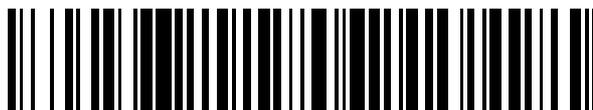


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 853**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2004 E 04709177 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1592809**

54 Título: **Procedimiento para detectar cáncer de próstata en una muestra**

30 Prioridad:

07.02.2003 US 445436 P

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

04.11.2013

73 Titular/es:

**DIAGNOCURE INC. (100.0%)
4535, boul. Wilfrid-Hamel Bureau 250
Québec, Québec G1P 2J7, CA**

72 Inventor/es:

**FRADET, YVES;
CHYPRE, CAMILLE;
PICHE, LYSON y
GARON, GENEVIÈVE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 427 853 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

Procedimiento para detectar cáncer de próstata en una muestra

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a cáncer de próstata. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para detectar cáncer de próstata en una muestra de un paciente detectando un ARN codificado por el gen PCA3 del antígeno de cáncer de próstata.

10

Antecedentes de la invención

15

Durante la última década, el cáncer de próstata se ha convertido en la neoplasia maligna diagnosticada con más frecuencia en varones y la segunda causa más importante de muerte por cáncer en varones de la población occidental, tras el cáncer de pulmón.

20

La detección y el tratamiento tempranos del cáncer de próstata antes de que se haya propagado desde la glándula prostática reducen la mortalidad de la enfermedad. Esto es especialmente cierto para varones 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 para cáncer de próstata comenzando a los 50 años de edad. La edad recomendada para el cribado se reduce a los 40 años para varones con antecedentes familiares de cáncer de próstata u otros factores de riesgo.

25

30

Con este interés creciente en el cribado del cáncer de próstata, se están examinando de manera rutinaria más varones 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 evidente 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 tempranos 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, proporcionarse a un coste menor por cada paciente tratado. La clave para llevar a cabo este objetivo sigue siendo proporcionar mejores herramientas para el diagnóstico diferencial.

35

40

El cribado del cáncer de próstata implica actualmente tanto la palpación de la próstata mediante tacto rectal (TR) como el análisis de los niveles plasmáticos del antígeno específico de próstata (PSA/hK3/hKLK3). 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 de la próstata, hiperplasia prostática benigna (HPB) 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), normalmente no incrementa los niveles de PSA sérico. Por lo tanto no es sorprendente que el cribado del PSA sérico como indicador del cáncer de próstata no tenga un valor predictivo absoluto.

45

50

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 determinación del PSA total (tPSA) como ensayo diagnóstico para predecir el cáncer de próstata se lleva utilizando desde 1991. Niveles de 4 ng/ml o mayores en suero sanguíneo se consideran anormales y con valor 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 la especificidad para 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 (HPB). 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, además de 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. En consecuencia, se han realizado esfuerzos para mejorar la sensibilidad de la detección de PSA, como investigar otras fuentes de muestras, por ejemplo eyaculados o lavados uretrales inmediatamente después de la eyaculación (Clements y col., T. Urol. 161 (199), 1337-1343).

60

65

Debido a las desventajas del tPSA, la investigación se ha centrado en intentar desarrollar derivados de PSA para incrementar la sensibilidad y la 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 sin unir o en forma de complejo con inhibidores de proteasas circulantes, de manera más habitual con la alfa-1-antitripsina (ACT). Los médicos han demostrado que la proporción de PSA unido a ACT era significativamente mayor en varones con cáncer de próstata que en varones sin afectación, o en aquellos con HPB. Como guía, 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 varones con niveles de tPSA de 4 a 10 ng/ml. Así, el análisis de fPSA se situó para mejorar la especificidad respecto a 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 predictivo 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 la HPB o al 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%.

Claramente, 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. Seis muestras no suelen ser suficientes para detectar 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 la especificidad del diagnóstico, incluso cuando estas herramientas se usan en combinación. Uniendo esto a la gran incidencia del cáncer de próstata y a la importancia de una detección temprana y precisa, la potencial utilidad de una auténtica herramienta de diagnóstico diferencial es muy significativa.

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 (véase, por ejemplo, el documento WO 98/45420). El PCA3 se localiza en el cromosoma 9 y está compuesto por cuatro exones. Codifica al menos cuatro transcritos diferentes que se generan mediante corte y empalme alternativo y poliadenilación. Mediante análisis RT-PCR, se descubrió que la expresión de PCA3 se limitaba a la próstata y no existía en ninguno de los demás tejidos analizados, entre los que se incluyen testículos, ovarios, mamas y vejiga. El análisis de transferencia de tipo Northern demostró que PCA3 se expresa de manera elevada en la gran mayoría de cánceres de próstata examinados (47 de 50), mientras que no se detecta expresión, o se detecta una expresión muy baja, en la HPB o en las células de próstata normales de los mismos pacientes [Cancer Res 1 de diciembre de 1999; 59 (23): 5975-9]. Además, un estudio reciente en el que se compara el rendimiento clínico de la ARN 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 1 de mayo de 2002; 62 (9): 2695-8).

El gen de PCA3 está compuesto por 4 exones (e1-e4) y 3 intrones (i1-i3). Aunque parece reconocerse al PCA3 como el mejor marcador de cáncer de próstata identificado hasta ahora, esta especificidad se ha rebatido en la bibliografía. Por ejemplo, Gandini y col., 2003, reivindican que la expresión específica de próstata de PCA3 se limita a la del exón 4 del gen de PCA3. No obstante, los solicitantes han demostrado en una solicitud de patente reciente que este no es el caso (solicitud de patente CA 2.432.365).

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 procedimientos y kits para detección del cáncer de próstata más específicos, selectivos y rápidos.

La presente divulgación busca satisfacer estas y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las formas de realización según se definen en las reivindicaciones. Se divulgan procedimientos de diagnóstico y kits para detectar el cáncer de próstata que sean más específicos y selectivos que los procedimientos y kits de la técnica anterior.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para detectar cáncer de próstata en un paciente y especialmente en una muestra de orina del mismo detectando un ARN codificado por el gen PCA3.

La divulgación también se refiere a un procedimiento para diagnosticar la presencia o la predisposición a desarrollar cáncer de próstata en un paciente. También se divulga un procedimiento para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en un paciente.

En una realización concreta, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para detectar cáncer de próstata en muestras de orina detectando la presencia de ARN codificado por el gen PCA3. En una realización, el ARN codificado por el gen PCA3 se detecta usando un procedimiento de amplificación que amplifica de forma simultánea

una segunda secuencia de ácido nucleico específica de la próstata también contenida en la muestra.

Específicamente, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección de cáncer de próstata en una muestra de orina de un paciente humano, que comprende:

5 (a) realizar un ensayo de amplificación del ARN *in vitro* con dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma usando un primer par de cebadores específico de una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata;

10 (b) realizar un segundo ensayo de amplificación del ARN *in vitro* con dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma usando un segundo par de cebadores específico de una segunda secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata; y

15 (c) detectar dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata y dicha secuencia de ácido nucleico específica de la próstata;

20 en el que la detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata o un mayor nivel de la misma en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales se correlaciona con un riesgo de desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en dicho paciente; y en el que una ausencia de detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata o la detección de un nivel más bajo de la misma en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y la detección de dicha segunda secuencia de ácido nucleico específica de cáncer de próstata se correlaciona con una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo.

25 En una realización concreta adicional divulgada en el presente documento, el segundo marcador específico de próstata amplificado se selecciona del grupo que consiste en ARNm de PSA, calicreína 2 humana (hK2/KLK2), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), transglutaminasa 4, fosfatasa ácida o ARN de PCGEM1.

30 En otra realización divulgada en el presente documento, el ARN se detecta usando un procedimiento de amplificación del ARN. En una realización adicional, el procedimiento de amplificación del ARN está acoplado a detección en tiempo real de los productos amplificados usando sondas específicas de fluorescencia. En una realización adicional más, el procedimiento de amplificación es PCR. En una realización adicional, la PCR es PCR en tiempo real o un procedimiento relacionado que permite una detección en tiempo real de los productos amplificados.

35 Por tanto, la invención también está dirigida a un procedimiento de amplificación de ARN *in vitro* para determinar una predisposición a desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en un paciente, que comprende:

40 (a) poner en contacto una muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata seleccionado del grupo que consiste en:

45 (i) un polinucleótido de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13.

