

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 485**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04763058 .7**  
96 Fecha de presentación: **30.06.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1639138**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Método específico de detección de cáncer de próstata basado en el gen PCA3, y kits para el mismo**

30 Prioridad:  
**30.06.2003 CA 2432365**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.03.2012**

73 Titular/es:  
**Stichting Katholieke Universiteit, The University  
Medical Centre Nijmegen  
Geert Grootplein 10  
6500 HB Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:  
**SCHALKEN, Jack, A.;  
VERHAEGH, Gerald;  
HESELS, Daphne y  
SMIT, Frank**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 377 485 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

Método específico de detección de cáncer de próstata basado en el gen PCA3, y kits para el mismo.

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere, en general, al cáncer de próstata. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente mediante la detección de una secuencia de PCA3, y más en particular un ARN de PCA3, y la secuencia de PCA3 detectada en una muestra del paciente está asociada específicamente al cáncer de próstata. La invención se refiere además a equipos que contienen cebadores de ácido nucleico y sondas de ácido nucleico para realizar un diagnóstico, determinación, o pronóstico en un ser humano que parece cáncer de próstata.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 A lo largo de la última década, el cáncer de próstata se ha convertido en la neoplasia maligna diagnosticada con más frecuencia en hombres, y la segunda causa más destacada de muerte por cáncer en hombres de la población occidental, tras el cáncer de pulmón.

15 La detección y el tratamiento tempranos del cáncer de próstata antes de que se haya propagado desde la glándula de la próstata reduce la mortalidad de la enfermedad. Esto es especialmente cierto para hombres jóvenes, que tienen mayor riesgo de morir por esta neoplasia maligna perniciosa pero de crecimiento lento. Esta comprensión ha estimulado los intentos cada vez mayores de realizar un diagnóstico y tratamiento tempranos. De hecho, la Sociedad Americana del Cáncer y la Asociación Americana de Urología recomiendan que la población masculina en general se someta a una prueba de cribado anual del cáncer de próstata comenzando a los 50 años de edad. La edad recomendada para el cribado se reduce a 40 para hombres que tienen un historial familiar de cáncer de próstata u otros factores de riesgo.

20 Con este interés creciente en el cribado del cáncer de próstata, se están examinando de manera rutinaria más hombres que nunca antes en busca de cáncer de próstata. No es sorprendente que esta práctica haya incrementado la detección temprana del inicio de la enfermedad, tal como se refleja por un incremento aparente de la incidencia del cáncer de próstata y una disminución de la edad media aparente de diagnóstico. La esperanza clínica es que la detección temprana del cáncer de próstata antes de que exista metástasis reducirá la tasa de mortalidad global. Los contribuyentes de la asistencia sanitaria desean el cribado y la detección temprana para que esto se traduzca en una reducción de la carga de la asistencia sanitaria, ya que el tratamiento temprano puede ser menos radical, más eficaz y, por lo tanto, proporcionar un coste menor por cada paciente tratado. La clave para llevar a cabo este objetivo sigue siendo proporcionar mejores herramientas de diagnóstico diferencial.

25 El cribado del cáncer de próstata implica actualmente tanto la palpación de la próstata mediante tacto rectal como el análisis de los niveles plasmáticos del antígeno específico de próstata (PSA). El PSA es una serín proteasa producida por el epitelio prostático que se secreta normalmente en el líquido seminal para licuarlo. La alteración de la integridad anatómica de la glándula prostática puede afectar a las barreras celulares que limitan normalmente el PSA al interior del sistema de conductos de la próstata, lo que permite que se disperse a la sangre o la orina. Varias afecciones pueden dar como resultado el escape del PSA a la sangre. Estas incluyen la inflamación de la próstata, retención urinaria, infección prostática, hiperplasia prostática benigna, y cáncer de próstata. La manipulación física de la próstata también puede incrementar los niveles séricos de PSA, pero un estímulo suave, tal como un tacto rectal (TR), no incrementa normalmente el PSA sérico. Por lo tanto, no es sorprendente que el cribado del PSA sérico como indicador del cáncer de próstata no tenga un valor de diagnóstico absoluto.

30 A pesar del hecho de que la medida de los niveles sanguíneos de PSA puede ser el resultado de una diversidad de causas diferentes, aun así es la base del cribado primario del cáncer de próstata. La medida del PSA total (tPSA) como ensayo de diagnóstico para predecir el cáncer de próstata se ha estado utilizando desde 1991. Los niveles de 4 ng/ml o mayores en suero sanguíneo se consideran anormales y con valor de pronóstico de cáncer de próstata. Sin embargo, la sensibilidad de tales niveles elevados de tPSA es solamente del 79%; por lo que se deja sin detectar un 21% de pacientes con cáncer de próstata. La especificidad para todos los valores de tPSA de 4 ng/ml o más es muy escasa. Además, se ha informado que las estimaciones de especificidad para los niveles de tPSA > 4,0 ng/ml están en el intervalo del 20% al 59%, con una media de alrededor del 33%. La gran mayoría de falsos positivos se demuestra finalmente que son hiperplasias prostáticas benignas. La especificidad es la más baja para el tPSA moderadamente elevado, en la denominada zona gris de 4 a 10 ng/ml. Este nivel bajo de especificidad da como resultado otros procedimientos de diagnóstico más invasivos y costosos, tales como ultrasonido transrectal y biopsias de próstata. Tales pruebas son innecesarias, y también muy traumáticas para el paciente. Tampoco se debería subestimar el impacto psicológico de haber recibido un diagnóstico positivo hasta que se demuestra que es un falso positivo.

55 Debido a las desventajas del tPSA, la investigación se ha centrado en intentar desarrollar derivados de PSA para incrementar la sensibilidad y especificidad de esta aproximación de diagnóstico general.

Una modificación es el PSA libre (fPSA), que fue aprobado por la FDA en 1998. El PSA en el suero se puede hallar

en una forma sin unir o complejo con inhibidores de proteasas circulantes, de manera más habitual con alfa-1-antitripsina (ACT). Los médicos han demostrado que la proporción de PSA unido a ACT era significativamente mayor en hombres con cáncer de próstata que en hombres sin afectación, o en aquellos con hipertrofia prostática benigna (BPH). Como directriz, si el 25% o menos del PSA total está libre, esto es un indicador de un posible cáncer de próstata. El análisis del fPSA se aprobó para el uso en hombres con tPSAs de 4 a 10 ng/ml. Así, el análisis de fPSA se situó para mejorar la especificidad respecto de la del tPSA solo. Sin embargo, la capacidad de predicción del análisis de fPSA no es tan buena en personas con niveles de tPSA realmente bajos o realmente altos. El tPSA muy bajo, independientemente del fPSA medido, tiene valor pronóstico de no tener cáncer, mientras lo contrario es cierto con niveles muy elevados de tPSA. La utilidad diagnóstica del fPSA es relativamente limitada, ya que puede estar asociada a BPH o cáncer de próstata. Se ha demostrado que el uso de fPSA en combinación con tPSA reduce el número de biopsias innecesarias en alrededor de un 20%.

Evidentemente, la biopsia de próstata es el método de referencia para confirmar el cáncer de próstata. Sin embargo, incluso una biopsia no es segura al 100%. El método de referencia es la biopsia sextante, en la que la recogida de muestras de tejido se guía mediante ultrasonido transrectal. A menudo, las seis muestras no detectan el cáncer, y es necesario un segundo procedimiento de biopsia o más de seis muestras.

A pesar de las mejoras en el cribado del cáncer de próstata que han surgido en los últimos diez años, sigue existiendo una gran necesidad insatisfecha en cuanto a la sensibilidad y especificidad del diagnóstico, incluso cuando estas herramientas se usan en combinación. Uniendo esto a la gran incidencia del cáncer de próstata y a la necesidad de una detección temprana y precisa, el potencial de una auténtica herramienta de diagnóstico diferencial es muy significativo.

Hace unos años se descubrió un nuevo marcador de cáncer de próstata, PCA3, mediante un análisis de expresión diferencial destinado a destacar los genes asociados al desarrollo de cáncer de próstata (documentos USN 09/402.713; 09/675.650; 09/996.953; 60/445.436; WO 98/45420; y WO 01/23550). PCA3 está localizado en el cromosoma 9, y está compuesto de cuatro exones. Codifica al menos cuatro transcritos diferentes que se generan mediante corte y empalme alternativo y poliadenilación. Mediante análisis de RT-PCR, se descubrió que la expresión de PCA3 se limitaba a la próstata y no existía en todos los demás tejidos, lo que incluye testículo, ovario, mama y vejiga. El análisis mediante transferencia de Northern demostró que PCA3 se expresa de manera elevada en la gran mayoría de tumores de próstata examinados (47 de 50), mientras que no se detecta expresión, o se detecta una expresión muy baja, en la hiperplasia prostática benigna o en las células de próstata normales de los mismos pacientes [Cancer Res., 1999. 1 de dic.: 59(23):5975-9]. Además, un estudio reciente que compara el rendimiento clínico del ARN de telomerasa RT y la detección de ARN de PCA3 en el caso del cáncer de próstata demostró que el gen de PCA3 se puede considerar un marcador mejor [Cancer Res., 2002. 1 de mayo; 62(9):2695-8].

El gen de PCA3 está compuesto de 4 exones (e1-e4) y 3 intrones (i1-i3). Aunque PCA3 parece reconocerse como el mejor marcador de cáncer de próstata identificado hasta ahora, esta especificidad se ha rebatido en la bibliografía. Por ejemplo, Gandini et al. 2003, reivindica que la expresión específica de próstata de PCA3 se limita a la del exón 4 del gen de PCA3. Además, el uso de PCA3 como marcador de cáncer de próstata también se ha visto dificultado por la incapacidad de diferenciar los ácidos nucleicos de PCA3 específicos de cáncer de próstata y de PCA3 expresados en tejidos que no son de próstata [Bussemakers et al., 1999; de Kok et al., 2002; y Hessels et al., 2003].

Así, sigue existiendo la necesidad de aclarar la cuestión de la especificidad del marcador PCA3 y proporcionar herramientas que identificarán específicamente las secuencias de PCA3 asociadas al cáncer de próstata.

La presente invención busca cumplir estas y otras necesidades.

A la vista del hecho de que el cáncer de próstata avanzado sigue siendo una enfermedad potencialmente mortal que afecta a una proporción muy significativa de la población masculina, sigue existiendo la necesidad de proporcionar los métodos y equipos de detección del cáncer de próstata más específicos, selectivos y rápidos.

La presente invención busca cumplir estas y otras necesidades.

Además, el uso de PCA3 como marcador de cáncer de próstata también se ha visto dificultado por la incapacidad de diferenciar los ácidos nucleicos de PCA3 específicos de cáncer de próstata y de PCA3 expresados en tejidos que no son de próstata [Bussemakers et al., 1999; de Kok et al., 2002; y Hessels et al., 2003].

### **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos de diagnóstico y equipos que detectan el cáncer de próstata de una manera más específica y selectiva que los métodos y equipos de la técnica anterior.

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo in vitro, ex vivo, o in vivo.

Un objetivo de esta invención es describir un método para detectar el cáncer de próstata en un paciente, y en especial en una muestra de orina detectando el ARN de PCA3 que está asociado al cáncer de próstata.

La invención describe un método in vitro para diagnosticar o pronosticar el cáncer de próstata en un paciente que comprende amplificar un ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme que carece de al menos un intrón de una muestra de orina de un paciente mediante el uso de un par de cebadores, en el que un cebador es específico para una unión exón-exón de PCA3, y detectar un producto de amplificación derivado del mismo, en el que dicho producto de amplificación está asociado a la presencia de cáncer de próstata o a la predisposición a él en dicho paciente.

En una realización particular, el ácido nucleico de PCA3 que se identifica está asociado a un estado prostático maligno y no está asociado a un estado prostático que no es maligno. En una realización particular, el ácido nucleico de PCA3 es mARN de PCA3. Tal como se describe en la presente memoria, la muestra es cualquier muestra de un paciente que contiene una célula prostática o ácido nucleico de la misma en una cantidad suficiente para permitir su amplificación, y su detección. En una realización particular, el ácido nucleico de PCA3 detectado es un mARN de PCA3 asociado al cáncer de próstata, y la muestra es una muestra de orina.

