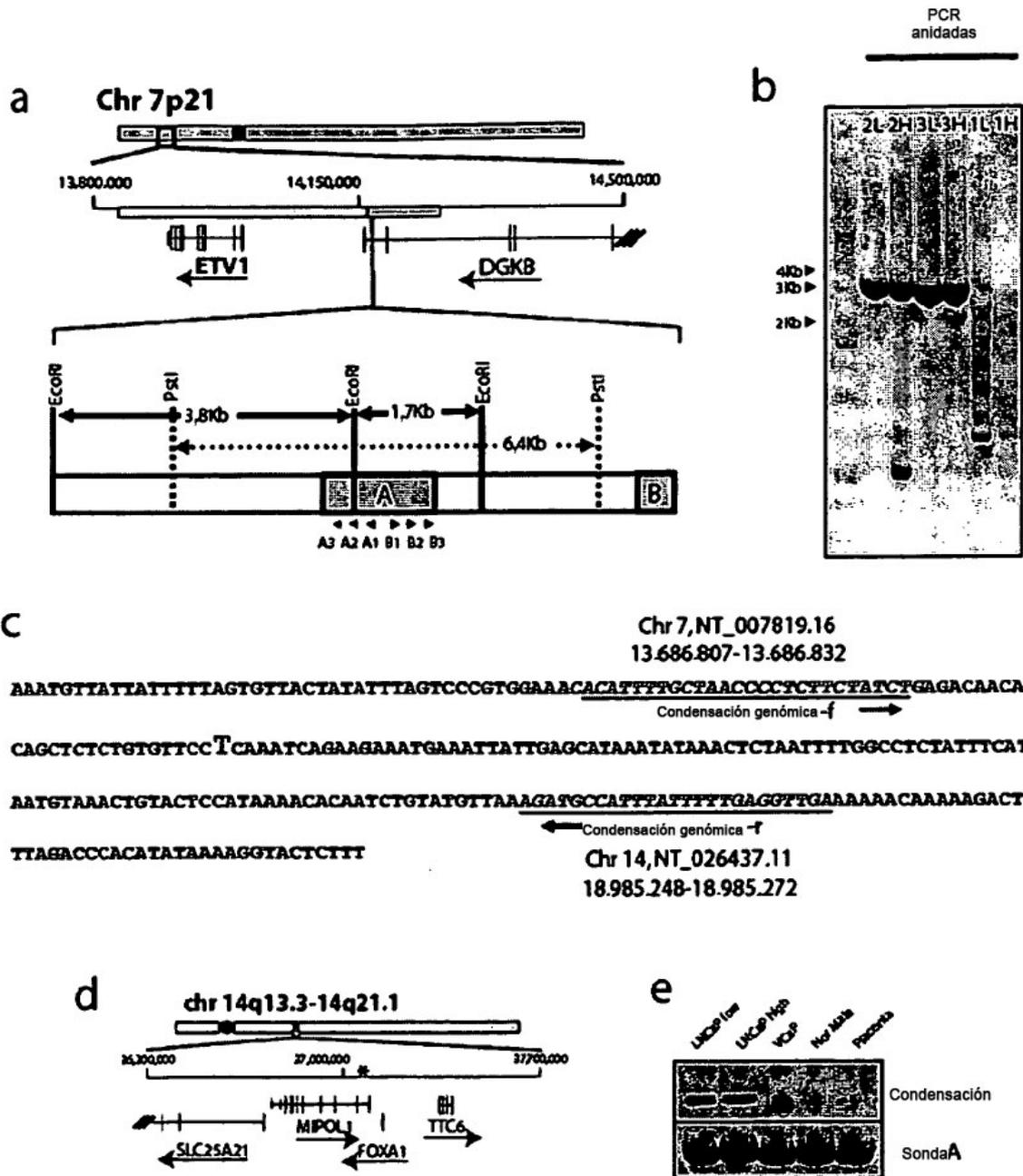


Figura 5