(ii) una secuencia de polinucleótido que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de polinucleótidos de (i); y

50 (iii) una secuencia de polinucleótidos completamente complementaria a la de (i) o (ii);

(b) poner en contacto dicha muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata;

55 (c) detectar en dicha muestra de orina la cantidad de dicho PCA3 y dichos segundos polinucleótidos específicos de próstata; y

60 (d) comparar la cantidad de dicho polinucleótido de PCA3 que hibrida con el oligonucleótido con un valor de corte predeterminado, validando dicha detección de PCA3 con dicha detección de dichos segundos polinucleótidos específicos de próstata y de este modo, determinar la presencia o ausencia de cáncer de próstata en la muestra de orina o extracto de la misma.

La invención se refiere además a un procedimiento *in vitro* de monitorizar una variación en el tiempo en el nivel de un ARNm de PCA3 asociado con cáncer de próstata en un paciente, que comprende:

65 (a) poner en contacto una muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o

extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con dicho ARNm de PCA3 asociado con el cáncer de próstata seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un polinucleótido de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13.

(ii) una secuencia de polinucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos de (i); y

(iii) una secuencia de polinucleótidos completamente complementaria a la de (i) o (ii);

(b) poner en contacto dicha muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata;

(c) detectar en dicha muestra de orina las cantidades de dicho ARNm de PCA3 y dicho segundo ARNm específico de próstata;

(d) repetir las etapas (a) y (b) usando una muestra de orina del paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma del paciente en un punto de tiempo posterior; y

(e) comparar la cantidad de dicho ARNm de PCA3 detectado en la etapa (d) con la cantidad de ARNm de PCA3 detectado en la etapa (c) y de este modo monitorizar la variación en el tiempo en el nivel de dicho ARNm de PCA3 asociado con el cáncer de próstata en el paciente,

en el que una ausencia de detección de dicho ARNm de PCA3 se valida mediante la detección de dicho ARNm de PCA3 específico de próstata en dicha muestra de orina.

En una realización relacionada, el ARN codificado por el gen de PCA3 se detecta en un extracto de ácido nucleico mediante un procedimiento de amplificación de ARN *in vitro* denominado Amplificación Basada en Ácido Nucleico (NASBA). Por supuesto, se conocen otros procedimientos de amplificación de ARN y los presentes procedimientos y kits presentes no se limitan a la NASBA. Ejemplos no limitantes de tales procedimientos de amplificación de ARN incluyen la amplificación mediada por transcriptasa (TMA), la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR).

En una realización adicional, los productos amplificados se detectan en una fase homogénea mediante el uso de una sonda fluorescente. En una realización, se usa el abordaje con balizas moleculares. En otra realización, el producto se detecta en fase sólida mediante el uso de un procedimiento fluorescente o colorimétrico. Por tanto, debe entenderse que se pueden usar numerosos procedimientos fluorescentes, colorimétricos o enzimáticos de acuerdo con la presente divulgación para detectar y/o cuantificar los ARN. También se pueden usar otros tipos de sondas y cebadores marcados u otros tipos de procedimientos de detección de acuerdo con la presente divulgación (por ejemplo, ensayos de hibridación tales como transferencias de tipo Northern, transferencias de manchas o transferencias de ranuras y sondas y cebadores marcados radiactivamente).

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

En otra realización, la muestra de orina se obtiene después de un tacto rectal (TR). Por supuesto, se debería entender que los presentes procedimientos y kits también se podrían usar con una muestra de orina obtenida sin tacto rectal o en otros tipos de muestras tales como esperma u orina y esperma mezclados (por ejemplo, primera muestra de orina tras una eyaculación), con tal de que el procedimiento de amplificación y/o el procedimiento de detección sean lo suficientemente sensibles como para detectar los marcadores seleccionados como objetivo (PCA3 y el segundo marcador). Los experimentos demostraron que los procedimientos y kits descritos en el presente documento también se pueden llevar a cabo con estos tipos de muestras. Otras muestras que se pueden usar incluyen sangre o suero.

En una realización, las células recogidas de la muestra de orina se recolectan y se lleva a cabo una extracción de ácido nucleico total. En una realización concreta, la extracción de ácido nucleico total se lleva a cabo usando un procedimiento de bandas en fase sólida con esferas de sílice como describieron BOOM y col., (1990, J. Clin. Microbiol. 28: 495-503). En otra realización, los ácidos nucleicos se purifican usando otro procedimiento de captura del objetivo (véase más adelante). Por supuesto, se debería entender que existen numerosos procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos y por tanto, que se podrían usar otros procedimientos de acuerdo con la presente divulgación. Ejemplos no limitantes incluyen un procedimiento de extracción con fenol/cloroformo y el procedimiento de purificación por captura del objetivo (véase más adelante). Se describen otros procedimientos de este tipo en los libros de texto a los que se hace referencia en el presente documento. También debe reconocerse que en la técnica se conocen bien numerosos procedimientos para estabilizar o proteger las células de próstata contenidas en la muestra de orina o en otra muestra, así como para estabilizar o proteger el ARN presente en estas

células.

En otra realización, los procedimientos de la presente divulgación se llevan a cabo usando una muestra en bruto, no purificada o semipurificada.

5 En una realización concreta, la presente divulgación también se refiere a un kit de diagnóstico de cáncer de próstata para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 en una muestra. Este kit generalmente comprende un primer medio contenedor que tiene dispuesta en el mismo al menos una sonda oligonucleotídica y/o cebador que hibrida con un ácido nucleico de PCA3 (por ejemplo, ARN de PCA3) y un segundo medio contenedor que contiene al menos otro cebador oligonucleotídico y/o sonda que hibrida con la segunda secuencia específica de próstata mencionada anteriormente. En otra realización, un tercer medio contenedor contiene una sonda que hibrida específicamente con el producto de amplificación de PCA3. En una realización preferida, el kit además incluye otros contenedores que comprenden componentes adicionales tales como un oligonucleótido o un cebador adicional y/o uno o más de los siguientes: tampones, reactivos a usar en el ensayo (por ejemplo, reactivos de lavado, polimerasas, controles internos (CI) u otros) y reactivos capaces de detectar la presencia de una o más sondas de ácido nucleico /cebadores. Por supuesto, son posibles numerosas realizaciones de los kits divulgados en el presente documento. Por ejemplo, los diferentes medios contenedores se pueden dividir en reactivos de amplificación y reactivos de detección. En una realización de este tipo, un primer medio contenedor contiene reactivos de amplificación o de hibridación específicos de los ácidos nucleicos diana divulgados en el presente documento (por ejemplo, PCA 3, segundos ácidos nucleicos específicos de próstata y de control interno) y el segundo medio contenedor contiene reactivos de detección. Como alternativa, los reactivos de detección y los reactivos de amplificación pueden estar contenidos en el mismo medio contenedor.

25 De acuerdo con esto, la invención abarca el uso de un kit para evaluar la presencia de cáncer de próstata en un paciente o evaluar el riesgo de dicho paciente de desarrollar dicho cáncer analizando una muestra de orina de dicho paciente, en el que dicho kit comprende:

30 (a) un primer par de cebadores para amplificar el ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata asociado con el cáncer de próstata de dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma;

(b) un segundo de cebadores para amplificar un segundo ARNm específico de cáncer de próstata; y

35 (c) reactivos que permiten una detección de dicho PCA3 y dichos segundos productos de amplificación del ácido nucleico específico de próstata cuando está presente dicho PCA3 y/o dicho ARNm específico de próstata,

40 en el que dicho uso permite una correlación de una detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata o un mayor nivel de la misma en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales se correlaciona con un riesgo de desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en dicho paciente; y una correlación de una ausencia de detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 o la detección de un nivel más bajo de la misma en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y la detección de dicha segunda secuencia de ácido nucleico específica de cáncer de próstata con una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo.

45 La invención abarca además el uso de un kit de diagnóstico para la detección de cáncer de próstata en un paciente o evaluar el riesgo de dicho paciente de desarrollar dicho cáncer analizando una muestra de orina de dicho paciente, en el que dicho kit de diagnóstico comprende:

50 (a) al menos un contenedor que tiene dispuesto en el mismo al menos una sonda oligonucleotídica o cebador que hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata de dicha muestra seleccionado del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de polinucleótidos de PCA3 de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13.

55 (ii) una secuencia de polinucleótidos que es completamente complementaria a la de (i); y

(iii) una secuencia de polinucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con (i) o (ii);

60 (b) al menos una sonda oligonucleotídica o cebador que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata o complementario del mismo de dicha muestra; y

(c) reactivos que permiten una detección de dicho ARNm de PCA3 y de dicho segundo ARNm específico de próstata cuando está presente dicho ARNm de PCA3 y/o dicho ARNm específico de próstata,

65 en el que una ausencia de detección de dicho ARNm de PCA3 o detección de un menor nivel del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y una presencia de dicho segundo ARNm

específico de próstata valida una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo en dicho paciente.