En una realización particular, la presente invención se refiere a un método para determinar el cáncer de próstata en un paciente, detectando en una muestra de orina la presencia de ARN de PCA3 que no contiene un intrón. En una realización de la presente invención, el ARN de PCA3 que se detecta es un ARN sometido a corte y empalme que carece de un intrón (i3) entre los exones 3 y 4. En otra realización particular de la presente invención, el ARN de PCA3 que se detecta es un ARN sometido a corte y empalme que carece de intrones entre el exón 1 y el exón 3. En una realización especialmente preferida de la presente invención, el ARN de PCA3 que se detecta es un ARN sometido a corte y empalme que carece de intrones entre el exón 1 y el exón 4. En una realización especialmente preferida de la presente invención, el ARN de PCA3 que se detecta es un ARN sometido a corte y empalme que carece de al menos un intrón (p.ej. i1 entre los exones 1 y 2 y/o i3 entre los exones 3 y 4). En una realización, se selecciona como objetivo específicamente y se detecta un ARN de PCA3 que carece de al menos un primer intrón entre los exones 1 y 2. En otra realización, el ARN de PCA3 que se detecta carece de un intrón (i3) entre los exones 3 y 4. En otra realización particular, la secuencia detectada de PCA3 es un ARN de PCA3 sin intrones.

Tal como se describe en la presente memoria, el ARN específico de cáncer de próstata codificado por el gen de PCA3 (es decir, ARN) se puede detectar mediante el uso de un método de amplificación que amplifica una segunda secuencia específica de próstata (que no tiene que estar asociada al cáncer de próstata) también contenida en la muestra. Se pueden usar varias segundas secuencias específicas de próstata con tal de que puedan servir como control para el ARN de próstata. Los ejemplos no limitantes de tales secuencias específicas de próstata incluyen PSA (en este caso una secuencia específica de próstata asociada a menudo con el cáncer de próstata), y otros miembros de la familia de calicreínas. La amplificación de las secuencias de ARN de PCA3 específicas de cáncer de próstata, las secuencias y las secuencias específicas de próstata se puede llevar a cabo simultáneamente. La amplificación de PCA3 y la segunda secuencia específica de próstata se puede llevar a cabo en la misma mezcla de reacción o en diferentes mezclas de reacción, y de manera simultánea o no.

La invención proporciona un método para detectar ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata en una muestra.

En una realización, la presente invención se refiere a un método (y a equipos para el mismo; con respecto a los componentes específicos del equipo, véase más adelante) para diagnosticar o pronosticar el cáncer de próstata en un paciente, que comprende la detección de un ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme del paciente, que carece de al menos un intrón, en una muestra de orina de un paciente, que comprende al menos un par de cebadores que están diseñados para posibilitar la amplificación del ARN de PCA3, en el que un cebador es específico para una unión exón-exón del PCA3 y en el que el ARN de PCA3 está asociado a la presencia de cáncer de próstata o a la predisposición a él en el paciente. En la presente invención, el ARN de PCA3 carece de al menos un intrón. Se conocen numerosos métodos de detección sensibles de ácidos nucleicos, y se pueden adaptar de acuerdo con el tipo de muestra, la sensibilidad de la detección, la cantidad de ácido nucleico de PCA3, y similares. Tal como se describe en la presente memoria, la detección se efectúa con una sonda diseñada a partir de las secuencias mostradas en la presente memoria, y puede abarcar una unión exón-exón de dicho ARN de PCA3. La sensibilidad del método (y del equipo para el mismo) se puede incrementar llevando a cabo además una amplificación del ácido nucleico de PCA3. Se pueden usar numerosos métodos de amplificación. Muchos de ellos se describen en la presente memoria. En una realización particular, se amplifica ácido nucleico de PCA3, y preferiblemente ARN de PCA3 mediante el uso de un cebador que hibrida a una secuencia exónica del mismo. En una realización adicional, la detección del ADN de PCA3 es una detección de un ARN que carece de más de un intrón. Como se describe en la presente memoria, se lleva a cabo normalmente, pero no necesariamente, después de una amplificación, en la que se puede usar una o más sondas para detectar PCA3 que selecciona como objetivo una unión exón-exón. Los equipos que permiten tales métodos también están dentro del alcance de la presente invención. Las permutaciones para utilizar cebadores en las diferentes uniones de exones, para usar sondas en una o más uniones de exones, o para detectar ARN de PCA3 que carece de cierto intrón, más de uno, etc., se enseñan en la presente memoria, así como los métodos para incrementar la sensibilidad, para capturar el ácido nucleico, y similares, se enseñan o se ejemplifican en la presente memoria.

La invención también proporciona equipos para detectar la presencia de ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme que carece de al menos un intrón en una muestra de orina en un paciente, que comprende al menos un par de cebadores que están diseñados para permitir la amplificación del ARN de PCA3, en

5 el que un cebador es específico para una unión exón-exón de PCA3. Tal como se describe en la presente memoria, el equipo de diagnóstico puede comprender al menos un primer recipiente que contiene un par de cebadores que pueden amplificar el ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata anteriormente descrito (p.ej. ARN). El equipo de diagnóstico puede comprender además un primer recipiente que contiene un par de cebadores que pueden amplificar el ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata anteriormente mencionado y un segundo recipiente que contiene un par de cebadores que pueden amplificar la segunda secuencia específica de próstata anteriormente mencionada. Tal como se describe en la presente memoria, el equipo de diagnóstico puede comprender además un tercer recipiente que contiene una sonda que hibrida de manera específica al producto de amplificación de PCA3. La sonda incrementa adicionalmente la especificidad del método, hibridando específicamente a una unión exón-exón elegida de PCA3. Se puede incluir un cuarto recipiente que contiene una sonda para otra región de PCA3 y/o para la segunda secuencia específica de próstata. El equipo puede comprender además reactivos para incrementar la sensibilidad de la detección. El equipo puede contener además reactivos que permiten la amplificación y la detección en tiempo real.

15 La invención, así, proporciona además un método para diagnosticar la presencia o predisposición a desarrollar un cáncer de próstata en un paciente que carece de al menos un intrón en un paciente, que comprende al menos un par de cebadores que están diseñados para permitir la amplificación del ARN de PCA3, en el que un cebador es específico para una unión exón-exón de PCA3.

En otra realización, el ARN codificado por el gen de PCA3 se obtiene de una célula contenida en una muestra de orina evacuada por el paciente.

20 Tal como se describe en la presente memoria, el ARN se puede detectar mediante el uso de un método de amplificación de ARN. El método de amplificación de ARN se puede acoplar a la detección en tiempo real de los productos amplificados mediante el uso de sondas específicas fluorescentes. En una realización, el método de amplificación es la PCR. La PCR puede ser PCR en tiempo real o un método relacionado que permite una detección en tiempo real de los productos amplificados.

25 La muestra de orina se puede obtener tras un tacto rectal (TR) atento. Por supuesto, se debería entender que los métodos y equipos presentes también se podrían usar con una muestra de orina obtenida sin tacto rectal; o en otros tipos de muestras tales como esperma, orina y esperma mezclados (primera muestra de orina tras una eyaculación), con tal de que el método de amplificación y/o el método de detección sean lo suficientemente sensibles para detectar los marcadores seleccionados como objetivo (PCA3 y, cuando se desee, el segundo marcador). Los experimentos demostraron que los métodos y equipos como los descritos en la presente memoria se podrían llevar a cabo también con estos tipos de muestras, que incluyen sangre o suero.

Las células recogidas de la muestra de orina se pueden recoger, y se lleva a cabo una extracción de ácido nucleico total.

35 La extracción de ácido nucleico total se puede llevar a cabo mediante el uso de un método de bandas en fase sólida con microesferas de sílice como describió BOOM et al. Por supuesto, se debería entender que existen numerosos métodos de extracción de ácido nucleico y, así, se podrían usar otros métodos de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo no limitante es un método de extracción con fenol/cloroformo. Se describen otros métodos similares en el libro de texto al que se hace referencia en la presente memoria.

40 El ARN codificado por un gen de PCA3 se puede detectar mediante un método de amplificación de ARN in vitro denominado amplificación basada en ácido nucleico (NASBA). Por supuesto, se conocen otros métodos de amplificación de ARN, y los métodos y equipos presentes no se limitan, por tanto, a NASBA. Los ejemplos no limitantes de tales métodos de amplificación de ARN incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediada por transcriptasa (TMA) y reacción en cadena de la ligasa (LCR).

45 Los productos amplificados se pueden detectar en fase homogénea mediante el uso de una sonda fluorescente con el uso de la aproximación de balizas moleculares. En otra realización, el producto se detecta en fase sólida mediante el uso de un método fluorescente o colorimétrico. Se debería entender que se pueden usar numerosos métodos fluorescentes, colorimétricos o enzimáticos de acuerdo con la presente invención para detectar y/o cuantificar los ARNs seleccionados como objetivo. Tales métodos fluorescentes, colorimétricos o enzimáticos se conocen bien en la técnica.

50 Una persona de experiencia habitual debería entender que se pueden usar numerosos métodos estadísticos en el contexto de la presente invención para determinar si el ensayo es positivo o negativo.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción siguiente.

## **DEFINICIONES**

55 En la descripción siguiente, se utilizan con frecuencia varios términos utilizados en las técnicas de ADN. Para

proporcionar un entendimiento claro y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, lo que incluye el alcance dado a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

5 A menos que se definan de otra manera, los términos y la nomenclatura científica y tecnológica usada en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona de experiencia habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Las definiciones entendidas habitualmente de términos de biología molecular se pueden hallar, por ejemplo, en el Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2ª ed. (Singleton et al., 1994, John Wiley & Sons, Nueva York, NY), The Harper Collins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, Nueva York, NY), Rieger et al, Glossary of genetics: Classical and molecular, 5ª edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1991; Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4ª edición, Garland Science, Nueva York, 2002; y 10 Lewin, Genes VII, Oxford University Press, Nueva York, 2000. En general, los procedimientos de cultivos celulares, infección, métodos de biología molecular y similares son métodos habituales usados en la técnica. Tales técnicas habituales se pueden hallar en manuales de referencia tales como, por ejemplo, Sambrook et al. (2000, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratories); y Ausubel et al. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

15 El uso de la palabra "un" o "una", cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

A lo largo de esta solicitud, la expresión "alrededor de" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error por el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor. De manera rutinaria, 20 una desviación del 10% al 15%, preferiblemente del 10%, está dentro del alcance de la expresión "alrededor de".

Molécula de Ácido Nucleico Aislada. Una "molécula de ácido nucleico aislada", tal como se entiende y se usa en general en la presente memoria, se refiere a un polímero de nucleótidos, e incluye, pero no debería limitarse a, ADN y ARN. La molécula de ácido nucleico "aislada" se purifica a partir de su estado natural *in vivo*.

25 Segmento de ADN. Un segmento de ADN, tal como se entiende y se usa en general en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende un tramo lineal de nucleótidos en el que los nucleótidos están presentes en una secuencia que puede codificar, por medio del código genético, una molécula que comprende una secuencia lineal de residuos de aminoácidos a la que se hace referencia como una proteína, un fragmento de proteína o un polipéptido.

30 Gen. Una secuencia de ADN relacionada con una única cadena polipeptídica o proteína, y tal como se usa en la presente memoria incluye los extremos 5' y 3' sin traducir. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia de tamaño completo o por cualquier porción de la secuencia codificante, con tal de que se mantenga la actividad funcional de la proteína.

ADN Complementario (cADN). Moléculas de ácido nucleico recombinantes sintetizadas mediante transcripción inversa del ARN mensajero ("ARN").

35 Gen Estructural. Una secuencia de ADN que se transcribe a ARN que después se traduce a una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

40 Electroforesis en Gel de Agarosa. La técnica utilizada más habitualmente (aunque no la única) para el fraccionamiento de ADN bicatenario es la electroforesis en gel de agarosa. El principio de este método es que las moléculas de ADN migran a través del gel como si fuera una criba, que retrasa el movimiento de las moléculas más grandes en mayor medida y el movimiento de las moléculas más pequeñas en menor medida. Obsérvese que cuanto menor es el fragmento de ADN, mayor es la movilidad en la electroforesis en el gel de agarosa.

45 Los fragmentos de ADN fraccionados mediante la electroforesis en gel de agarosa se pueden visualizar directamente mediante un procedimiento de tinción si el número de fragmentos incluidos en el patrón es pequeño. Para visualizar un grupo pequeño de estos fragmentos, se puede aplicar una metodología denominada procedimiento de hibridación de Southern.

50 Procedimiento de Transferencia de Southern. El propósito del procedimiento de transferencia de Southern (también denominado transferencia) es transferir físicamente ADN fraccionado mediante electroforesis en gel de agarosa a un papel de filtro de nitrocelulosa u otra superficie o método adecuado, a la vez que se mantienen las posiciones relativas de los fragmentos de ADN resultantes del procedimiento de fraccionamiento. La metodología usada para llevar a cabo la transferencia desde el gel de agarosa hasta la nitrocelulosa implica retirar el ADN desde el gel hasta el papel de nitrocelulosa mediante acción capilar.