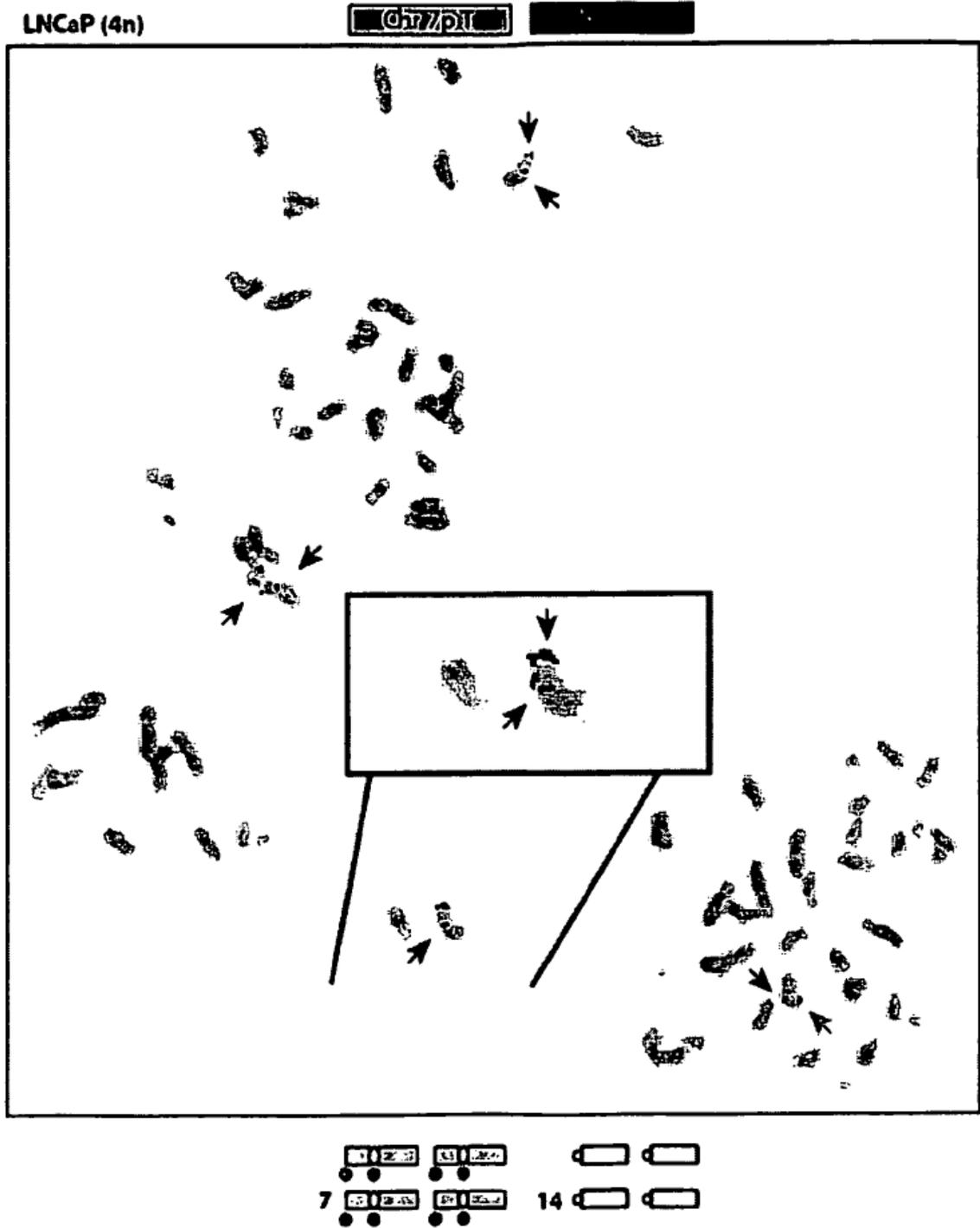


Figura 6

Tomlins y