5 La presente divulgación se refiere además a un kit de diagnóstico de cáncer de próstata para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 en una muestra. Este kit generalmente comprende un primer medio contenedor que tiene dispuesta en el mismo al menos una sonda oligonucleotídica y/o cebador que hibrida con un ARNm de PCA3 y un segundo medio contenedor que contiene al menos otro cebador oligonucleotídico y/o sonda que hibrida con el ARNm de la segunda secuencia específica de próstata. En otra realización, un tercer medio contenedor contiene una sonda que hibrida específicamente con el producto de amplificación de PCA3. En otra realización más, un
10 cuarto medio contenedor contiene una sonda que hibrida específicamente con el segundo ARNm específico de próstata. En una realización preferida, el kit además incluye otros contenedores que comprenden componentes adicionales tales como un oligonucleótido o un cebador adicional (por ejemplo, para control interno) y/o uno o más de los siguientes: tampones, reactivos a usar en el ensayo (por ejemplo, reactivos de lavado, polimerasas, ácido nucleico control interno o células u otros) y reactivos capaces de detectar la presencia de una o más
15 sondas/cebadores de ácido nucleico unido. Por supuesto, la separación o ensamblaje de los reactivos en el mismo o diferente medio contenedor está dirigida por los tipos de procedimientos de extracción, amplificación o hibridación y los procedimientos de detección usados, así como por otros parámetros, incluidos estabilidad, necesidad de conservación etc.

20 La presente divulgación abarca múltiples procedimientos y kits. Por ejemplo, la detección y/o amplificación de la presencia de ácido nucleico de PCA3 no tiene que ser idéntica a la del segundo polinucleótido específico de próstata u otras secuencias objetivo. Por tanto, por ejemplo, un procedimiento o kit que se basara en ARN para PCA3 podría basarse en ADN para el segundo marcador de próstata o para otras secuencias objetivo.

25 Un experto en la técnica debería entender que se pueden usar numerosos métodos estadísticos en el contexto de la presente divulgación para determinar si el ensayo es positivo o negativo. El árbol de decisión usado es solo un ejemplo no limitante de dicho método estadístico.

30 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos y la nomenclatura usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que la presente divulgación pertenece entiende habitualmente. 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 y col., 1994, John Wiley & Sons, Nueva York, NY) o The Harper Collins Dictionary of Biology (Hale & Marham, 1991, Harper Perennial, Nueva York, NY), Rieger y col., Glossary of genetics: Classical and molecular, 5ª edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1991; Alberts y col., Molecular Biology of the Cell, 4ª edición, Garland Science, Nueva York, 2002; y Lewin, Genes VII, Oxford University Press, Nueva York, 2000. En general, los procedimientos de biología molecular y similares son procedimientos habituales usados en la técnica. Tales técnicas convencionales se pueden hallar en manuales de referencia tales como, por ejemplo, Sambrook y col. (2000, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratories); y Ausubel y col. (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John
35 Wiley & Sons, New-York).

40 En la presente descripción se usan ampliamente una serie de términos. Con el fin de proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, incluido el alcance a dar a dichos términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

45 **Definiciones**

Las secuencias de nucleótidos se presentan en el presente documento mediante una sola hebra en dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, usando los símbolos de nucleótidos de una letra como se usan habitualmente en la técnica y de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

50 La presente descripción se refiere a una serie de términos de tecnología de ADN recombinante (ADNr) usados de forma rutinaria. No obstante, a efectos de claridad y de consistencia se proporcionan definiciones de determinados ejemplos de dichos términos de ADNr.

55 Como se usa en el presente documento, "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótidos" hace referencia un polímero de nucleótidos. Ejemplos no limitantes de la misma incluyen moléculas de ADN (por ejemplo, ADN genómico, ADNc), de ARN (por ejemplo, ARNm) y quimeras de los mismos. La molécula de ácido nucleico se puede obtener mediante técnicas de clonación o se pueden sintetizar. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario (hebra codificante o hebra no codificante [antisentido]). El ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) convencionales se incluyen en la expresión "ácido nucleico" y los polinucleótidos son análogos de los mismos. Una estructura de ácido nucleico puede comprender varios enlaces conocidos en la técnica, incluidos uno o más de enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces péptido-ácido nucleico (denominados "ácidos nucleicos peptídicos" (PNA); Hydig-Hielsen y col., publicación internacional de PCR WO 95/32305), enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o combinaciones de los mismos. Los restos de azúcar del ácido nucleico pueden ser ribosa o desoxirribosa o compuestos similares que tienen sustituciones conocidas, por ejemplo sustituciones 2'-metoxi (que
60
65

contienen un resto 2'-O-metilribofuranosilo; véase PCT nº WO 98/02582) y/o sustituciones de haluro en 2'. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos conocidos de las mismas (por ejemplo, inosina u otras; véase *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams y col., ed., 11th ed., 1992), o derivados conocidos de bases púricas o pirimidínicas (véase, Cook, publicación internacional de PCT WO 93/13121) o residuos "abásicos" en los que la estructura incluye bases no nitrogenadas de uno o más residuos (Arnold y col., patente de EE.UU. nº 5,585,481). Un ácido nucleico puede comprender únicamente azúcares convencionales, bases y enlaces, como se encuentran en el ARN y el ADN, o pueden incluir componentes y sustituciones convencionales (por ejemplo, bases convencionales unidas mediante una estructura metoxi, o un ácido nucleico que incluye bases convencionales y uno o más análogos de bases). La terminología "ácido nucleico de PCA3" o "polinucleótidos de PCA3" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico de PCA3 nativo. En una realización, el ácido nucleico de PCA3 tiene la secuencia establecida en las SEC ID Nº 9, 10 y 13. En otra realización, el ácido nucleico de PCA3 codifica una proteína PCA3. En una realización adicional, el ácido nucleico de PCA3 es una secuencia de ácido nucleico no codificante. En otra realización más, la secuencia de PCA3 a la que están dirigidas las secuencias de PCA3 abarcadas por la presente invención es una secuencia de PCA3 natural hallada en una muestra de paciente.

La expresión "ADN recombinante" como se conoce en la técnica hace referencia a una molécula de ADN resultante del conjunto de segmentos de ADN. Normalmente, a esto se le denomina ingeniería genética. Lo mismo es cierto para "ácido nucleico recombinante".

La expresión "segmento de ADN" se usa en el presente documento para hacer referencia a una molécula que comprende un tramo lineal o secuencia de nucleótidos. Esta secuencia, cuando se lee de acuerdo con el código genético (por ejemplo, un marco de lectura abierto u ORD) puede codificar un tramo o secuencia lineal de aminoácidos a la que se puede hacer referencia como polipéptido, proteína, fragmento de proteína y similares.

La terminología, "par de amplificación" o "par de cebadores" hace referencia en el presente documento a un par de oligonucleótidos (oligos) de la presente invención, que se seleccionan para usar juntos en la amplificación de una secuencia determinada de ácido nucleico mediante uno de una serie de tipos de procedimientos de amplificación.

"Amplificación" se refiere a cualquier procedimiento *in vitro* para obtener múltiples copias ("amplicones") de una secuencia de ácido nucleico diana o su complementaria o fragmentos de la misma. Amplificación *in vitro* hace referencia a la producción de un ácido nucleico amplificado que puede contener menos que la secuencia de la región diana completa o su complementaria. Los procedimientos de amplificación *in vitro* conocidos incluyen, por ejemplo, amplificación mediada por transcripción, amplificación mediada por replicasa, amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediante reacción en cadena de la ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA). La amplificación mediada por replicasa usa moléculas de ARN autorreplicantes y una replicasa tal como la Q β -replicase (p.ej., Kramer y col., patente de EE.UU. nº 4.786.600). La amplificación por PCR es bien conocida y usa ADN polimerasa, cebadores y ciclado térmico para sintetizar múltiples copias de las dos hebras complementarias de ADN o ADNc (por ejemplo, Mullis y col., las patentes de EE.UU. nº 4.683.195, nº 4.683.202 y nº 4.800.159). La amplificación por LCR usa al menos cuatro oligonucleótidos distintos para amplificar una diana y su hebra complementaria usando múltiples ciclos de hibridación, ligación y desnaturalización (por ejemplo, publicación de la solicitud de patente EP nº 0320308). La SDA es un procedimiento en el que un cebador contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que permite que la endonucleasa haga una muesca en una hebra de un ADN dúplex hemimodificado que incluye la secuencia diana, seguido de amplificación en una serie de etapas de desplazamiento de hebra y extensión por cebador (por ejemplo, Walker y col., patente de EE.UU. nº 5.422.252). Otro procedimiento de amplificación por desplazamiento de hebra conocido no requiere la rotura por la endonucleasa (Dattagupta y col., patente de EE.UU. nº 6.087.133). La amplificación mediada por transcripción se usa en la presente divulgación. Los expertos en la técnica entenderán que las secuencias de cebadores oligonucleotídicos divulgadas en el presente documento pueden usarse fácilmente en cualquier procedimiento de amplificación *in vitro* basado en la extensión del cebador mediante una polimerasa (véanse, en general, Kwoh y col., 1990, *Am. Biotechnol. Lab.* 8:14-25 y Kwoh y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177; Lizardi y col., 1988, *BioTechnology* 6:1197-1202; Malek y col., 1994, *Methods Mol. Biol.*, 28:253-260; y Sambrook y col., 2000, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Third Edition*, CSH Laboratories). Como se conoce habitualmente en la técnica, los oligos están diseñados para unirse a una secuencia complementaria en condiciones seleccionadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fisiológicamente relevante" quiere decir que describe interacciones que pueden modular una función que es fisiológicamente relevante. La presente divulgación abarca, por ejemplo, la transcripción de un gen en su entorno natural. Por supuesto, una unión de una proteína a PCA3 también se puede considerar una función fisiológicamente relevante si esta unión se produce en un entorno natural.