55 Hibridación de Ácido Nucleico. La hibridación del ácido nucleico depende del principio de que dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias que tienen secuencias de bases complementarias restituirán la estructura bicatenaria favorecida termodinámicamente si se mezclan en condiciones adecuadas. La estructura bicatenaria se formará entre dos ácidos nucleicos monocatenarios complementarios incluso si uno está inmovilizado en un filtro de nitrocelulosa. En el procedimiento de hibridación de Southern, se da esta última situación. Como se indicó previamente, el ADN del

individuo a analizar se digiere con una endonucleasa de restricción, se fracciona mediante electroforesis en gel de agarosa, se convierte en la forma monocatenaria, y se transfiere a papel de nitrocelulosa, por lo que queda disponible para la hibridación con la sonda de hibridación. Se pueden encontrar ejemplos de condiciones de hibridación en Ausubel, F.M. et al., *Current protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY (1989). Se incuba un filtro de nitrocelulosa durante la noche a 42 °C con una sonda marcada en una disolución que contiene un 50% de formamida, (o a 68 °C sin formamida) a concentración salina elevada (SSC 5x [20X: NaCl 3 M/citrato trisódico 0,3 M] o SSPE 5X [20X: NaCl 3,6 M/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M/EDTA 0,02 M, pH 7,7]), disolución de Denhardt 5X, 1% de SDS, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Esto va seguido por varios lavados en SSC 0,2X/0,1% de SDS a una temperatura seleccionada basada en la rigurosidad deseada: temperatura ambiente (rigurosidad baja), 42 °C (rigurosidad moderada) o 68 °C (rigurosidad elevada). La temperatura seleccionada se determina basándose en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido de ADN. También se puede usar formamida en los lavados, y la temperatura se adapta de acuerdo con la T<sub>m</sub> deseada.

Sonda de Hibridación. Para visualizar una secuencia de ADN particular en el procedimiento de hibridación de Southern (p.ej., un producto de amplificación), una molécula de ADN o sonda de hibridación marcada se hace reaccionar con el ADN fraccionado unido al filtro de nitrocelulosa. Las áreas del filtro que portan secuencias de ADN complementarias a la sonda de ADN marcada quedan marcadas ellas mismas como consecuencia de la reacción de hibridación. Las áreas del filtro que exhiben tal marcaje se visualizan. La sonda de hibridación se produce en general mediante clonación molecular de una secuencia de ADN específica. En una realización particular, la sonda abarca la región de 3' de un primer exón y la región de 5' de un segundo exón, de forma que tal sonda puede detectar solamente el producto de amplificación si el primer exón y el segundo exón se han sometido a corte y empalme en una posición contigua (es decir, mediante la eliminación de la secuencia intrónica intermedia). Conociendo las secuencias de los límites de los exones, así como las de los diferentes exones (véase más adelante), los numerosos cebadores y sondas que se pueden diseñar y usar en el contexto de la presente invención pueden ser determinados fácilmente por una persona de experiencia habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Oligonucleótido, Oligómero u Oligo. Una molécula compuesta de dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función o la utilidad final del oligonucleótido. Se puede obtener un oligonucleótido de manera sintética o mediante clonación. Las quimeras de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos también pueden estar dentro del alcance de la presente invención.

Amplificación de Secuencias. Un método para generar grandes cantidades de una secuencia objetivo. En general, uno o más cebadores de amplificación se hibridan a una secuencia de ácido nucleico. Mediante el uso de enzimas adecuadas, se amplifican las secuencias halladas adyacentes a, o entre, los cebadores.

Cebador de Amplificación. Un oligonucleótido que es capaz de hibridar en posición adyacente a una secuencia objetivo y servir como un punto de inicio para la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se inicia la síntesis de un producto de prolongación del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico.

Molécula de ácido nucleico inversa. Una "molécula de ácido nucleico inversa" se refiere en la presente memoria a una molécula capaz de formar una molécula doble o triple estable con una porción de su secuencia de ácido nucleico seleccionada como objetivo (ADN o ARN). El diseño y la modificación de las moléculas de ácido nucleico inversas se conoce bien en la técnica, como se describió, por ejemplo, en los documentos WO 96/32966, WO 96/11266, WO 94/15646, WO 93/08845, y la patente de EE.UU. 5.593.974. Las moléculas de ácido nucleico inversas, como los oligos directos, se pueden obtener de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención y modificarse de acuerdo con métodos muy conocidos. Por ejemplo, algunas moléculas inversas (u oligos o secuencias directas) se pueden diseñar para que sean más resistentes a la degradación, o, si es necesario, para incrementar su afinidad hacia su secuencia seleccionada como objetivo, para afectar a su transporte hacia tipos de células o compartimentos celulares elegidos, y/o para aumentar su solubilidad en lípidos mediante el uso de análogos de nucleótidos y/o sustituir fragmentos químicos elegidos de las mismas, como se conoce habitualmente en la técnica. El gen de PCA3 también se ha descrito como DD3<sup>PCA3</sup>, cuya secuencia se halla también con el número de acceso de GenBank AF103907.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Habiendo descrito así en general la invención, a continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos, que muestran a modo de ilustración una realización preferida de la misma, y en los que:

Figura 1: Expresión de PCA3 en varios tejidos humanos mediante el uso de 32 ciclos de RT-PCR específica de PCA3 con los cebadores siguientes: directo 5'-CAGGAAGCACAAAAGGAAGC-3' (SEQ ID N°:3) e inverso 5'-TCCTGCCATCCTTTAAGG-3' (SEQ ID N°:4). Se han analizado los siguientes tejidos: próstata normal (1), cáncer de próstata (2), testículo (3), corazón (4), pulmón (5), arteria (6), riñón (7), hígado (8), cáncer de mama (9), mama normal (10), cuello del útero (11), endometrio (12), ovario (13), y cáncer de riñón (14). La punta de flecha indica el transcrito de PCA3 sometido a corte y empalme (151 pbs) en muestras de próstata solamente, y la flecha indica el transcrito no sometido a corte y empalme (378 pbs) en los otros tejidos. Obsérvese que las señales en los carriles 1

y 2 están saturadas. Se llevó a cabo una PCR de beta-2-microglobulina como control (panel inferior).

Figura 2: Representación esquemática de la unidad de transcripción de PCA3. Los recuadros indican los cuatro exones de PCA3; la punta de flecha oscura indica el promotor de PCA3 específico de próstata, y las flechas indican los diferentes (*supuestos*) transcritos de PCA3.

- 5 Figura 3: Expresión de PCA3 mediante RT-PCR. Se monitorizó la expresión de PCA3 en varios tejidos humanos mediante el uso de 32 ciclos de RT-PCR específica de PCA3. Se usaron diferentes cebadores. Se indica la posición de los mismos con respecto a la secuencia de PCA3 descrita en GenBank con el número de acceso AF103907:

Cebadores directos:

- 10 BUS 1 (AGAAGCTGGCATCAGAAAAA, SEQ ID N°: 12; exón 1, pos. 23-42); AH1 (CAGGAAGCACAAAAGGAAGC, SEQ ID N°:3; exón 3, pos. 443-462); BUS10 (ATCCCTGGGAGAAATGCC, SEQ ID N°:42; exón 4a, pos. 469-486); BUS17 (CACACAGCATGATCATTACGG, SEQ ID N°:43; exón 4b, pos. 1129-1149);

Cebadores inversos:

- 15 BUS7 (CTGGAAATGTGCAAAAACAT, SEQ ID N°:44; exón 3, pos. 420-401); AH2 (TCCTGCCCCATCCTTTAAGG, SEQ ID N°:4; exón 4a, pos. 593-575); BUS11 (GTTGCATGTCTTGTGAAGCC, SEQ ID N°:45; exón 4a, pos. 719-700); BUS16 (TGATGGTGATGACAGATAAGGC, SEQ ID N°:46; exón 4b, pos. 1482-1461). Se analizaron los siguientes tejidos: carril 1, H<sub>2</sub>O; carril 2, vesícula seminal; carril 3, corazón; carril 4, bazo; carril 5, pulmón; carril 6, vejiga; carril 7, vejiga-RT; carril 8, cáncer de próstata; carril 9, próstata normal; carril 10, cáncer de próstata; carril 11, próstata normal; y carril 12, LNCaP (línea celular).

- 20 Otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no limitante de las realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos que son ejemplares, y no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la presente invención.

## **DESCRIPCIÓN DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA**

### ***I. Síntesis de Ácido Nucleico***

- 25 Las moléculas de ácido nucleico aisladas, tal como se describen en la presente memoria, pretenden incluir aquellas que resultan de cualquier método conocido, tales como las sintetizadas químicamente. De manera similar, se puede sintetizar un oligómero que corresponde a la molécula de ácido nucleico, o a cada uno de los fragmentos divididos. Tales oligonucleótidos sintéticos se pueden preparar, por ejemplo, mediante el método de triéster de Matteucci *et al.*, *J. Am. Chem Soc.* 103:3185-3191 (1981) o mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado.

- 30 Se puede obtener un oligonucleótido de manera sintética o mediante clonación. Si es necesario, los extremos 5' de los oligómeros se pueden fosforilar mediante el uso de la polinucleótido quinasa de T4. El tratamiento con quinasa de las cadenas simples antes de la hibridación o del marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de un exceso de la enzima. Si el tratamiento con quinasa es para el marcaje de la sonda, el ATP puede contener radioisótopos de actividad muy específica. Así, el oligómero de ADN se puede someter a hibridación y ligadura con una ligasa de T4 o similar.

### ***II. Un Ácido Nucleico para la Detección Específica del Ácido Nucleico de PCA3***

La presente invención se refiere a un ácido nucleico para la detección específica, en una muestra, de la presencia de secuencias de ácido nucleico de PCA3 que están asociadas al cáncer de próstata, que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriormente descritas o al menos un fragmento de las mismas que se une en condiciones rigurosas al ácido nucleico de PCA3.

- 40 En una realización preferida, la presente invención se refiere a oligómeros que seleccionan como objetivo específicamente y permiten la amplificación (es decir, cebadores) de secuencias de ARN de PCA3 asociadas al cáncer de próstata.

El producto amplificado se puede detectar tras la hibridación con una sonda que consiste en un ácido nucleico aislado que consiste en 10 a 1000 nucleótidos (preferiblemente, 10 a 500, 10 a 100, 10 a 50, 10 a 35, 20 a 1000, 20 a 500, 20 a 100, 20 a 50, o 20 a 35) que hibrida de manera preferente con un producto amplificado que se originó a partir de ARN de PCA3 asociado al cáncer de próstata, pero de manera preferente no al gen de PCA3, en el que dicha sonda de ácido nucleico es, o es complementaria a, una secuencia de nucleótidos que consiste en al menos 10 nucleótidos consecutivos (preferiblemente, 15, 18, 20, 25, o 30) de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica al menos un 90% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 50 (a) una región de la secuencia de nucleótidos de PCA3 SEQ ID N°:1 ó 2, que está asociada al cáncer de próstata;
- (b) una secuencia de nucleótidos que abarca uniones de dos exones, preferiblemente los exones 1 y 2, exones 1 y 3 (el exón 1 es contiguo al exón 3, por medio de corte y empalme alternativo), y exones 3 y 4;

5 (c) una secuencia de nucleótidos que abarca un número suficiente de las uniones de exones de PCA3, en la que las uniones de exones se definen como sigue: unión de exones de los exones 1 y 2, posiciones de nucleótidos 98-99 tal como se expone en SEQ ID N°:1; unión de exones de los exones 2 y 3, posiciones de nucleótidos 263-264 tal como se expone en SEQ ID N°:1; unión de exones de los exones 3 y 4a, posiciones de nucleótidos 446-447 tal como se expone en SEQ ID N°:1; y unión de exones de los exones 4a y 4b, posiciones de nucleótidos 985-986 tal como se expone en SEQ ID N°:1;

10 (d) una secuencia de nucleótidos que abarca un número suficiente de las uniones de exones de PCA3, en la que las uniones de exones se definen como sigue: unión de exones de los exones 1 y 2, posiciones de nucleótidos 120-121 tal como se expone en SEQ ID N°:2; unión de exones de los exones 2 y 3, posiciones de nucleótidos 285-286 tal como se expone en SEQ ID N°:2; unión de exones de los exones 3 y 4a, posiciones de nucleótidos 468-469 tal como se expone en SEQ ID N°:2; unión de exones de los exones 4a y 4b, posiciones de nucleótidos 1007-1008 tal como se expone en SEQ ID N°:2; unión de exones de los exones 4b y 4c, posiciones de nucleótidos 2066-2067 tal como se expone en SEQ ID N°:2; y unión de exones de los exones 4c y 4d, posiciones de nucleótidos 2622-2623 tal como se expone en SEQ ID N°:2;

15 Preferiblemente, una sonda de acuerdo con la presente invención no hibrida de manera específica con los nucleótidos 511-985 de SEQ ID N°:1, con los nucleótidos 567-961 de SEQ ID N°:1, con los nucleótidos 533-1007 de SEQ ID N°:2, o con los nucleótidos 589-983 de SEQ ID N°:2.

20 Las secuencias complementarias también se conocen como ácidos nucleicos inversos cuando comprenden secuencias que son complementarias a la cadena codificante. En la presente memoria, SEQ ID N°s: 1 y 2 se definen de manera arbitraria como cadenas codificantes.