cols. Fig 3

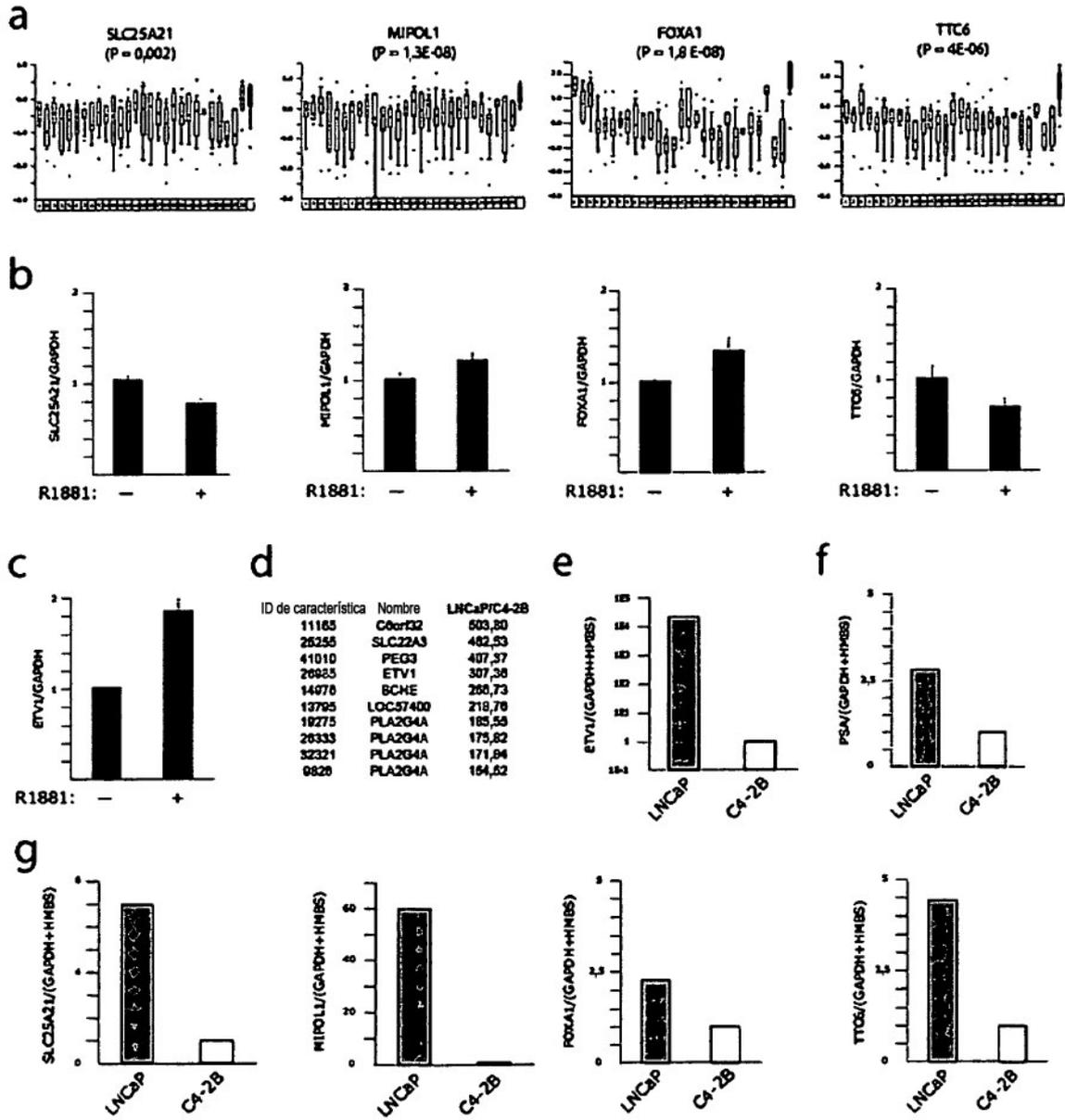