La expresión molécula o secuencia de "ADN" (así como, en ocasiones, el término "oligonucleótido") hace referencia a una molécula comprendida generalmente por los desoxirribonucleótidos adenina (A), guanina (G), timina (T) y/o citosina (C). En el "ARN", T está sustituido por uracilo (U). Como se usa en el presente documento, secuencias concretas de ADN o ARN pueden describirse de acuerdo con el consenso normal de proporcionar únicamente la secuencia en la dirección 5' a 3'.

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 procedimiento es que las moléculas de ADN migran a través del gel como si fuera un tamiz 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.

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 (por ejemplo, hibridación de tipo Southern).

“Hibridación de ácido nucleico” se refiere en general a la hibridación de dos moléculas de ácido nucleico monocatenarias que tienen secuencias de bases complementarias que, en las condiciones adecuadas, formarán una estructura bicatenaria favorecida termodinámicamente. Ejemplos de condiciones de hibridación se pueden encontrar en los dos manuales de laboratorio a los que se ha hecho referencia anteriormente (Sambrook y col., 2000, ant. y Ausubel y col., 1994, ant.) y son conocidas habitualmente en la técnica. En este caso de una hibridación en un filtro de nitrocelulosa (o un soporte de este tipo como nylon), como, por ejemplo, en el bien conocido procedimiento de transferencia de tipo Southern, un filtro de nitrocelulosa se puede incubar durante la noche a 65°C con una sonda marcada en una solución que contiene niveles altos de sales (6 x SSC o 5 x SSPE), 5 x solución de Denhardt, 0,5% de SDS y 100 µg/ml de ADN transportador desnaturizado (p.ej., ADN de esperma de salmón). La sonda de unión inespecífica se puede lavar del filtro mediante varios lavados en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a una temperatura que se selecciona a la vista de la rigurosidad deseada: temperatura ambiental (baja rigurosidad), 42°C (rigurosidad moderada) o 65°C (rigurosidad alta). La concentración de sal y SDS de las soluciones de lavado también se pueden ajustar para acomodarla a la rigurosidad deseada. La temperatura seleccionada y la concentración de sal se basa en la temperatura de fusión (T_m) del híbrido de ADN. Por supuesto, los híbridos de ARN-ADN también se pueden formar y detectar. En estos casos, las condiciones de hibridación y lavado se pueden adaptar de acuerdo con procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica. Preferentemente se usarán condiciones rigurosas (Sambrook y col., 2000, ant.). También se pueden usar otros protocolos o kits de hibridación disponibles comercialmente (por ejemplo, ExpressHyb™ de BD Biosciences Clontech) usando diferentes soluciones de hibridación y lavado como es bien conocido en la técnica.

Con una "sonda" se quiere incluir un oligómero de ácido nucleico que hibrida específicamente con una secuencia objetivo en un ácido nucleico o su complementaria en condiciones que estimulan la hibridación, de modo que se permite la detección de la secuencia objetivo o de su ácido nucleico amplificado. La detección puede ser directa (es decir, resultante de una sonda que hibrida directamente con la secuencia objetivo o amplificada) o indirecta (es decir, resultante de una sonda que hibrida con una estructura molecular intermedia que une la sonda a la secuencia objetivo o amplificada). Generalmente, un "objetivo" de una sonda hace referencia a una secuencia dentro de una secuencia de ácido nucleico amplificada (es decir, un subconjunto de la secuencia amplificada) que hibrida específicamente con al menos una porción de la secuencia de la sonda mediante puentes de hidrógeno convencionales o "apareamiento de bases". Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten una hibridación estable de una secuencia de una sonda con una secuencia objetivo, incluso si las dos secuencias no son completamente complementarias. Una sonda puede estar marcada o no marcada.

Mediante "suficientemente complementaria" se quiere decir una secuencia de bases de ácido nucleico contiguas que es capaz de hibridar con otra secuencia mediante puentes de hidrógeno ente una serie de bases complementarias. Las secuencias de bases complementarias pueden ser complementarias en cada posición de la secuencia usando apareamiento de bases convencional (por ejemplo, apareamiento G:C, A:T o A:U) o pueden contener uno o más residuos (incluidos residuos abásicos) que no son complementarios usando apareamiento de bases convencional pero que permiten que toda la secuencia hibride específicamente con otra secuencia de bases en condiciones de hibridación adecuadas. Las bases contiguas de un oligómero son, al menos, aproximadamente un 80% (81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%), más preferentemente al menos aproximadamente un 90% complementarias de la secuencia con la que el oligómero hibrida específicamente. Las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidas para el experto en la técnica, se pueden predecir fácilmente en base a la composición de la secuencia y las condiciones o se pueden determinar empíricamente usando análisis de rutina (véase Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) en §§ 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 y 11.47-11.57, particularmente a §§ 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 y 11.55-11.57).

Las secuencias de ácido nucleico se pueden detectar usando hibridación con una secuencia complementaria (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas) (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.503.980 (Cantor), nº 5.202.231 (Drmanac y col.), nº 5.149.625 (Church y col.), nº 5.112.736 (Caldwell y col.), nº 5.068.176 (Vijg y col.) y nº 5.002.867 (Macevicz)). Los procedimientos de detección de hibridación pueden usar una matriz de sondas (por ejemplo, en un chip de ADN) para proporcionar información de la secuencia sobre el ácido nucleico objetivo que hibrida de forma selectiva con una secuencia de la sonda exactamente complementaria en un conjunto de cuatro secuencias de sonda relacionadas que difieren en un nucleótido (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.837.832 y nº 5.861.242 (Chee y col.)).

Una etapa de detección puede usar cualquiera de diversos procedimientos conocidos para detectar la presencia de ácido nucleico mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica. Un ejemplo específico de una etapa de detección usa un procedimiento de detección homogéneo como el descrito con detalle anteriormente en Arnold y col. 5 Clinical Chemistry 35: 1588-1594 (1989) y patentes de EE.UU. nº 5.658.737 (Nelson y col.), y nº 5.118.801 y nº 5.312.728 (Lizardi y col.).

Los tipos de procedimientos de detección en los que se pueden usar las sondas incluyen transferencias Southern (detección de ADN), transferencias puntuales o de tipo ranura (ADN, ARN) y transferencias Northern (detección de 10 ARN). También se podrían usar proteínas marcadas para detectar una secuencia de ácido nucleico concreta a la que se une. Guichet y col., 1997, Nature 385 (6616): 548-552; y Schwartz y col., 2001, EMBO 20 (3): 510-519. Otros procedimientos de detección incluyen kits que contienen reactivos divulgados en el presente documento en un contexto de tira reactiva y similares. Por supuesto, podría ser preferible usar un procedimiento de detección que se pueda automatizar. Un ejemplo no limitante del mismo incluye un chip u otro soporte que comprende una o más (por 15 ejemplo, una matriz) de sondas diferentes.

Un "marcador" hace referencia a un resto molecular o compuesto que se puede detectar o que puede conducir a una señal detectable. Un marcador se une, directa o indirectamente, a una sonda de ácido nucleico o al ácido nucleico que se va a detectar (por ejemplo, una secuencia amplificada). El marcaje directo se puede producir mediante 20 enlaces o interacciones que unen el marcador al ácido nucleico (por ejemplo, enlaces covalentes o interacciones no covalentes), mientras que el marcaje indirecto puede producir mediante un "ligador" o resto de unión, tal como oligonucleótido(s) adicionales, que está directa o indirectamente marcado. Los restos de unión pueden amplificar una señal detectable. Los marcadores pueden incluir cualquier resto detectable (por ejemplo, un radionúclido, ligando tal como biotina o avidina, enzima o sustrato enzimático, grupo reactivo, cromóforo, tal como un pigmento o 25 partícula coloreada, compuesto luminiscente incluyendo un compuesto bioluminiscente, fosforescente o quimioluminiscente y compuesto fluorescente). Preferentemente, el marcador en una sonda marcada es detectable en un sistema de ensayo homogéneo, es decir en una mezcla, el marcador unido exhibe un cambio detectable comparado con un marcador no unido.