25 Los cebadores de acuerdo con la presente invención se pueden diseñar tal como se conoce habitualmente en la técnica, basándose en las secuencias de PCA3 proporcionadas en la presente memoria. Más preferiblemente, los cebadores se elegirán para amplificar un ARN de PCA3 que está asociado al cáncer de próstata. Uno de tales ARN de PCA3 es un ARN de PCA3 que carece del intrón 1 (entre los exones 1 y 2). Otro ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata de acuerdo con la presente invención carece del intrón entre el exón 3 y el exón 4a. Por supuesto, la presente invención también abarca las diferentes permutaciones de tales ARNs de PCA3 específicos de cáncer de próstata. Por ejemplo, tres ARNs de PCA3 específicos de cáncer de próstata no limitantes incluyen un ARN de PCA3 que carece de al menos el intrón 1, y ARNs de PCA3 que tienen los siguientes exones contiguos: exones 1, 2, 3, 4a, 4b, 4c y 4d; y exones 1, 3, 4a, 4b, 4c y 4d.

30 En una realización preferida de la presente invención, un cebador que está diseñado para unirse al exón 1 se usa junto con un segundo cebador diseñado para unirse al exón 3 o al exón 4. Debido a que el intrón 1 es un intrón grande (de aproximadamente 20 kb), se pueden seleccionar las condiciones de amplificación para inhibir la producción de tal producto de amplificación grande, si el intrón debe estar presente en la secuencia de PCA3. De manera alternativa, las condiciones de amplificación se pueden seleccionar para permitir la amplificación de tales productos grandes. En tal realización, la presencia del intrón 1 en el ARN de PCA3 se puede establecer mediante numerosos medios conocidos en la técnica (que incluyen el uso de una sonda intrónica y/o una sonda que está diseñada para unirse a las secuencias contiguas exón 1-exón 2; se muestran dos ejemplos no limitantes de las mismas en la Tabla 1). La persona de experiencia habitual reconocerá que se puede variar la posición del cebador en la unión de exones y la longitud del cebador, tal como se conoce en la técnica.

40 En otra realización preferida, se usa un cebador que está diseñado para unirse al exón 1, junto con un segundo cebador diseñado para unirse a una región de unión de exones de la presente invención. Debido a que se ha demostrado que el exón 1 es un exón seleccionado como objetivo preferido para amplificar ARNs específicos de cáncer de próstata, tal realización se prefiere especialmente, ya que puede generar productos de amplificación específicos de cáncer de próstata. Sin embargo, la selección como objetivo de otro exón de PCA3 también es otra realización preferida. Por ejemplo, se puede seleccionar como objetivo el exón 3 y el exón 4 (véase más adelante).

45 Los ejemplos de cebadores de ácido nucleico que se pueden obtener de las secuencias de exones mostradas más adelante en la presente memoria y de cebadores específicos diseñados para amplificar una unión de exones de la presente invención se exponen en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Cebadores de Ácido Nucleico

Región de Ácido Nucleico	Tamaño	Nucleótidos	Tamaño	Nucleótidos
<i>Secuencia del Exón de la que Obtener los Cebadores</i>				
Exón 1	98	1-98 de SEQ ID N°:1	120	1-120 de SEQ ID N°:2
Exón 2	165	99-263 de SEQ ID N°:1	165	121-285 de SEQ ID N°:2
Exón 3	183	264-446 de SEQ ID N°:1	183	286-468 de SEQ ID N°:2
Exón 4a	539	447-985 de SEQ ID N°:1	539	469-1007 de SEQ ID N°:2
Exón 4b	1052	986-2037 de SEQ ID N°:1	1059	1008-2066 de SEQ ID N°:2
Exón 4c	-	-	56	2067-2622 de SEQ ID N°:2
Exón 4d	-	-	960	2623-3582 de SEQ ID N°:2
<i>Cebadores Específicos de Unión de Exones</i>				
Unión de Exones 1	20	89-108 de SEQ ID N°:1 (SEQ ID N°:5)	20	109-128 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:6)
Unión de Exones 2	20	252-271 de SEQ ID N°:1 (SEQ ID N°:7)	20	274-293 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:7)
Unión de Exones 3	20	435-454 de SEQ ID N°:1 (SEQ ID N°:8)	20	457-476 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:8)
Unión de Exones 4	20	974-993 de SEQ ID N°:1 (SEQ ID N°:9)	20	996-1015 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:9)
Unión de Exones 5	-	-	20	2055-2074 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:10)
Unión de Exones 6	-	-	20	2611-2630 de SEQ ID N°:2 (SEQ ID N°:11)

Aunque la presente invención se puede llevar a cabo sin el uso de una sonda que seleccione como objetivo las secuencias de PCA3, y preferiblemente las uniones de exones de PCA3 de acuerdo con la presente invención, tales sondas pueden añadir una especificidad adicional a los métodos y equipos de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de sondas de ácido nucleico específicas que se pueden usar en la presente invención (y diseñadas basándose en las secuencias exónicas mostradas en la Tabla 1) se exponen en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: Sondas de Ácido Nucleico

Tamaño	Nucleótidos	Secuencia	SEQ ID N°:
20	1-20 de SEQ ID N°:1	AGAAGCTGGCATCAGAAAAA	12
30	1-30 de SEQ ID N°:1	AGAAGCTGGCATCAGAAAAACAGAGGGGAG	13
40	1-40 de SEQ ID N°:1	AGAAGCTGGCATCAGAAAAACAGAGGGGAGATTTGTGTGG	14
20	89-108 de SEQ ID N°:1	TGATACAGAGGAATTACAAC	5
30	257-286 de SEQ ID N°:1	GGCAGGGGTGAGAAAATAAGAAAAGGCTGCTG	15
20	274-293 de SEQ ID N°:1	AGAAAGGCTGCTGACTTTAC	16
20	1-20 de SEQ ID N°:2	ACAGAAGAAAATAGCAAGTGC	17
30	1-30 de SEQ ID N°:2	ACAGAAGAAAATAGCAAGTGCAGAAAGCTG	18
40	1-40 de SEQ ID N°:2	ACAGAAGAAAATAGCAAGTGCAGAAAGCTGCGATCAGAAA	19
30	114-143 de SEQ ID N°:2	TACAGAGGAATTACAACACATATACTTAGT	20
20	284-303 de SEQ ID N°:2	GGGTGAGAAAATAAGAAAAGGC	21

5 Por supuesto, como entenderá la persona de experiencia habitual, se puede diseñar una multitud de sondas adicionales de la misma o de otras regiones de SEQ ID N°:1, así como de SEQ ID N°:2 y otras secuencias de la presente invención, sean o no uniones de exones seleccionadas como objetivo.

Las sondas de hibridación de la presente invención se pueden marcar mediante técnicas habituales de marcaje tales como con un radiomarcador, marcador enzimático, marcador fluorescente, marcador de biotina-avidina, quimioluminiscencia, y similares. Después de la hibridación, las sondas se pueden visualizar mediante el uso de métodos conocidos.

10 Las sondas de ácido nucleico de la presente invención incluyen sondas de ARN, así como sondas de ADN, y tales sondas se generan mediante el uso de métodos conocidos de la técnica.

En una realización del método descrito anteriormente, se inmoviliza una sonda de ácido nucleico en un soporte

sólido. Los ejemplos de tales soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, plásticos tales como policarbonato, carbohidratos complejos tales como agarosa y sefarosa, y resinas acrílicas, tales como poliacrilamida y microesferas de látex. Los métodos para acoplar sondas de ácidos nucleicos a tales soportes sólidos se conocen bien en la técnica.

- 5 Las muestras de ensayo adecuadas para los métodos de utilización de sondas de ácido nucleico descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, células o extractos de ácidos nucleicos de células, o líquidos biológicos. La muestra usada en los métodos anteriormente descritos variará basándose en el formato del ensayo, el método de detección y la naturaleza de los tejidos, células o extractos a analizar. Los métodos para la preparación de extractos de ácidos nucleicos de células se conocen bien en la técnica, y se pueden adaptar fácilmente para obtener una  
10 muestra que es compatible con el método utilizado. En la presente invención, la muestra es una muestra de orina.

### **III. Un Método para Detectar la Presencia de Ácido Nucleico de PCA3 en una Muestra**

- En otra realización, la presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en una muestra que comprende a) poner en contacto la muestra con los  
15 cebadores de ácido nucleico descritos anteriormente, en condiciones de amplificación específica, y b) detectar la presencia del producto amplificado. Una persona experta en la técnica seleccionaría los cebadores de ácido nucleico según los métodos conocidos en la técnica, tal como se describió anteriormente. En una realización particular, uno de los cebadores se une al exón 1 de PCA3. En otra realización, el cebador selecciona como objetivo el exón 3 o exón 4 de PCA3. En otra realización, se usa una sonda para identificar el producto de amplificación. Las muestras a analizar incluyen, pero sin limitación, muestras de ARN de tejido humano.

### **IV. Un Equipo para Detectar la Presencia de Ácido Nucleico de PCA3 en una Muestra**

- En otra realización, la presente invención se refiere a un equipo para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en una muestra que comprende al menos un recipiente que tiene dispuesto en él al menos un par de cebadores, (p.ej. uno que se une al exón 1, y el otro al exón 3; uno que se une al exón 1, y el otro al exón 4a; y uno que se une al exón 1, y el otro a la unión exón 3 - exón 4a). En una realización preferida, el  
25 equipo comprende además otros recipientes que comprenden uno o más de lo siguiente: reactivos de amplificación, sondas, reactivos de lavado y reactivos capaces de detectar la presencia de una sonda de ácido nucleico unida. Los ejemplos de reactivos de detección incluyen, pero sin limitación, sondas radiomarcadas, sondas marcadas enzimáticamente (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina), y sondas marcadas por afinidad (biotina, avidina, o estreptavidina).

- 30 Con detalle, un equipo compartimentado incluye cualquier equipo en el que los reactivos están contenidos en recipientes diferentes. Tales recipientes incluyen recipientes de vidrio pequeños, recipientes de plástico o tiras de plástico o papel. Tales recipientes permiten la transferencia eficaz de los reactivos de un compartimento a otro compartimento, de manera que las muestras y los reactivos no se ven sometidos a contaminación cruzada y los agentes o disoluciones de cada recipiente se pueden añadir de una manera cuantitativa de un compartimento a otro.  
35 Tales recipientes incluirán un recipiente que aceptará la muestra de ensayo, un recipiente que contiene la sonda o cebadores usados en el ensayo, recipientes que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampón Tris, y similares), y recipientes que contienen los reactivos usados para detectar la sonda hibridada, anticuerpo unido, producto amplificado, o similares.

- Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que las sondas de ácido nucleico descritas en la presente invención se pueden incorporar fácilmente en uno de los formatos de equipos establecidos, que se conocen muy bien en la técnica.

### **V. Cribado de Diagnóstico**

Se debe entender que, aunque la siguiente discusión se dirige específicamente a pacientes humanos, las enseñanzas son aplicables también a cualquier animal que exprese PCA3.

- 45 Los métodos de diagnóstico y de cribado de la invención son especialmente útiles para un paciente que se sospecha que tiene riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un nivel de expresión alterado de PCA3 basándose en el historial familiar, o un paciente en el que se desea diagnosticar una enfermedad relacionada con PCA3 (p.ej., cáncer de próstata).

- El cribado presintomático de un individuo que necesita tal cribado es posible ahora mediante el uso del ADN que  
50 codifica la proteína PCA3 o el gen de PCA3 o fragmentos de los mismos, tal como se describe en la presente memoria. El método de cribado permite el diagnóstico presintomático, que incluye el diagnóstico prenatal, de la presencia de un gen de PCA3 ausente o anormal en individuos, y así una opinión con respecto a la probabilidad de que tal individuo desarrolle o haya desarrollado una enfermedad asociada a PCA3. Esto es especialmente valioso para la identificación de portadores de genes de PCA3 alterados o ausentes, por ejemplo, de individuos con un historial familiar de una enfermedad asociada a PCA3 (p.ej. cáncer de próstata, cáncer urogenital). También se  
55 desea el diagnóstico temprano para maximizar una intervención oportuna y adecuada.

En una realización preferida del método de cribado, se tomaría una muestra de tejido de tal individuo, y se cribaría en busca de la presencia de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata.

Más específicamente, en la presente memoria se proporciona un método para diagnosticar la presencia o la predisposición a desarrollar cáncer de próstata en un paciente.