Figura 7

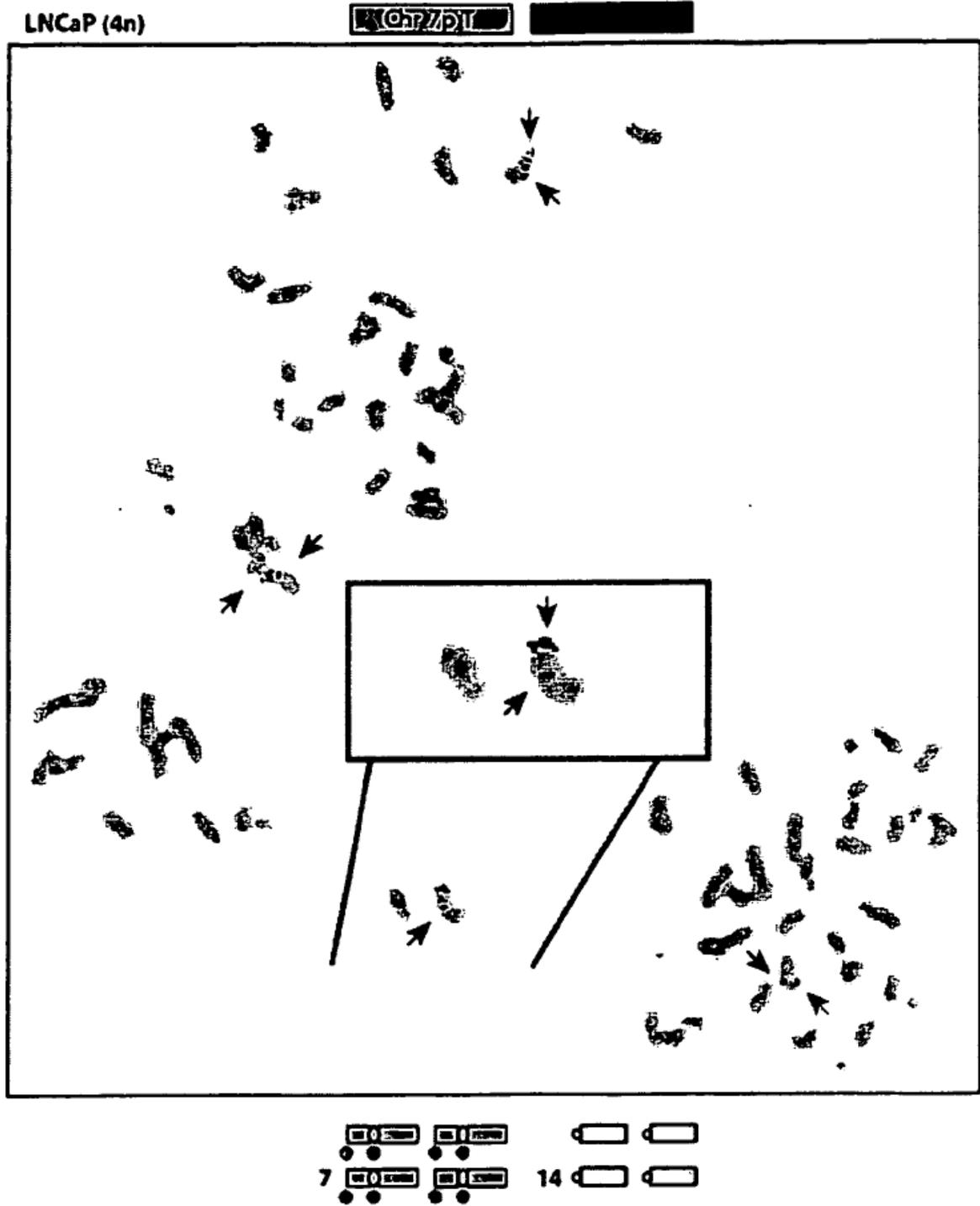


Figura 8