30 Se conocen otros procedimientos de marcado de ácidos nucleicos, de modo que un marcador se une a una hebra de ácido nucleico cuando se fragmenta, lo que es útil para marcar ácidos nucleicos a detectar mediante hibridación con una matriz de sondas de ADN inmovilizadas (por ejemplo, véase la PCT nº PCT/IB99/02073).

Un "marcador detectable homogéneo" hace referencia a un marcador cuya presencia se puede detectar de un modo 35 homogéneo en base a si la sonda marcada está hibridada con una secuencia objetivo. Un marcador detectable homogéneo se puede detectar sin eliminar físicamente las formas hibridadas de las no hibridadas de la sonda marcada. Los marcadores detectables homogéneos y los procedimientos para detectarlos se han descrito con detalle en otros lugares (por ejemplo, véanse las patentes de EE. UU. nº 5.283.174, 5.656.207 y 5.658.737).

40 Como se usa en el presente documento, "oligonucleótidos" u "oligos" definen una molécula que tiene dos o más nucleótidos (ribo o desoxirribonucleótidos). El tamaño del oligo vendrá dictado por la situación concreta y en última instancia, por el uso concreto del mismo y el experto en la técnica lo adaptará en consecuencia. Un oligonucleótido se puede sintetizar químicamente o derivar mediante clonación de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Aunque normalmente están en forma monocatenaria, pueden estar en forma bicatenaria e incluso contener una 45 "región reguladora". Pueden contener nucleótidos raros naturales o sintéticos. Pueden estar diseñados para potenciar un criterio elegido como, por ejemplo, la estabilidad.

Como se usa en el presente documento, un "cebador" define un oligonucleótido que es capaz de hibridar con una 50 secuencia objetivo, de modo que crea una región bicatenaria que puede servir como punto de iniciación para la síntesis de ácido nucleico en las condiciones adecuadas. Los cebadores pueden estar diseñados para, por ejemplo, ser específicos de ciertos alelos para usar en un sistema de amplificación específico de alelo. Por ejemplo, un cebador puede estar diseñado de forma que sea complementario de un ARN corto de PCA3 que está asociado con un estado maligno de la próstata, mientras que un ARN largo de PCA3 está asociado con un estado no maligno (benigno) de la misma (PCT/CA00/01154 publicado con el nº WO 01/23550). La región 5' del cebador puede ser no 55 complementaria de la secuencia de ácido nucleico objetivo e incluir bases adicionales, tales como una secuencia promotor (que se denomina "cebador del promotor"). Los expertos en la técnica apreciarán que cualquier oligómero que puede funcionar como cebador se puede modificar para que incluya una secuencia promotora en 5' y por tanto, funcionar como un cebador de promotor. De un modo similar, cualquier cebador de promotor puede servir como cebador, con independencia de su secuencia promotor funcional. Por supuesto, el diseño de un dejador de una 60 secuencia de ácido nucleico conocida es bien conocido en la técnica. En cuanto a los oligos, puede comprender una serie de tipos de diferentes nucleótidos.

Amplificación asociada con la transcripción. La amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo usando al 65 menos dos cebadores se puede conseguir usando varios procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos, pero, preferentemente, usa una reacción de amplificación asociada con la transcripción que es sustancialmente isotérmica. Usando dicho procedimiento de amplificación *in vitro* se producen muchas hebras de

ácido nucleico a partir de una sola copia de ácido nucleico objetivo, de modo que permite la detección del objetivo en la muestra mediante la unión específica de las secuencias amplificadas a una o más sondas de detección. Los procedimientos de amplificación asociada con la transcripción se han descrito con detalle en otros lugares (por ejemplo, las patentes de EE. UU. nº 5.399.491 y 5.554.516)). Brevemente, la amplificación asociada con la transcripción usa dos tipos de cebadores (siendo uno un cebador de promotor porque contiene una secuencia promotor para una ARN polimerasa), dos actividades enzimáticas (una transcriptasa inversa (RT) y una ARN polimerasa), sustratos (desoxirribonucleósido trifosfatos, ribonucleótido trifosfatos) y sales y tampones adecuados en solución para producir múltiples transcritos de ARN a partir de un molde de ácido nucleico. Inicialmente, un cebador promotor hibrida específicamente con una secuencia objetivo (por ejemplo, ARN) y la transcriptasa inversa crea una primera hebra de ADN complementaria (ADNc) mediante extensión desde el extremo 3' del cebador promotor. El ADNc se hace disponible para hibridación con el segundo cebador mediante cualquiera de diversos procedimientos, tales como mediante desnaturalización del dúplex objetivo-ADNc o usando actividad RNasa H suministrada mediante la RT que degrada el ARN en un dúplex de ADN:ARN. Un segundo cebador se une al ADNc y se sintetiza una nueva hebra de ADN desde el extremo del segundo cebador usando la actividad RT para crear un ADN bicatenario (dsADN) que tiene una secuencia promotora funcional en un extremo. Una ARN polimerasa se une a la secuencia promotora del dsADN y la transcripción produce múltiples transcritos ("amplicones"). Los amplicones se usan en etapas o ciclos posteriores del procedimiento de amplificación asociada con la transcripción sirviendo como un molde nuevo para la replicación, de modo que se generan muchas copias del ácido nucleico amplificado (es decir, a partir de cada molde se sintetizan aproximadamente 100 a 3.000 copias de ARN).

NASBA. La amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) se puede llevar a cabo de acuerdo con técnicas conocidas (Malek y col. *Methods Mol Biol*, 28: 253-260). En una realización, la amplificación NASBA comienza con la hibridación de un cebador antisentido P1 (que contiene el promotor de la ARN polimerasa de T7) o el ARNm objetivo. Después, la transcriptasa inversa (RTasa) sintetiza una hebra de ADN complementario. El híbrido bicatenario ADN/ARN es reconocido por la RNasa H que digiere la hebra de ARN, dejando una molécula de ADN monocatenaria a la que se puede unir el cebador sentido P2. P2 sirve como ancla para la RTasa que sintetiza una segunda hebra de ADN. El ADN bicatenario resultante tiene un promotor de ARN polimerasa de T7 funcional reconocido por la respectiva enzima. La reacción NASBA puede ahora entrar en la fase de *amplificación cíclica* que comprende seis etapas: (1) Síntesis de moléculas cortas de ARN monocatenario antisentido (de 10^1 a 10^3 copias por molde de ADN) mediante la ARN polimerasa de T7; (2) hibridación del cebador P2 con estas moléculas de ARN; (3) síntesis de una hebra de ADN complementario por la RTasa; (4) digestión de la hebra de ARN en el híbrido de ADN/ARN; (5) hibridación del cebador P1 con el ADN monocatenario; y (6) generación de moléculas de ADN bicatenario por la RTasa. Dado que la reacción NASBA es isotérmica (41°C), es posible la amplificación específica del ssARN si se evita la desnaturalización del dsADN en el procedimiento de preparación de la muestra. Por tanto, es posible coger el ARN en un fondo de dsADN sin obtener resultados falsos positivos causados por el dsADN genómico.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa se puede realizar de acuerdo con técnicas conocidas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.683.195, nº 4.683.202, nº 4.800.159 y nº 4.965.188 (cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia). En general, la PCR implica un tratamiento de una muestra de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de una ADN polimerasa termoestable) en condiciones de hibridación, con un cebador oligonucleotídico para cada hebra de la secuencia específica a detectar. Un producto de extensión de cada cebador que se sintetiza es complementario a cada una de las dos hebras de ácido nucleico, con los cebadores suficientemente complementarios a cada hebra de la secuencia específica con la que hibridar. El producto de extensión sintetizado de cada cebador también puede servir como molde para la síntesis posterior de los productos de extensión usando los mismos cebadores. Tras un número suficiente de rondas de síntesis de los productos de extensión se analiza la muestra para evaluar si están presentes la secuencia o las secuencias que se van a detectar. La detección de la secuencia amplificada se puede llevar a cabo mediante visualización tras tinción con EtBe del ADN después de la electroforesis en gel o usando un marcador detectable de acuerdo con técnicas conocidas y similares. Para una revisión de las técnicas de PCR (véanse los protocolos de PCR, *A Guide to Methods and Amplifications*, Michael y col. Eds, Acad. Press, 1990).