- 5 Los métodos de cribado y de diagnóstico de la invención no requieren que se use la secuencia de PCA3 completa para la sonda. En su lugar, solamente es necesario usar un fragmento o longitud de ácido nucleico que sea suficiente para detectar la presencia del ácido nucleico de PCA3 de un individuo normal o afectado, la ausencia de tal ácido nucleico, o una estructura alterada de tal ácido nucleico (tal como un patrón anormal de corte y empalme). Preferiblemente, se usa cualquiera de las sondas descritas en la presente memoria.
- 10 Las realizaciones no limitantes de la presente invención incluyen además un ensayo para detectar ARN de PCA3 en el que las secuencias del ARN sometido a corte y empalme se amplifican y se detectan mediante el uso de una sonda que hibrida específicamente con una unión exón-exón elegida de PCA3 que está en el ácido nucleico amplificado. En general, un cebador en la reacción de amplificación hibrida específicamente con una secuencia en un primer exón (o exón de 5'), y el otro cebador usado en la reacción de amplificación hibrida específicamente con una secuencia en un segundo exón (o exón de 3'), y la sonda hibrida con una secuencia que abarca la región de 3' del primer exón y la región de 5' del segundo exón. Es decir, la sonda es específica para una unión exón-exón elegida en una secuencia amplificada producida a partir de un ARN de PCA3 sometido a corte y empalme que carece de al menos un intrón entre las secuencias de los exones de 5' y 3' con las que hibridan los cebadores. Los cebadores para el uso en la amplificación de secuencias del ARN sometido a corte y empalme que contiene una unión exón-exón elegida se pueden determinar fácilmente mediante el uso de métodos habituales, con tal de que la región amplificada por el par de cebadores contenga la secuencia de la unión exón-exón o su secuencia complementaria. Se puede usar cualquier método de amplificación de ácido nucleico para amplificar la secuencia que contiene la unión exón-exón elegida, y los procedimientos para usar cualquiera de una diversidad de métodos de amplificación bien conocidos pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica.
- 20 Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida se pueden marcar con cualquiera de una diversidad de marcadores que pueden dar como resultado, directa o indirectamente, una señal cuando la sonda está hibridada a la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produce una señal luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se puede detectar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. No es necesario marcar una sonda con un resto marcador si la unión de la sonda específicamente al ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable. En la presente memoria se muestran ejemplos no limitantes de cebadores de amplificación para las secuencias de exones que flanquean una unión exón-exón elegida y sondas específicas para ciertas uniones de PCA3, y se ejemplifican más adelante en la presente memoria (p.ej., Tabla 3), y son representativos de realizaciones no limitantes de un ensayo para detectar ARN de PCA3 sometido a corte y empalme en una muestra. Se describen detalles ejemplares adicionales de procedimientos que se pueden usar en tales ensayos en los Ejemplos 4 y 5.
- 25 Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida se pueden marcar con cualquiera de una diversidad de marcadores que pueden dar como resultado, directa o indirectamente, una señal cuando la sonda está hibridada a la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produce una señal luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se puede detectar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. No es necesario marcar una sonda con un resto marcador si la unión de la sonda específicamente al ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable. En la presente memoria se muestran ejemplos no limitantes de cebadores de amplificación para las secuencias de exones que flanquean una unión exón-exón elegida y sondas específicas para ciertas uniones de PCA3, y se ejemplifican más adelante en la presente memoria (p.ej., Tabla 3), y son representativos de realizaciones no limitantes de un ensayo para detectar ARN de PCA3 sometido a corte y empalme en una muestra. Se describen detalles ejemplares adicionales de procedimientos que se pueden usar en tales ensayos en los Ejemplos 4 y 5.
- 30 Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida se pueden marcar con cualquiera de una diversidad de marcadores que pueden dar como resultado, directa o indirectamente, una señal cuando la sonda está hibridada a la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produce una señal luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se puede detectar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. No es necesario marcar una sonda con un resto marcador si la unión de la sonda específicamente al ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable. En la presente memoria se muestran ejemplos no limitantes de cebadores de amplificación para las secuencias de exones que flanquean una unión exón-exón elegida y sondas específicas para ciertas uniones de PCA3, y se ejemplifican más adelante en la presente memoria (p.ej., Tabla 3), y son representativos de realizaciones no limitantes de un ensayo para detectar ARN de PCA3 sometido a corte y empalme en una muestra. Se describen detalles ejemplares adicionales de procedimientos que se pueden usar en tales ensayos en los Ejemplos 4 y 5.
- 35 Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida se pueden marcar con cualquiera de una diversidad de marcadores que pueden dar como resultado, directa o indirectamente, una señal cuando la sonda está hibridada a la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produce una señal luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se puede detectar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. No es necesario marcar una sonda con un resto marcador si la unión de la sonda específicamente al ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable. En la presente memoria se muestran ejemplos no limitantes de cebadores de amplificación para las secuencias de exones que flanquean una unión exón-exón elegida y sondas específicas para ciertas uniones de PCA3, y se ejemplifican más adelante en la presente memoria (p.ej., Tabla 3), y son representativos de realizaciones no limitantes de un ensayo para detectar ARN de PCA3 sometido a corte y empalme en una muestra. Se describen detalles ejemplares adicionales de procedimientos que se pueden usar en tales ensayos en los Ejemplos 4 y 5.

La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

### **EJEMPLO 1**

#### **PCA3 es un marcador específico para el cáncer de próstata**

- 40 Gandini *et al.*, 2003 reivindica que la expresión específica de próstata de PCA3 se limita a los exones 4 del gen de PCA3. Los autores demuestran que la amplificación mediante RT-PCR del transcrito de PCA3 mediante el uso de cebadores específicos para los exones 1 y 3 también amplificó un producto específico de PCA3 en varios tejidos y líneas celulares que no eran de próstata.

- 45 Tras la primera descripción del gen de PCA3, se usaron los cebadores de PCR directo del exón 1 e inverso del exón 3 exactamente como se describió en la carta de Gandini *et al.*, anteriormente mencionado. En los últimos cuatro años, se amplificó PCA3 en muchas muestras mediante el uso de estos cebadores, y todavía se tiene que observar la expresión no prostática de PCA3. Aunque no está claro a partir de la carta cuántos ciclos de amplificación mediante PCR llevó a cabo Gandini *et al.*, anteriormente mencionado, nunca se usaron más de 35 rondas de amplificación para los resultados descritos en este ejemplo. No se puede excluir que usando más rondas de amplificación se pudiera dar como resultado una detección de niveles bajos de expresión. Estos niveles de expresión, sin embargo, estarían muy por debajo de los observados en el cáncer de próstata, la próstata normal e incluso en líneas celulares de cáncer de próstata.
- 50

- Una observación interesante hecha en la presente memoria es que PCA3 se puede amplificar en tejidos no prostáticos, mediante el uso de cebadores específicos de PCA3 que abarcan los exones 3 y 4 (Fig. 1). El nivel de expresión es menor que en el tejido prostático normal, y está muy por debajo de la expresión en el tejido de cáncer de próstata. Sorprendentemente, los transcritos de PCA3 en los tejidos no prostáticos no se someten a corte y empalme, como en las muestras derivadas de próstata. En el tejido prostático normal, el transcrito no sometido a corte y empalme se expresa a niveles bajos. En el tejido de tumor de próstata, la variante no sometida a corte y
- 55

empalme no se expresa o no es detectable debido a la sobreexpresión elevada de PCA3 sometido a corte y empalme que se puede amplificar de manera preferente en las reacciones de PCR. En las muestras de ARN que no se sometieron a transcripción inversa, no se halló un producto de amplificación, lo que indica que los productos de PCR de PCA3 no sometidos a corte y empalme no fueron atribuibles a una contaminación de ADN.

5 Se pueden postular varias explicaciones para la presencia de transcritos de PCA3 no sometidos a corte y empalme (Fig. 2). En primer lugar, en los tejidos prostáticos el transcrito de PCA3 se puede someter a corte y empalme de manera específica de tejido, un fenómeno que se ha descrito para otros genes (Black, 2003). En segundo lugar, puede existir un promotor ubicuo alternativo en el gen de PCA3, lo que da como resultado un segundo transcrito que no es específico de próstata. Esta opción parece probable, ya que el transcrito no se somete a corte y empalme a  
10 pesar de las secuencias consenso fuertes de corte y empalme que flanquean los exones de PCA3 (Bussemakers *et al.*, anteriormente mencionado). En tercer lugar, puede haber presente un promotor ubicuo en el extremo 3' del gen de PCA3 en orientación inversa, lo que conduce a un transcrito de PCA3 inverso en la mayoría de los tejidos. Recientemente se ha informado que la transcripción inversa se da de manera generalizada en el genoma humano (Yelin *et al.*, 2003), y por lo tanto no es improbable que exista un transcrito de PCA3 inverso. Tales transcritos  
15 inversos a menudo están implicados en procesos de regulación génica (Yelin *et al.*, anteriormente mencionado). Por lo tanto, dicho supuesto transcrito inverso de PCA3 puede estar implicado en la regulación de la transcripción de PCA3 en las células de la próstata, o viceversa, en las células de la próstata el transcrito de PCA3 puede afectar a un gen transcrito inverso, hasta ahora sin identificar. Actualmente, se está investigando si el corte y empalme alternativo o si los mecanismos alternativos de iniciación de la transcripción son responsables del transcrito similar a  
20 PCA3 no prostático observado.

## **EJEMPLO 2**

### **Expresión de PCA3 mediante RT-PCR**

Con respecto a la Figura 3, la transcripción del gen de PCA3 o de un gen similar a PCA3 es evidente en tejidos diferentes de la próstata. Sin embargo, estos transcritos no se someten a corte y empalme o son complementarios (es decir, inversos) respecto del gen de PCA3. Hasta la fecha, no se ha dado la observación de ninguna variante de  
25 PCA3 sometida a corte y empalme de manera alternativa (p.ej., producto del exón 1 a 3) en tejidos no prostáticos. Para la aplicación de PCA3 como marcador para el cáncer de próstata, esto tiene una implicación importante: los cebadores preferidos para la amplificación de los transcritos de PCA3 en muestras de pacientes deberían atravesar, en una realización, el primer intrón grande (16 kb). Esta región del gen de PCA3 puede estar presente en los  
30 transcritos no sometidos a corte y empalme alternativo o inversos, pero está ausente en la forma sometida a corte y empalme específica de próstata de PCA3. Por lo tanto, el uso de pares de cebadores del exón 1 al exón 3 ó 4, es un medio preferido según la presente invención para detectar una forma de PCA3 amplificada sometida a corte y empalme específica de próstata (en especial en condiciones mediante las cuales el intrón grande impide la  
35 amplificación de esta región en los transcritos no sometidos a corte y empalme). Se han desarrollado dos ensayos independientes para la detección del ARN de PCA3 en material de pacientes, mediante el uso del cebador directo del exón 1 e inverso del exón 4 y sondas de detección específicas del exón 4 (De Kok *et al.*, 2002; Hessels *et al.*, 2003). Los ensayos de detección de PCA3 se han aplicado en más de 200 muestras de pacientes, y se ha demostrado que son muy específicos y sensibles, con un valor predictivo negativo muy sólido (Hessels, anteriormente mencionado). El análisis de más de 100 muestras de control todavía no ha dado como resultado  
40 productos de amplificación inespecíficos.

## **EJEMPLO 3**

### **Ensayo para Detectar ARN de PCA3 Sometido a Corte y Empalme**

#### **Mediante el Uso de Sondas de Uniones Exón-Exón**

Este ejemplo ilustra ciertas realizaciones no limitantes del ensayo para detectar ARN de PCA3 en el que las  
45 secuencias del ARN sometido a corte y empalme se amplifican y se detectan mediante el uso de una sonda que hibrida específicamente con una unión exón-exón elegida de PCA3 que está en el ácido nucleico amplificado. En general, un cebador en la reacción de amplificación hibrida específicamente con una secuencia en un primer exón (o exón de 5'), y el otro cebador usado en la reacción de amplificación hibrida específicamente con una secuencia en un segundo exón (o exón de 3'), y la sonda hibrida con una secuencia que abarca la región de 3' del primer exón y la  
50 región de 5' del segundo exón. Es decir, la sonda es específica para una unión exón-exón elegida en una secuencia amplificada producida a partir de un ARN de PCA3 sometido a corte y empalme que carece de al menos un intrón entre las secuencias de los exones de 5' y 3' con las que hibridan los cebadores. Los cebadores para el uso en las secuencias de amplificación del ARN sometido a corte y empalme que contienen una unión exón-exón elegida se pueden determinar fácilmente mediante el uso de métodos habituales, con tal de que la región amplificada por el par  
55 de cebadores contenga la secuencia de la unión exón-exón o su secuencia complementaria. Se puede usar cualquier método de amplificación de ácido nucleico para amplificar la secuencia que contiene la unión exón-exón elegida, y los procedimientos para usar cualquiera de una diversidad de métodos de amplificación bien conocidos pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica.

Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida se pueden marcar con cualquiera de una diversidad de marcadores que pueden dar como resultado, directa o indirectamente, una señal cuando la sonda está hibridada a la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produce una señal colorimétrica, luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se puede detectar mediante el uso de métodos muy conocidos en la técnica. No es necesario marcar una sonda con un resto marcador si la unión de la sonda específicamente al ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable.