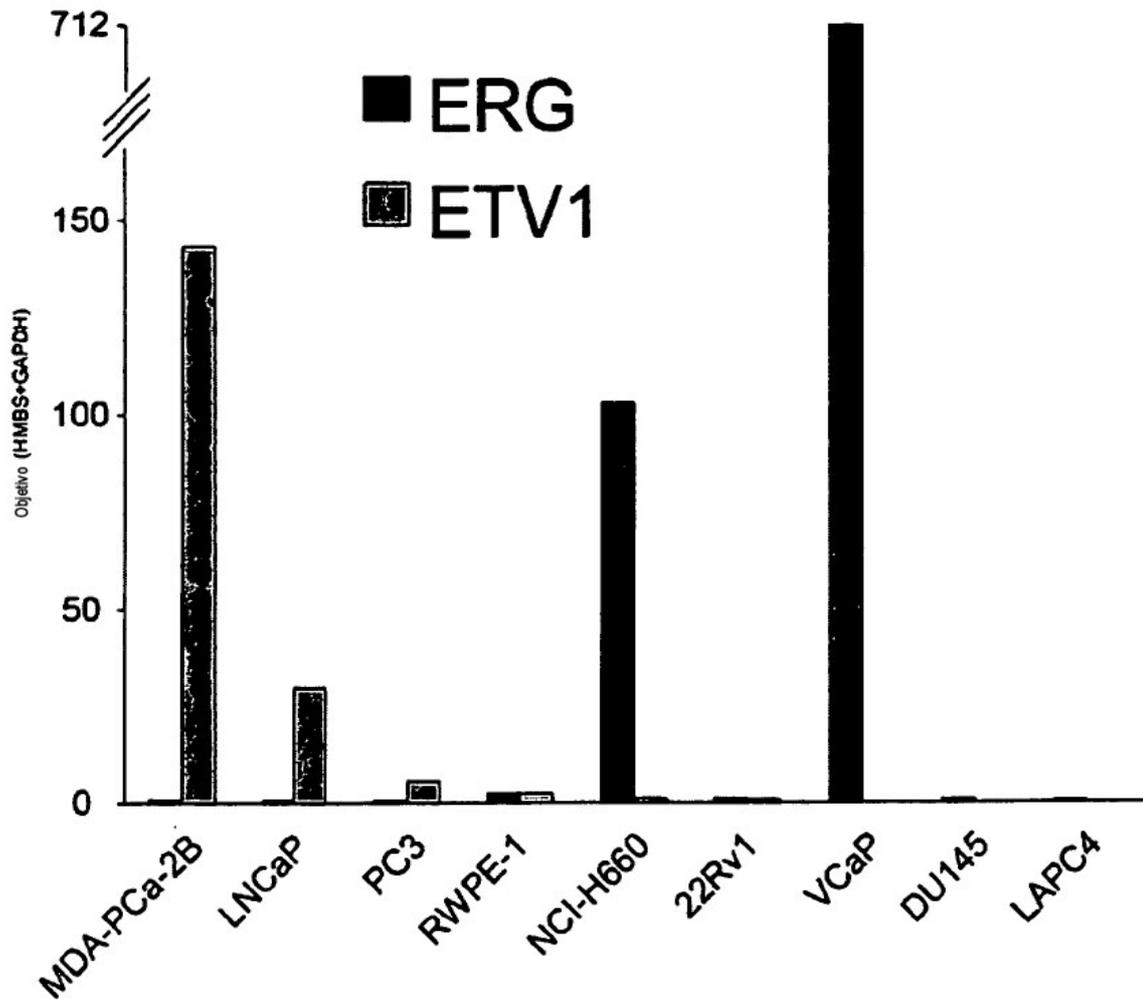


Figura 9