La reacción en cadena de la ligasa (LCR) se puede realizar de acuerdo con técnicas conocidas (Weiss, 1991, *Science* 254:1292). Un experto en la técnica puede llevar a cabo la adaptación del protocolo para satisfacer las necesidades deseadas. También se lleva a cabo la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) de acuerdo con técnicas conocidas o adaptaciones de las mismas para satisfacer las necesidades concretas (Walker y col., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396; and *ibid.*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:1691-1696).

Captura del objetivo. En una realización, la captura del objetivo está incluida en el procedimiento para incrementar la concentración o la pureza del ácido nucleico objetivo antes de la amplificación *in vitro*. Preferentemente, la captura del objetivo implica un procedimiento relativamente simple de hibridar y aislar el ácido nucleico objetivo, como se describe con detalle en otros lugares (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.110.678, nº 6.280.952 y nº 6.534.273). En términos generales, la captura del objetivo se puede dividir en dos familias, específica de secuencia y no específica de secuencia. En un procedimiento no específico se usa un reactivo (por ejemplo, esferas de sílice) para capturar ácidos nucleicos de forma no específica. En el procedimiento específico de secuencia, un oligonucleótido unido a un soporte sólido se pone en contacto con una mezcla que contiene el ácido nucleico

objetivo en condiciones de hibridación adecuadas para permitir que el ácido nucleico objetivo se una al soporte sólido para permitir la purificación del objetivo de otros componentes de la muestra. La captura del objetivo se puede ser el resultado de la hibridación directa entre el ácido nucleico objetivo y un oligonucleótido unido al soporte sólido pero, preferentemente, es el resultado de la hibridación indirecta con un oligonucleótido que forma un complejo de hibridación que une el ácido nucleico objetivo al oligonucleótido sobre el soporte sólido. Preferentemente, el soporte sólido es una partícula que se puede separar de la solución, más preferentemente una partícula paramagnética que se puede recuperar aplicando un campo magnético al vaso. Después de la separación, el ácido nucleico objetivo unido al soporte sólido se lava y amplifica cuando la secuencia objetivo se pone en contacto con los cebadores, sustratos y enzimas adecuados en una reacción de amplificación *in vitro*.

En general, las secuencias oligoméricas de captura incluyen una secuencia que se une específicamente a la secuencia objetivo, cuando el procedimiento de captura es, de hecho, específico y una secuencia "cola" que une el complejo a una secuencia inmovilizada mediante hibridación. Es decir, el oligómero de captura incluye una secuencia que se une específicamente a su PCA3 o a otra secuencia objetivo marcador específico de la próstata (por ejemplo, PSA, hK2/KLK2, PMSA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, PCGEM1) y una secuencia cola en 3' unida covalentemente (por ejemplo, un homopolímero complementario a una secuencia homopolimérica inmovilizada). La secuencia cola que tiene una longitud de, por ejemplo, 5 a 50 nucleótidos, hibrida con la secuencia inmovilizada para unir el complejo que contiene el objetivo al soporte sólido y de este modo, purificar el ácido nucleico objetivo hibridado de otros componentes de la muestra. Un oligómero de captura puede usar cualquier enlace de la estructura, pero algunas realizaciones incluyen uno o más enlaces 2'-metoxi. Por supuesto, otros procedimientos de captura son bien conocidos en la técnica. El procedimiento de captura en la estructura del capuchón (Edery y col., 1988, gene 74 (2): 517-525, US 5.219.989) o el procedimiento basado en sílice son dos ejemplos no limitantes de los procedimientos de captura.

Una "sonda inmovilizada" o "ácido nucleico inmovilizado" hace referencia a un ácido nucleico que une, directa o indirectamente, un oligómero de captura a un soporte sólido. Una sonda inmovilizada es un oligómero unido a un soporte sólido que facilita la separación de la secuencia objetivo unida del material no unido en una muestra. Se puede usar cualquier soporte sólido conocido, tal como matrices y partículas libres en solución, hecho de cualquier material conocido (por ejemplo, nitrocelulosa, nylon, cristal, poliacrilato, polímeros mixtos, poliestireno, polipropilensilano y partículas metálicas, preferentemente partículas paramagnéticas). Los soportes preferidos son esferas paramagnéticas monodispersas (es decir, de tamaño uniforme \pm aproximadamente 5%), de modo que proporcionan resultados consistentes, a las que una sonda inmovilizada se une de forma estable directamente (por ejemplo, mediante un enlace covalente directo, quelación o interacción iónica) o indirectamente (por ejemplo, mediante uno o más ligadores), que permiten la hibridación con otro ácido nucleico en solución.

El término "alelo" define una forma alternativa de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma.

Gen. Una secuencia de ADN generalmente relacionada pero no necesariamente relacionada con una única cadena polipeptídica o proteína y tal como se usa en el presente documento, incluye las regiones en 5' y 3' sin traducir. El polipéptido puede estar codificado por una secuencia de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante, con tal de que se mantenga la actividad funcional de la proteína.

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

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.

Como se sabe habitualmente, una "mutación" es un cambio detectable en el material genético que se puede transmitir a una célula hija. Como es bien conocido, una mutación puede ser, por ejemplo, un cambio detectable en uno o más desoxirribonucleótidos. Por ejemplo, los nucleótidos se pueden añadir, delecionar, sustituir o invertir o transponer a una posición nueva. Existen mutaciones espontáneas y mutaciones inducidas experimentalmente. Un polipéptido mutante puede estar codificado a partir de esta molécula de ácido nucleico mutante.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" se refiere a una molécula (por ejemplo, ácido nucleico) que se ha separado de un componente de la composición en la que estaba originalmente presente. Por tanto, por ejemplo, un "ácido nucleico purificado" se ha purificado hasta un nivel en el que no se encuentra en la naturaleza. Una molécula "sustancialmente pura" es una molécula que no se encuentra en la mayoría de los demás componentes (por ejemplo, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100% libre de contaminantes) Por el contrario, el término "en bruto" significa moléculas que no se han separado de los componentes de la composición original en la que estaba presente. Por brevedad, las unidades (por ejemplo, 66, 67...81, 82, ...91, 92%...) no se han citado específicamente, pero, no obstante, se consideran dentro del alcance de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, "marcador específico de próstata" se refiere a cualquier molécula cuya presencia en la muestra indica que dicha muestra contiene células de próstata (o un marcador de las mismas). Por tanto, una "secuencia específica de próstata" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico o de proteína que

se encuentra específicamente en células de próstata y normalmente no en otros tejidos que puedan “contaminar” una muestra concreta. Por seguridad, cuando se usa una muestra de orina, el segundo marcador específico de próstata de acuerdo con la presente invención no tiene que expresarse únicamente en la próstata. De hecho, los marcadores que se expresan únicamente en un órgano o tejido son muy raros. No obstante, si el segundo marcador específico de próstata se expresa en un tejido no prostático, esta expresión en el tejido no prostático no alterará la especificidad de este segundo marcador siempre que se produzca en células de tejidos u órganos que normalmente no están presentes en la muestra de orina. Por tanto, cuando la muestra es orina, este segundo marcador específico de próstata normalmente no se expresa en otros tipos de células (por ejemplo, las células del sistema del tracto urinario) que se van a encontrar en la muestra de orina.

Muestra control. Con la expresión “muestra control” o “muestra normal” se quiere decir una muestra que no contiene un cáncer específicamente elegido. En una realización concreta, la muestra control no contiene cáncer de próstata o es indicativa de la ausencia de cáncer de próstata. Las muestras control se pueden obtener de pacientes/individuos no afectados por cáncer de próstata. También se pueden usar otros tipos de muestras control. Por ejemplo, se puede usar un marcador específico de próstata para garantizar que la muestra contenga células específicas de próstata (este marcador generalmente se describe en el presente documento como el segundo marcador específico de próstata). En un aspecto relacionado, una reacción control puede estar diseñada para controlar el propio procedimiento (por ejemplo, la extracción celular, la captura, la reacción de amplificación o el procedimiento de detección, el número de células presentes en la muestra, una combinación de los mismos o cualquier etapa que pueda monitorizarse para validar positivamente que la ausencia de una señal (por ejemplo, la ausencia de la señal de PCA3) no es el resultado de un defecto en una o más de las etapas).

Valor de corte. El valor de corte para la predisposición o presencia del cáncer de próstata se define en una población de pacientes sin cáncer de próstata como la señal media de polinucleótidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos de PCA3 (u otro antígeno de cáncer de próstata) más n desviaciones estándar (o la señal media promedio de la misma). Los valores de corte indicativos de la presencia o predisposición a desarrollar cáncer de próstata pueden ser los mismos o, como alternativa, pueden ser valores diferentes.