Los ejemplos de combinaciones de pares de cebadores de amplificación que amplifican la secuencia de ácido nucleico que incluye una unión exón-exón y las realizaciones de algunas secuencias de sondas de uniones exón-exón se muestran en la Tabla 3. Los expertos en la técnica entenderán que las secuencias de las sondas mostradas más adelante incluyen también las secuencias complementarias de las secuencias mostradas, y las secuencias que incluyen cambios insignificantes respecto de las secuencias específicas mostradas (es decir, los cambios que no afectan a la capacidad de una sonda de hibridar de manera específica a la secuencia de la unión exón-exón elegida, en condiciones de hibridación habituales). Además, aunque las secuencias de las sondas se muestran como secuencias de ADN, los expertos en la técnica entenderán que se pueden usar como sondas las secuencias de ARN correspondientes o sus secuencias complementarias. Además, las uniones del esqueleto de las secuencias de bases de las sondas pueden incluir una o más uniones de ARN estándar, uniones de ADN, uniones mixtas ARN-ADN, u otras uniones tales como uniones 2'-O-metilo o uniones de ácidos peptidonucleicos, todas ellas muy conocidas para los expertos en la técnica.

Tal como se muestra en la Tabla 3 (primera columna), la unión exón-exón elegida a detectar puede unir los exones 1 y 2 (exón 1/exón 2), los exones 1 y 3 (exón 1/exón 3), los exones 2 y 3 (exón 2/exón 3), o los exones 3 y 4 (exón 3/exón 4). Los pares de cebadores son secuencias localizadas en dos exones diferentes que flanquean directamente o indirectamente la unión exón-exón elegida (Tabla 3, segunda columna). Así, para una unión exón 1/exón 2, los pares de cebadores son un cebador específico para una secuencia contenida en el exón 1 y otro cebador específico para una secuencia contenida en el exón 2. Excepto para detectar una unión exón 2/exón 3 o una unión exón 3/exón 4, los pares de cebadores se pueden seleccionar de más de dos exones diferentes (véase más adelante en la columna 2) con tal de que la secuencia amplificada contenga la región de unión exón-exón elegida. Los cebadores del "exón 4" incluyen cebadores específicos para una secuencia contenida en cualquier secuencia de exones 4a, 4b, 4c, o 4d.

30

Tabla 3

Unión de Exones Detectada	Pares de Cebadores en Exones de PCA3	Sondas de Uniones de Exones	SEQ ID Nº:
Exón 1/ exón 2	exón 1 y exón 2	GGACCTGATGATACAGAGGAATTAC	22
Exón 1/ exón 2	exón 1 y exón 2	GAGGAATTACAACAC	23
Exón 1/ exón 2	exón 1 y exón 2	GATGATACAGAGGAATTACAACAC	24
Exón 1/ exón 3	exón 1 y exón 3	GATGATACAGAGGTGAGAAATAAG	25
Exón 1/ exón 3	exón 1 y exón 3	CAGAGGTGAGAAATAAGAAAGGC	26
Exón 1/ exón 3	exón 1 y exón 3	GATACAGAGGTGAGAAATAAG	27
Exón 1/ exón 3	exón 1 y exón 3	GATACAGAGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGTGAC	28
Exón 2/ exón 3	exón 2 y exón 3, o exón 1 y exón 3	GGCAGGGGTGAGAAATAAG	29
Exón 2/ exón 3	exón 2 y exón 3, o exón 1 y exón 3	CTCAATGGCAGGGGTGAG	30
Exón 2/ exón 3	exón 2 y exón 3, o exón 1 y exón 3	CTCAATGGCAGGGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGTGAC	31

Tabla 3 (Continuación)

Exón 3 / exón 4	exón 3 y exón 4, o exón 1 y exón 4, o exón 2 y exón 4	GGAAGCACAGAGATCCCTGG	8
Exón 3 / exón 4	exón 3 y exón 4, o exón 1 y exón 4, o exón 2 y exón 4	GCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGGAG	32
Exón 3 / exón 4	exón 3 y exón 4, o exón 1 y exón 4, o exón 2 y exón 4	GCACAGAGATCCCTGGGAG	33
Exón 3 / exón 4	exón 3 y exón 4, o exón 1 y exón 4, o exón 2 y exón 4	GCACAGAGACCCCTTCGTG	34
Exón 3 / exón 4	exón 3 y exón 4, o exón 1 y exón 4, o exón 2 y exón 4	GGAAGCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGG	35

5 Estos ejemplos no limitantes de cebadores de amplificación para secuencias de exones que flanquean una unión exón-exón elegida y sondas específicas para ciertas uniones de PCA3 son representativos de realizaciones del ensayo para detectar ARN de PCA3 sometido a corte y empalme en una muestra.

Los detalles adicionales de procedimientos y realizaciones que se pueden usar en tales ensayos se describen en los ejemplos siguientes. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar variaciones de estos procedimientos

y reactivos que no afectarían sustancialmente a los resultados o conclusiones extraídas de estos experimentos y, por lo tanto, estos ejemplos describen realizaciones no limitantes de la invención.

#### **EJEMPLO 4**

##### **Sensibilidad del Ensayo de Amplificación de PCA3**

- 5 Este ejemplo demuestra la sensibilidad de un ensayo de amplificación que selecciona como objetivo la variante sometida a la corte y empalme exón3-exón4 del mRNA de PCA3. Para el uso en estos experimentos, se sintetizaron oligonucleótidos mediante el uso de un procedimiento químico de fosforamidita habitual (p.ej., como se describe en Caruthers *et al.*, *Methods in Enzymol.*, 154:287 (1987)), llevado a cabo mediante el uso de un sistema automatizado (sintetizador de ácido nucleico Expedite™ 8909, Applied Biosystems, Foster City, CA).
- 10 Se diseñaron cebadores de ácido nucleico para el uso en una amplificación mediada por transcripción (TMA), un procedimiento descrito con detalle previamente (p.ej., Kacian *et al.*, patentes de EE.UU. nºs 5.399.491 y 5.480.784). TMA es un procedimiento de amplificación isotérmico que produce un incremento de más de mil millones del número de copias de la secuencia objetivo mediante el uso de una transcriptasa inversa y ARN polimerasa. Brevemente, en
- 15 TMA se usa una secuencia objetivo monocatenaria para sintetizar un intermedio de ADN bicatenario mediante el uso de la transcriptasa inversa en presencia de un par de oligonucleótidos de amplificación, uno de los cuales tiene una secuencia promotora para la ARN polimerasa en 5'. El intermedio de ADN incluye una secuencia promotora bicatenaria que es reconocida por una ARN polimerasa y que dirige la transcripción de la secuencia objetivo (es decir, cientos de copias de ARN). Cada transcrito de ARN se convierte después en un intermedio de ADN bicatenario que se usa para producir un ARN adicional y, así, la reacción transcurre de manera exponencial.
- 20 Los cebadores se sintetizaron con las siguientes secuencias: CAGGAAGCACAAAAGGAAGC (SEQ ID Nº:3) y AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCTCATCGATGACCCAAGATGG (SEQ ID Nº:36). La porción de 5' subrayada del segundo cebador (denominado "cebador promotor") es una secuencia promotora de T7 (AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA, SEQ ID Nº:37) que se usa en el procedimiento de TMA, pero los expertos en la técnica apreciarán que un cebador constituido por la secuencia específica del objetivo en 3'
- 25 (GGCTCATCGATGACCCAAGATGG, SEQ ID Nº:38) o su secuencia complementaria se podría usar de manera equivalente en una reacción de amplificación que no implicase la transcripción mediante la ARN polimerasa de T7. Estos cebadores se diseñaron para amplificar a través de la unión del corte y empalme entre los exones 3 y 4 del mRNA de PCA3.
- Se usó una sonda (GGAAGCACAGAGATCCCTGG, SEQ ID Nº:8) que abarcaba la unión del corte y empalme exón3-exón4. Es decir, la sonda se diseñó para detectar específicamente solamente el amplicón derivado de ese mRNA sometido a corte y empalme, y no la forma no sometida a corte y empalme exón3-intrón3-exón4. La sonda se sintetizó *in vitro* para que incluyera un ligador no nucleotídico (véase Arnold *et al.*, patentes de EE.UU. nºs 5.585.481 y 5.639.604), y se marcó con un éster de acridinio quimioluminiscente (véase Arnold *et al.*, pat. de EE.UU. nº 5.185.439). El objetivo de ARN para la amplificación fue un transcrito *in vitro* que contenía la secuencia de la forma
- 30 sometida a corte y empalme exón1-exón3-exón4 del mRNA de PCA3. Los técnicos expertos apreciarán que el objetivo se podría producir mediante otros métodos habituales, tales como, p.ej., lisis química de células mediante el uso de una disolución tamponada que contiene un detergente que inhibe la actividad de ARNasa, que incluye la purificación del objetivo (p.ej., como describió Weisburg et al., en la patente de EE.UU. Nº 6.110.678).
- Se usaron tres tubos de muestra para cada uno de los niveles objetivo analizados (n=3), en el intervalo de 0 a 10.000 copias de objetivo por reacción (véase la Tabla 4). A cada tubo de reacción, se le añadió reactivo de amplificación (75 µL de una disolución que contenía rATP 26,7 mM, rCTP 5,0 mM, rGTP 33,3 mM y rUTP 5,0 mM, HEPES 125 mM, 8% (p/v) de trehalosa dihidrato, dATP 1,33 mM, dCTP 1,33 mM, dGTP 1,33 mM, dTTP 1,33 mM, KCl 33 mM, MgCl<sub>2</sub> 30,6 mM, 0,10% (p/v) de metil parabeno, 0,02% (p/v) de propil parabeno, y 0,003% de rojo fenol, a pH 7,5) que contenía estos cebadores (15 pmol de cada uno). El transcrito de ARN objetivo se añadió después a
- 40 los tubos en 10 µL de agua, y se mezcló, y después cada tubo de reacción recibió 200 µL de aceite de silicona (United Chemical Technologies, Inc., Bristol, PA), se cubrió y se agitó en vórtex durante alrededor de 10 segundos antes de incubarlo en un baño de agua a 62 °C durante alrededor de 10 minutos en una etapa de hibridación inicial en la que se dio la unión del promotor-cebador al ácido nucleico objetivo. Los tubos de reacción se incubaron después a 42 °C durante alrededor de 5 minutos, y después se añadieron 25 µL del Reactivo de Enzima (HEPES 50 mM, N-acetil-L-cisteína 125 mM, KCl 120 mM, EDTA 1 mM, 20% (v/v) de glicerol, 10,2% (v/v) de TRITON X-100, trehalosa 0,2 M, 0,90 U/mL de transcriptasa inversa (RT) del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), y 0,20 U/mL de ARN polimerasa de T7, a pH 7,0, en el que 1 U de actividad de RT se define como la síntesis y la liberación de 5,75 fmol de cADN en 15 min a 37 °C para RT de MMLV, y 1 U de actividad de ARN polimerasa de T7 se define como la producción de 5,0 fmol de transcrito de ARN en 20 min a 37 °C) a cada tubo de reacción, se mezcló
- 55 suavemente y se incubó a 42 °C durante alrededor de 60 minutos.
- Para la detección de los productos de amplificación de PCA3, los tubos de reacción se extrajeron a temperatura ambiente y se añadieron 100 µL del reactivo de hibridación (succinato 100 mM, 2% (p/v) de lauril sulfato de litio, hidróxido de litio 100 mM, aldritol-2 15 mM, LiCl 1,2 M, EDTA 20 mM, 3,0% (v/v) de etanol, a pH 4,7) que contenía 100 fmol de una sonda de detección marcada y 400 pmol de una sonda sin marcar a cada tubo de reacción. La

sonda de detección marcada tenía un marcador de éster de acridinio unido a la sonda mediante un ligador no nucleotídico colocado entre los nucleótidos 10 y 11, y la sonda sin marcar fue un oligómero de la misma secuencia de ácido nucleico pero sin marcar. Los tubos de reacción se cubrieron y se agitaron en vórtex durante alrededor de 10 segundos y después se incubaron a 62 °C durante alrededor de 20 minutos para permitir la hibridación de la sonda de detección a los productos de amplificación. Los tubos de reacción se enfriaron a temperatura ambiente durante alrededor de 5 minutos y después se añadieron 250 µL del Reactivo de Selección (ácido bórico 600 mM, NaOH 182,5 mM, 1% (v/v) de TRITON X-100, a pH 8,5) a cada tubo. Los tubos de reacción se cubrieron, se agitaron en vórtex durante alrededor de 10 segundos, y después se incubaron a 62 °C durante alrededor de 10 minutos para hidrolizar los marcadores de éster de acridinio asociados a la sonda marcada sin hibridar. Los tubos de reacción se enfriaron a alrededor de 18 °C a 28 °C durante alrededor de 15 minutos y se detectó la señal quimioluminiscente (en unidades relativas de luz, o URL) mediante el uso de un luminómetro (luminómetro LEADER7 450h o LEADER7 HC+, Gen-Probe Inc., San Diego, CA) equipado para la inyección automática del Reactivo de Detección 1 (ácido nítrico 1 mM, peróxido de hidrógeno 32 mM), seguido de inyección automática del Reactivo de Detección 2 (NaOH 1,5 M para ajustar el pH hasta aproximadamente neutro). El límite para un resultado negativo en este experimento fue de 50.000 URL, es decir, las muestras positivas proporcionaron una señal mayor de 50.000 URL.

Los resultados mostrados en la Tabla 4 demuestran que el ensayo de PCA3 detecta un mínimo de 10 copias del transcrito de ARN de PCA3. La señal (URL) obtenida mediante el uso de 10 copias del objetivo fue de alrededor de 15 veces mayor que la señal obtenida para una muestra negativa (0 copias). Las señales de URL detectadas se correlacionaron de manera positiva con la cantidad relativa de objetivo presente en las muestras, lo que indica la naturaleza cuantitativa de este sistema de ensayo de PCA3.

**Tabla 4: Sensibilidad del Ensayo de Amplificación de PCA3**

Nivel del Objetivo (copias/reacción)	URL media (n=3)
0	1.306
10	19.989
100	1.012.272
1.000	2.749.382
10.000	3.726.173

#### EJEMPLO 5

##### **Amplificación de mRNA de PCA3 en sedimentos celulares de orina de hombres y mujeres**

Este ejemplo demuestra la detección de mRNA variante sometido a corte y empalme del exón3-exón4 de PCA3 en sedimentos celulares de orina. A menos que se especifique de otra manera, los reactivos usados fueron como se describieron en el Ejemplo 4. Los sedimentos celulares se prepararon mediante centrifugación (1500 RCF durante 15 min) de 200 µL de orina de tres hombres normales y una mujer normal. Se prepararon y se analizaron cinco duplicados de cada sujeto. El sobrenadante de orina se decantó, y se vaciaron los tubos. Cada sedimento celular se lisó en 400 µL de Tampón de Lisis (fosfato sódico monobásico 15 mM, fosfato sódico dibásico 15 mM, EDTA 1,0 mM, EGTA 1,0 mM, lauril sulfato de litio 110 mM, a pH 6,7, incubado 10 min a 62 °C) para liberar los ácidos nucleicos objetivo, y después se enfrió a temperatura ambiente durante alrededor de 5 minutos.

Para separar el ácido nucleico objetivo de mRNA de PCA3 de los otros componentes presentes en los tubos de muestra, se transfirió el contenido de los tubos de muestra a tubos limpios, y se combinó con 100 µL de un Reactivo de Captura del Objetivo (HEPES 250 mM, LiOH 310 mM, LiCl 1,88 M, EDTA 100 mM, a pH 6,4), y 250 µg/ml de partículas magnéticas de 1 micra (Sera-Mag™ MG-CM modificadas con carboxilato, Seradyn, Inc., Indianápolis, Indiana) que tenían oligómeros de (dT)<sub>14</sub> unidos de manera covalente a ellas) que contenían 1,5 pmol de una sonda de captura del objetivo (AUCUGUUUCCUGCCCAUCCUUUAAGTTT(A)<sub>30</sub>, SEQ ID N°:39). Esta sonda de captura incluye una región de unión al objetivo en 5' (AUCUGUUUCCUGCCCAUCCUUUAAG, SEQ ID N°:40) y una región de unión a la sonda inmovilizada en 3' (TTT(A)<sub>30</sub>, SEQ ID N°:41). Los tubos se cubrieron, se agitaron a mano, se incubaron a 62 °C durante alrededor de 30 minutos para permitir la hibridación de la región de unión al objetivo de la sonda de captura al ácido nucleico objetivo, y se enfriaron a temperatura ambiente durante alrededor de 30 minutos para la hibridación de la secuencia (dA)<sub>30</sub> a la región de unión a la sonda inmovilizada de una sonda de captura complementaria de (dT)<sub>14</sub> unida a las partículas magnéticas. Después se aplicó un campo magnético durante alrededor de 5 minutos en el exterior de los tubos para aislar las partículas magnéticas con los ácidos nucleicos unidos, tras lo cual se aspiraron las disoluciones de muestra de los tubos, y después se lavaron las partículas con los ácidos nucleicos unidos en cada tubo con 1 mL de una Disolución de Lavado (NaCl 150 mM, HEPES 10 mM,

NaOH 6,5 mM, EDTA 1 mM, 0,3% (v/v) de etanol, 0,1% (p/v) de SDS, 0,02% (p/v) de metilparabeno, 0,01% (p/v) de propilparabeno, a pH 7,5, agitando en vórtex durante 10-20 seg), y se separaron de nuevo mediante el uso de un campo magnético (alrededor de 5 minutos) antes de eliminar mediante aspiración la Disolución de Lavado de las partículas.

- 5 Tras la etapa de captura del objetivo, se añadieron 75 µL del Reactivo de Amplificación que contenía los cebadores descritos en el Ejemplo 4 a cada uno de los tubos de reacción, y después se llevó a cabo la amplificación, la hibridación de la sonda y la detección como se describió en el Ejemplo 4. Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que el ensayo de PCA3 amplificó y detectó ácido nucleico derivado de PCA3 a partir de los sedimentos celulares de orina de hombres, pero no a partir de los sedimentos celulares de orina de mujer. El intervalo de valores de URL obtenido a partir de los tres hombres normales varió, lo que indica una diferencia en la recuperación de células que expresan PCA3, o una diferencia en la expresión del mRNA de PCA3. El valor de URL obtenido a partir del sedimento celular de orina de mujer fue el valor de fondo, lo que indica que el mRNA de PCA3 no fue detectable. El término "CV" en la Tabla 5 significa coeficiente de variación, y representa la desviación estándar de los duplicados sobre la media de los duplicados en forma de un porcentaje.

15 **Tabla 5: Amplificación de mRNA de PCA3 en sedimentos celulares de orina de hombres y mujeres**

Muestra	URL media (n = 5)	%CV
Sedimento de orina de hombre 1	610.291	78,12%
Sedimento de orina de hombre 2	1.255.240	16,75%
Sedimento de orina de hombre 3	2.165.684	12,01%
Sedimento de orina de mujer 1	1.063	0,93%

**REFERENCIAS**

1. Gandini, O., Luci, L., Stigliano, A., Lucera, R., Di Silverio, F., Toscano, V., y Cardillo, M.R. Is DD3 a new prostate-specific gene? *Anticancer Res.*, 23 (1A):305-308 2003.
- 5 2. Bussemakers, M.J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G.W., Smit, F.P., Karthaus, H.F., Schalken, J.A., Debruyne, F.M., Ru, N., e Isaacs, W.B. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.*, 59: 5975-5979, 1999.
3. Black, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72:291-336.
4. Yelin, R, Dahary, D., Sorek, R, Levanon, E.Y., Goldstein, O., Shoshan, A., Diber, A., Biton, S., Tamir, Y., Khosravi, R, Nemzer, S., Pinner, E., Walach, S., Bernstein, J., Savitsky, K., y Rotman, G. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nat. Biotechnol.*, 21: 379-386, 2003.
- 10 5. de Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., Hessels, D., Kiemeneij, L.A., Aalders, T.W., Swinkels, D.W., y Schalken, J.A. PCA3, a very sensitive and specific marker for to detect prostate tumors. *Cancer Res.*, 62: 2695-2698, 2002.
6. Hessels, D., Klein Gunnewiek, J., Oort, I., Karthaus, H.F.M., van Leenders, G.J.L., van Balken, B., Kiemeneij, L.A., Witjes, J.A., y Schalken, J.A. PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.*, 2003, en prensa.
- 15

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Universidad de Nijmegen

(ii) TITULO DE LA INVENCIÓN: MÉTODO ESPECÍFICO DE DETECCIÓN DE CÁNCER DE PRÓSTATA

5 BASADO EN PCA3, Y KITS PARA EL MISMO

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS : 2

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2037 pares de bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:

15

AGAACTGGC ATCAGAAAAA CAGAGGGGAG ATTTGTGTGG CTGCAGCCGA GGGAGACCAG	60
GAAGATCTGC ATGGTGGGAA GGACCTGATG ATACAGAGGA ATTACAACAC ATATACTTAG	120
TGTTTCAATG AACACCAAGA TAAATAAGTG AAGAGCTAGT CCGCTGTGAG TCTCCTCAGT	180
GACACAGGGC TGGATCACCA TCGACGGCAC TTCTGAGTA CTCAGTGCAG CAAAGAAAGA	240
CTACAGACAT CTCAATGGCA GGGGTGAGAA ATAAGAAAGG CTGCTGACTT TACCATCTGA	300
GGCCACACAT CTGCTGAAAT GGAGATAATT AACATCACTA GAAACAGCAA GATGACAATA	360
TAATGTCTAA GTAGTGAC ATGTTTTTG CACATTTCC AGCCCC TTT AAA TAT	411
CCA CAC ACA CAG GAA GCA CAA AAG GAA GCA CAG AGA TCC CTG GGA GAA	459
ATG CCC GGC CGC CAT CTT GGG TCA TCG ATG AGC CTC GCC CTG TGC CTG	507
GTC CCG CTT GTG AGG GAA GGA CATTAGAAATGA ATTGATGTGT TCCTTAAAGG	561
ATGGGCAGGA AAACAGATCC TGTTGTGGAT APTTATTTGA ACGGGATTAC AGATTTGAAA	621
TGAAGTCACA AAGTGAGCAT TACCAATGAG AGGAAAACAG ACGAGAAAAT CTTGATGGCT	681
TCACAAGACA TGCAACAAC AAAATGGAAT ACTGTGATGA CATGAGGCAG CCAAGCTGGG	741
GAGGAGATAA CCACGGGGCA GAGGGTCAGG ATTTCTGGCCC TGCTGCCTAA ACTGTGCGTT	801
CATAACAAA TCATTTTATA TTTCTAACCC TCAAACAAA GCTGTTGTAA TATCTGATCT	861
CTACGGTTCC TTCTGGGCC AACATTCTCC ATATATCCAG CCACACTCAT TTTTAATATT	921
TAGTTCCAG ATCTGTACTG TGACCTTTCT ACACTGTAGA ATAACATTAC TCATTTTGTT	981

CAAAGACCCT TCGTGTGCT GCCTAATATG TAGCTGACTG TTTTTCCTAA GGAGTGTCT 1041  
 GGCCAGGGG ATCTGTGAAC AGGCTGGGAA GCATCTCAAG ATCTTCCAG GGTATACTT 1101  
 ACTAGCACAC AGCATGATCA TTACGGAGTG AATTATCTAA TCAACATCAT CCTCAGTGC 1161  
~~TTTGCCATA CTGAAATCA TTCCCACTT TTGTGCCAT TCTCAAGACC TCAAAATGTC~~ 1221  
 ATTCCATTAA TATCACAGGA TTAACTTTTT TTTTAACTT GGAAGAATC AATGTACAT 1281  
 GCAGCTATGG GAATTTAAT ACATATTTTG TTTCCAGTG CAAAGATGAC TAAGTCCTT 1341  
 ATCCCTCCC TTTGTTGAT TTTTTTCCA GTATAAAGT AAAATGCTTA GCCTGTACT 1401  
 GAGGCTGTAT ACAGCACAGC CTCTCCCAT CCCTCCAGCC TTATCTGTC TCACCATCAA 1461  
 CCCCTCCAT NYSACCTAA CAAAATCTAA CTGTAAATC CTTGAACATG TCAGNCATA 1521  
 CATRTTCTT TCTGCCTGAG AAGCTCTCC TFGTCTCTA ANTCTAGAT GATGTAAAGT 1581  
 TTTGAATAAG TTGACTATCT TACTTCATGC AAAGAAGGGA CACATATGAG ATTCATCATC 1641  
 ACATGAGACA GCAAATACTA AAAGTGAAT TTGATTATAA GAGTTAGAT AAATATATGA 1701  
 AATGCAAGAK CCACAGAGGG AATGTTTATG GGGCACGTTT GTAAGCCTGG GATGTGAAGN 1761  
 AAAGGCAGGG AACCTCATAG TATCTTATAT AATATACTTC ATTTCTCTAT CTCTATCACA 1821  
 ATATCCAACA AGCTTTTCAC AGAATTCATG CAGTGCAAAT CCCCAAAGGT AACCTTATC 1881  
 CATTTCATGG TGAGTGCCT TTAGAATTTT GGCAAATCAT ACTGGTCACT TATCTCAACT 1941  
 TTGAGATGTG TTTGTCCTG TAGTTAATTG AAAGAAATAG GGCACCTTG TGAGCCACTT 2001  
 TAGGGTTCAC TCCTGGCAAT AAAGAATTTA CAAAGA 2037