Variante. El término “variante” hace referencia en el presente documento a una proteína o molécula de ácido nucleico que es sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a la proteína o ácido nucleico divulgados en el presente documento, para mantener al menos una de sus actividades biológicas. Por tanto, siempre que dos moléculas posean una actividad común y que puedan sustituirse entre sí, se consideran variantes como se usa ese término en el presente documento, incluso si la composición, o la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una molécula no es idéntica a la que se encuentra en la otra, o si la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos no es idéntica.

Con una “muestra biológica” o “muestra de un paciente” se quiere incluir cualquier tejido o material derivado de un ser humano vivo o muerto que puede contener el ácido nucleico objetivo de PCA3 y el segundo marcador específico de próstata. Las muestras incluyen, por ejemplo, cualquier tejido o material que puede contener células específicas para el objetivo PCA3 (o segundo marcador específico), tal como sangre periférica, plasma o suero, tejido de biopsia, tejido gastrointestinal, médula ósea, orina, heces, semen u otros fluidos corporales, tejidos o materiales, pero, preferentemente, es una muestra de orina tras un tacto rectal (u otros medios que aumentan el contenido de las células de próstata en orina). La muestra biológica se puede tratar para romper físicamente la estructura tisular o celular, de modo que libera los componentes intracelulares en una solución que puede contener además enzimas, tampones, sales, detergentes y similares, que se usan para preparar la muestra para análisis.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura del gen de PCA3 y la localización de los oligonucleótidos y sondas para amplificación de ARN *in vitro* y la detección del producto amplificado.

Panel A. Zona objetivo del cebador de PCA3 sentido (SEC ID N° 4); Panel B. Zona objetivo de la baliza molecular de PCA3 (SEC ID N° 6); y Panel C. Zona objetivo del cebador de PCA3 antisentido (SEC ID N° 3).

La figura 2 muestra un árbol de decisiones usado para calcular la positividad del procedimiento en un paciente con niveles de PSA total en sangre por debajo de 4 ng/ml.

La figura 3 muestra un árbol de decisiones usado para calcular la positividad del procedimiento en un paciente con niveles de PSA total en sangre entre 4-10 ng/ml.

La figura 4 muestra un árbol de decisiones usado para calcular la positividad del procedimiento en un paciente con niveles de PSA total en sangre por encima de 10 ng/ml.

Descripción de realizaciones ilustrativas

A efectos de claridad de la divulgación, la descripción detallada se divide en las subsecciones siguientes:

I. Procedimiento para evaluar la presencia de cáncer de próstata en una muestra mediante la detección de ácido nucleico de PCA3.

5 II. Síntesis de ácido nucleico.

III. Sondas y cebadores.

IV. Kit para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 en una muestra.

10 1. Procedimiento para evaluar la presencia de cáncer de próstata en una muestra mediante la detección de ácido nucleico de PCA3

15 En el presente documento se divulgan procedimientos para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 junto con un segundo marcador específico de próstata (por ejemplo, PSA, hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, PCGEM1) en una muestra biológica así como procedimientos para medir el nivel de un ácido de PCA3 en la muestra. Dichos procedimientos son útiles para el diagnóstico de cáncer de próstata asociado con la sobreexpresión de PCA3.

20 La predisposición a desarrollar cáncer de próstata o la presencia de dicho cáncer se puede detectar en base a la presencia de una cantidad elevada de ácido nucleico de PCA3 en una muestra biológica (por ejemplo, orina) de un paciente. Se pueden usar cebadores polinucleotídicos y sondas para detectar el nivel de ARN de PCA3 presente, que es indicativo de la predisposición, presencia o ausencia de cáncer de próstata. En general, la cantidad elevada de ácido nucleico de PCA3 (por ejemplo, ARN, de PCA3 o fragmentos del mismo) en una muestra en comparación con la cantidad presente en muestras control normales (o un valor de corte determinado) indica que la muestra contiene cáncer de próstata o es susceptible a desarrollar cáncer de próstata. En una realización, la detección de un segundo marcador específico de próstata también se realiza para servir como control de la presencia de células específicas de próstata en la muestra, así como para validar también los resultados de la detección de PCA3 (por ejemplo, resultado negativo obtenido con la detección de PCA3).

30 Por supuesto, se pueden usar numerosos marcadores específicos de próstata diferentes siempre que puedan servir como control para el ARN de próstata. Ejemplos no limitantes de dichos marcadores específicos de próstata incluyen PSA (SEC ID N° 11) y otros miembros de la familia de la calicreína. Además y como se ha descrito anteriormente, también se pueden usar marcadores tales como hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, PCGEM1 de acuerdo con la presente divulgación.

40 Un ejemplo no limitante de un procedimiento para detectar ácido nucleico de PCA3 (por ejemplo, ARNm de PCA3) en una muestra biológica es mediante (1) poner en contacto una muestra biológica con al menos una sonda oligonucleotídica o cebador que hibrida con un polinucleótido de PCA3; y (2) detectar en la muestra biológica un nivel de oligonucleótido (es decir, sonda(s) o cebador(es) que hibridan con el polinucleótido de PCA3. La muestra también se analiza para detectar la presencia del segundo marcador específico de próstata (por ejemplo, PSA, hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, ARNm de PCGEM1 o fragmentos del mismo) para controlar la presencia de células de próstata en la muestra (o su número), así como para controlar además un resultado negativo o positivo obtenido con la detección de PCA3. El segundo marcador específico de próstata también puede ser un ARN de PCA3 específico de próstata que no está asociado con el cáncer de próstata pero se expresa en las células de próstata. La cantidad de polinucleótido de PCA3 detectada se puede comparar con un valor de corte predeterminado y a partir de esto, se determina la predisposición, presencia o ausencia de un cáncer de próstata en el paciente.

50 En un aspecto relacionado, los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden usar para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en un paciente. En esta realización concreta, los ensayos descritos anteriormente se realizan en el tiempo y se evalúa la variación en el nivel de ácido nucleico de PCA3 y de otro marcador específico de próstata (por ejemplo, ARNm de PSA) presente en la muestra (por ejemplo, muestra de orina). En general, el cáncer de próstata se considera en progresión cuando el nivel relativo (es decir, en relación con la cantidad de células o componentes celulares (por ejemplo, proteína o ácidos nucleicos presentes en los mismos) del ácido nucleico de PCA3 detectado aumenta con el tiempo. En contraste, un cáncer no se considera en progresión cuando el nivel relativo de ácido nucleico de PCA3 disminuye o permanece constante en el tiempo.

60 Un experto en la técnica puede seleccionar los cebadores de ácido nucleico de acuerdo con técnicas conocidas en la materia como se han descrito anteriormente. Las muestras que se van a analizar incluyen, aunque sin limitaciones, muestras de ARN de tejido humano.

65 En un aspecto relacionado, es posible verificar la eficiencia de la amplificación y/o la detección del ácido nucleico únicamente realizando reacción(es) de control externo usando ácidos nucleicos objetivo control altamente purificados añadidos a la mezcla de reacción de amplificación y/o detección. Como alternativa, la eficiencia de la recuperación del ácido nucleico de las células y/u orgánulos, el nivel de inhibición de la amplificación y/o detección

del ácido nucleico (si hay) se pueden verificar y estimar añadiendo a cada muestra de ensayo células u orgánulos control (por ejemplo, un número definido de células de una línea celular de cáncer de próstata que expresa PCA3 y un segundo marcador) por comparación con reacción(es) control externas. Para verificar la eficiencia de masas, preparación de la muestra y amplificación y/o detección, dichas reacción(es) control externas se pueden realizar usando una muestra de ensayo de referencia o una muestra blanco enriquecida con células, orgánulos y/o partículas virales portadoras de la o las secuencias del ácido nucleico control. Por ejemplo, una señal de las secuencias control interno (CI) presente en las células, virus y/u orgánulos añadidos a cada muestra de ensayo que es menor que la señal observada con la(s) reacción(es) control externas se puede explicar mediante lisis incompleta y/o inhibición de los procesos de amplificación y/o detección para una muestra de ensayo dada. Por otro lado, una señal de las secuencias CI que es similar a la señal observada con la(s) reacción(es) control externas confirmaría que la preparación de la muestra, incluida la lisis celular, es eficiente y que no hay una inhibición significativa de los procesos de amplificación y/o detección para una muestra de ensayo dada. Como alternativa, la verificación de la eficiencia de la preparación de la muestra solo se puede realizar usando control(es) externo(s) analizados mediante otros procedimientos aparte del análisis de ácido nucleico (por ejemplo, análisis usando microscopia, espectrometría de masas o ensayos inmunológicos).