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3582 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

ACAGAAGAAA TAGCAAGTGC CGAGAAGCTG GCATCAGAAA AACAGAGGGG AGATTTGTGT	60
GGCTGCAGCC GAGGGAGACC AGGAAGATCT GCATGGTGGG AAGGACCTGA TGATACAGAG	120
GAATTACAAC ACATATACTT AGTGTTCCTCA TGAACACCAA GATAAATAAG TGAAGAGCTA	180
GTCCGCTGTG AGTCTCCTCA GTGACACAGG GCTGGATCAC CATCGACGGC ACTTTCTGAG	240
TACTCAGTGC AGCAAAGAAA GACTACAGAC ATCTCAATGG CAGGGGTGAG AAATAAGAAA	300
GGCTGCTGAC TTTACCATCT GAGGCCACAC ATCTGCTGAA ATGGAGATAA TTAACATCAC	360
TAGAAACAGC AAGATGACAA TATAATGTCT AAGTAGTGAC ATGTTTTTG CACATT	415
TCC AGC CCC TTT AAA TAT CCA CAC ACA CAG GAA GCA CAA AAG GAA GCA	463
CAG AGA TCC CTG GGA GAA ATG CCC GGC CGC CAT CTT GGG TCA TCG ATG	511
AGC CTC GCC CTG TGC CTG GTC CCG CTT GTG AGG GAA GGA CAT	553
TAGAAAATGA ATTGATGTGT TCCTTAAAGG ATGGGCAGGA AACAGATCC TGTGTGGAT	613
ATTTATTTGA ACGGGATTAC AGATTTGAAA TGAAGTCACA AAGTGAGCAT TACCAATGAG	673
AGGAAAACAG ACGAGAAAAT CTTGATGGCT TCACAAGACA TGCAACAAAC AAAATGGAAT	733
ACTGTGATGA CATGAGGCAG CCAAGCTGGG GAGGAGATAA CCACGGGGCA GAGGGTCAGG	793
ATTCTGGCCC TGCTGCCTAA ACTGTGCGTT CATAACCAA TCATTCATA TTTCTAACC	853
TCAAAACAAA GCTGTTGTAA TATCTGATCT CTACGGTTCC TTCTGGGCC AACATTCTCC	913
ATATATCCAG CCACACTCAT TTTTAATATT TAGTTCCAG ATCTGTACTG TGACCTTTCT	973
ACACTGTAGA ATAACATTAC TCATTTTGTT CAAAGACCCT TCGTGTGCT GCCTAATATG	1033
TAGCTGACTG TTTTCCTAA GGAGTGTCT GGCCAGGGG ATCTGTGAC AGGCTGGGAA	1093
GCATCTCAAG ATCTTCCAG GGTATACTT ACTAGCACAC AGCATGATCA TTACGGAGTG	1153
AATTATCTAA TCAACATCAT CCTCAGTGC TTTGCCATA CTGAAATCA TTTCCACTT	1213
TTGTGCCAT TCTCAAGACC TCAAAATGTC ATTCCATTAA TATCACAGGA TTAACTTTTT	1273

TTTTAACCT GGAAGAATTC AATGTTACAT GCAGCTATGG GAATTTAATT ACATATTTTG	1333
TTTTCCAGTG CAAAGATGAC TAAGTCCTTT ATCCCTCCCC TTGTTTGAT TTTTTTCCA	1393
GTATAAAGTT AAAATGCTTA GCCTTGTA CTGAGGCTGTAT ACAGCACAGC CTCTCCCCAT	1453
<del>CCCTCCAGCC TTATCTGTCA</del> TCACCATCAA CCCCTCCCAT ACCACCTAAA CAAAATCTAA	1513
CTTGTAATTC CTTGAACATG TCAGGACATA CATTATTCTT TCTGCCTGAG AAGCTCTTCC	1573
TTGTCTCTTA AATCTAGAAT GATGTAAAGT TTTGAATAAG TTGACTATCT TACTTCATGC	1633
AAAGAAGGGA CACATATGAG ATTCATCATC ACATGAGACA GCAAATACTA AAAGTGTAAT	1693
TTGATTATAA GAGTTTAGAT AAATATATGA AATGCAAGAG CCACAGAGGG AATGTTTATG	1753
GGGCACGTTT GTAAGCCTGG GATGTGAAGC AAAGGCAGGG AACCTCATAG TATCTTATAT	1813
AATATACTTC ATTTCTCTAT CTCTATCACA ATATCCAACA AGCTTTTCAC AGAATTCATG	1873
CAGTGCAAAT CCCCAAAGGT AACCTTTATC CATTTCATGG TGAGTGCCTT TTAGAATTTT	1933
GGCAAATCAT ACTGGTCACT TATCTCAACT TTGAGATGTG TTTGTCCTTG TAGTTAATTG	1993
AAAGAAATAG GGCACCTCTG TGAGCCACTT TAGGGTTTAC TCCTGGCAAT AAAGAATTTA	2053
CAAGAGCTA CTCAGGACCA GTTGTTAAGA GCTCTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGAG	2113
TGTACATGCC AAAGTGTGCC TCTCTCTCTT GACCCATTAT TTCAGACTTA AAACAAGCAT	2173
GTTTTCAAAT GGCACATATGA GCTGCCAATG ATGTATCACC ACCATATCTC ATTATTCTCC	2233
AGTAAATGTG ATAATAATGT CATCTGTAA CAPAAAAAA GTTTGACTTC ACAAAGCAG	2293
CTGGAAATGG ACAACCACAA TATGCATAAA TCTAACTCCT ACCATCAGCT ACACACTGCT	2353
TGACATATAT TGTTAGAAGC ACCTCGCATT TGTGGGTTCT CTTAAGCAAA AACTTTGCAT	2413
TAGGTCTCAG CTGGGGCTGT GCATCAGGCG GTTTGAGAAA TATTCAATTC TCAGCAGAAG	2473
CCAGAATTTG AATCCCTCA TCTTTTAGGA ATCATTACC AGGTTTGGAG AGGATTCAGA	2533
CAGCTCAGGT GCTTCACTA ATGTCTCTGA ACTCTGTCC CTCTTTGTGT TCATGGATAG	2593
TCCAATAAAT AATGTTATCT TTGAACTGAT GCTCATAGGA GAGAATATAA GAACTCTGAG	2653
TGATATCAAC ATTAGGGATT CAAAGAAATA TTAGATTTAA GCTCACACTG GTCAAAAGGA	2713
ACCAAGATAC AAAGAACTCT GAGCTGTCTAT CGTCCCCATC TCTGTGAGCC ACAACCAACA	2773
GCAGGACCCA ACGCATGTCT GAGATCCTTA AATCAAGGAA ACCAGTGTCA TGAGTTGAAT	2833
TCTCCTATTA TGGATGCTAG CTTCTGGCCA TCTCTGGCTC TCCTCTTGAC ACATATTAGC	2893
TTCTAGCCTT TGCTTCCACG ACTTTTATCT TTTCTCCAAC ACATCGCTTA CCAATCCTCT	2953
CTCTGCTCTG TTGCTTTGGA CTTCCCCACA AGAATTTCAA CGACTCTCAA GTCTTTTCTT	3013
CCATCCCCAC CACTAACCTG AATGCTCTAG ACCCTTATTT TTATTAATTT CCAATAGATG	3073

CTGCCATGG GCTAATATTG CTTTAGATGA ACATTAGATA TTTAAAGTCT AAGAGGTTCA	3133
AAATCCAACCT CATTATCTTC TCTTTCTTTC ACCTCCCCTG CTCCTCTCCC TATATTACTG	3193
ATTGACTGAA CAGGATGGTC CCCAAGATGC CAGTCAAATG AGAAACCCAG TGGCTCCTTG	3253
TGGATCATGC ATGCAAGACT GCTGAAGCCA GAGGATGACT GATTACGCCT CATGGGTGGA	3313
GGGGACCACT CCTGGGCCTT CGTGATTGTC AGGAGCAAGA CCTGAGATGC TCCCTGCCTT	3373
CAGTGTCTC TGCATCTCCC CTTTCTAATG AAGATCCATA GAATTTGCTA CATTGAGAA	3433
TTCCAATTAG GAACTCACAT GTTTTATCTG CCCTATCAAT TTTTAAACT TGCTGAAAAT	3493
TAAGTTTTT CAAAATCTGT CCTTGTAAT TACTTTTTCT TACAGTGTCT TGGCATACTA	3553
TATCAACTTT GATTCCTTGT TACAACCTT	3582

**REIVINDICACIONES**

1. Un método in vitro para diagnosticar o pronosticar el cáncer de próstata en un paciente, que comprende:
- 5 (i) amplificar un ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme que carece de al menos el intrón 3, entre el exón 3 y el exón 4, de una muestra de orina de un paciente mediante el uso de un par de cebadores; y
- (ii) detectar un producto de amplificación obtenido del mismo con una sonda que es específica para una unión exón 3-exón 4 de PCA3,
- en el que dicho producto de amplificación está asociado a la presencia de cáncer de próstata o a la predisposición a él en dicho paciente.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme también carece de
- (i) el intrón 1 entre el exón 1 y el exón 2; o
- (ii) el intrón 2 entre el exón 2 y el exón 3.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho ARN de PCA3 no tiene intrones.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha sonda es una sonda de hibridación.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha sonda está marcada de manera detectable.
6. Un equipo de diagnóstico para detectar la presencia de un ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme que carece de al menos el intrón 3, entre el exón 3 y el exón 4, en una muestra de orina de un paciente, que comprende:
- 20 (i) al menos un par de cebadores que están diseñados para permitir la amplificación de dicho ARN de PCA3, en el que un cebador es específico para una unión exón 3-exón 4 de PCA3; y
- (ii) una sonda que es específica para la unión exón 3-exón 4 de dicho PCA3.
7. Un equipo de diagnóstico para detectar la presencia de un ARN de PCA3 específico de cáncer de próstata sometido a corte y empalme que carece del intrón 3, entre el exón 3 y el exón 4, en una muestra de orina de un
- 25 paciente, que comprende:
- (i) al menos un par de cebadores que están diseñados para permitir la amplificación de dicho ARN de PCA3 a través de una unión exón 3-exón 4 de PCA3; y
- (ii) una sonda que es específica para la unión exón 3-exón 4 de dicho PCA3.

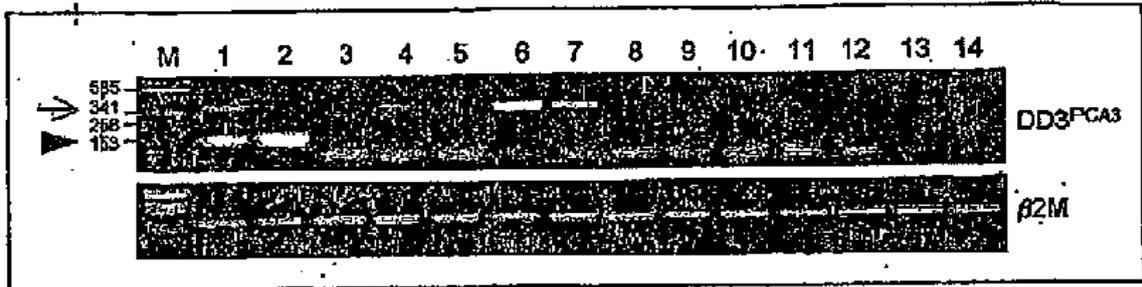


Figura 1

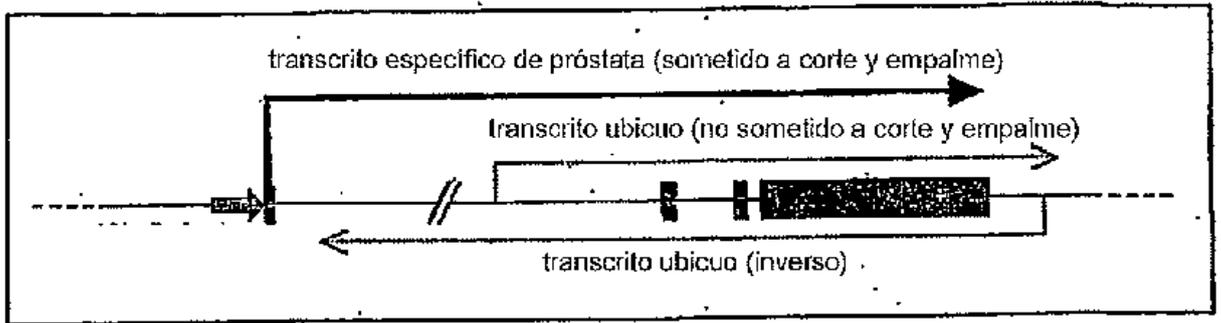


Figura 2

Figura 3