Por tanto, en una realización concreta, los procedimientos divulgados en el presente documento usan ácidos nucleicos purificados, células de próstata o partículas virales que contienen secuencias de ácido nucleico que sirven como objetivos para un control interno (CI) en ensayos de ácido nucleico para verificar la eficiencia de la lisis celular y de la preparación de la muestra, así como el rendimiento de la amplificación y/o detección del ácido nucleico. Más ampliamente, el CI sirve para verificar cualquier etapa escogida del procedimiento divulgado en el presente documento.

El CI en la PCR o técnicas de amplificación relacionadas puede ser ADN plasmídico altamente purificado, superenrollado o linealizado mediante digestión con una endonucleasa de restricción y repurificado. Los moldes de CI superenrollado se amplifican con mucha menos eficiencia (aproximadamente 100 veces) y de un modo menos reproducible que los moldes de CI de ácido nucleico repurificado. En consecuencia, los controles CI para amplificación y detección se realizan, preferentemente, con moldes de ácido nucleico CO linealizados y repurificados cuando se usan estos tipos de CI.

Los ácidos nucleicos, células y/u orgánulos se incorporan en cada muestra de ensayo a la concentración adecuada para obtener una amplificación/detección eficiente y reproducible del CI, en base a las pruebas realizadas durante la optimización del ensayo. El número óptimo de células control añadidas, que depende del ensayo, es, preferentemente, el número mínimo de células que permite una señal de detección de CI altamente reproducible sin que tenga ningún efecto perjudicial significativo sobre la amplificación y/o detección de los otros objetivos genéticos del ensayo basado en ácido nucleico. Una muestra a la que se añaden los ácidos nucleicos linealizados purificados, partículas virales u orgánulos generalmente se denomina una "muestra enriquecida".

En ciertas realizaciones, la cantidad de ARNm se puede detectar mediante un ensayo basado en RT-PCR. En la RT-PCR, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplica junto con transcripción inversa. En dicho ensayo se pueden usar al menos dos cebadores oligonucleotídicos para amplificar una porción de ADNc de PCA3 derivado de una muestra biológica, en el que al menos un oligonucleótido es específico (es decir, híbrida) de un ARN de PCA3. El ADNc amplificado se puede separar después y detectar usando técnicas que son bien conocidas en la técnica, tal como electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. La amplificación se puede realizar con muestras biológicas tomadas de un paciente de ensayo y un individuo que no está afectado por cáncer de próstata (muestra control) o usando otros tipos de muestras control. La reacción de amplificación se puede realizar en varias diluciones de ADNc (o directamente en varias diluciones de la muestra biológica), por ejemplo dos órdenes de magnitud. Un valor por encima de un valor de corte predeterminado es indicativo de la presencia o predisposición a desarrollar cáncer de próstata. En general, la expresión elevada de ácido nucleico de PCA3 en una muestra biológica en comparación con las muestras control indica la presencia o la predisposición a desarrollar cáncer de próstata.

En realizaciones adicionales, el ARN de PCA3 se detecta en un extracto de ácido nucleico de una muestra biológica mediante un procedimiento de amplificación de ARN *in vitro* denominado Amplificación Basada en Ácido Nucleico (NASBA). También se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ARN, bien conocidos en la técnica e incluyen amplificación mediada por transcriptasa (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), el sistema replicasa Q β y reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, en general, Kwoh y col., 1990, *Am. Biotechnol. Lab.* 8:14-25 y Kwoh y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177; Lizardi y col., 1988, *BioTechnology* 6:1197-1202; Malek y col., 1994, *Methods Mol. Biol.*, 28:253-260; and Sambrook y col., 2000, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Third Edition, CSH Laboratories).

La amplificación y/o detección de secuencias de ARN de PCA3 específicas de cáncer de próstata y del marcador específico de próstata se pueden llevar a cabo de forma simultánea (por ejemplo, ensayos de amplificación en tiempo real multiplexado).

Como alternativa, las sondas oligonucleotídicas que hibridan específicamente en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de PCA3 se pueden usar en un ensayo de hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, transferencias de tipo

Southern y Northern, transferencia de puntos, transferencia de ranuras, hibridación in situ y similares) para determinar la presencia y/o cantidad de polinucleótido de PCA3 específico de cáncer de próstata en una muestra biológica.

- 5 Como alternativa, los oligonucleótidos y los cebadores podrían diseñarse para una secuencia directa y evaluar la presencia de secuencias de PCA3 específicas de cáncer de próstata en la muestra del paciente tras una etapa de amplificación. Los procedimientos diagnósticos en base a la secuenciación se pueden automatizar y están abarcados dentro de la presente divulgación.

10 I. Síntesis de ácido nucleico

El ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) para poner en práctica los procedimientos divulgados en el presente documento se pueden obtener de acuerdo con procedimientos bien conocidos.

- 15 Con las moléculas de ácido nucleico aisladas divulgadas en el presente documento se pretende incluir las obtenidas mediante clonación así como las sintetizadas químicamente. De un modo similar, se puede sintetizar un oligómero que corresponde a la molécula de ácido nucleico, o a cada uno de los fragmentos divididos. Dichos oligonucleótidos sintéticos se pueden preparar, por ejemplo, mediante el método de triéster de Matteucci y col., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3191 (1981) o mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado.

- 20 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 cinasa de T4. El tratamiento con cinasa 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 cinasa es para el marcaje de la sonda, el ATP puede contener radioisótopos de actividad muy específica. Después, el oligómero de ADN se puede someter a hibridación y ligadura con una ligasa de T4 o similar. Por supuesto, el marcaje de una secuencia de ácido nucleico se puede realizar mediante otros procedimientos conocidos en la técnica.

30 II. Sondas y cebadores

- 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.

- 35 En una realización preferida, la presente divulgación se refiere a oligos dirigidos específicamente y permiten la amplificación (es decir, cebadores) de secuencias de ARN de PCA3 asociadas al cáncer de próstata

- 40 En otra realización se puede detectar ARN de PCA3 usando una sonda específica en un ensayo de hibridación (por ejemplo, transferencia de tipo Northern, transferencia de puntos, transferencia de ranuras y similares).

- Las sondas o cebadores oligonucleotídicos como se divulgan en el presente documento pueden tener cualquier longitud adecuada dependiendo del formato de ensayo concreto y de las necesidades concretas y secuencias objetivo empleadas. En una realización preferida, las sondas o cebadores oligonucleotídicos tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos (preferentemente, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32...) y se pueden adaptar para que sean especialmente adecuados para un sistema de amplificación de ácido nucleico escogido. Las sondas y cebadores más largos también están dentro del alcance de la presente divulgación son bien conocidos en la técnica. Los cebadores que tienen una longitud de más de 30, más de 40, más de 50 nucleótidos y las sondas que tienen una longitud de más de 100, más de 200, más de 300, más de 500, más de 800 y más de 1.000 nucleótidos también están abarcados por la presente divulgación. Por supuesto, cebadores más largos tienen la desventaja de ser más caros y por tanto, los cebadores que tienen una longitud de entre 12 y 30 nucleótidos y normalmente están diseñados y se usan en la técnica. Como se conoce en la técnica, las sondas que tienen una longitud que varía de 10 a más de 2.000 nucleótidos se pueden usar en los procedimientos de la presente divulgación. En cuanto al % de identidad descrito anteriormente, los tamaños de las sondas y cebadores no descritos específicamente (por ejemplo, 16, 17, 31, 24, 39, 350, 450, 550, 900, 1.240 nucleótidos) también entran dentro del alcance de la presente divulgación. En una realización, las sondas o cebadores oligonucleotídicos divulgados en el presente documento hibridan específicamente con un ARN de PCA3 (o su secuencia complementaria). Más preferentemente, los cebadores y sondas se escogerán para detectar un ARN de PCA3 que está asociado con el cáncer de próstata. En una realización, las sondas y los cebadores usados en los procedimientos divulgados no hibridan con el gen de PCA3 (es decir, permiten el gen de distinción y el PCA3 expresado). Otros cebadores de la presente invención son específicos para un segundo marcador específico de próstata tal como PSA (SEC ID N° 11). Por supuesto, también se pueden usar otras variantes bien conocidas en la técnica (patentes de EE.UU. 6.479.263 y 5.674.682) como segundo marcador específico de próstata. Dadas las similitudes estructurales y de secuencia del gen de PSA con otros miembros de la familia del gen de la calicreína, la selección adecuada de las secuencias de PSA para servir como sondas o cebadores específicos de PSA es crucial para los procedimientos de amplificación y/o detección de ácidos nucleicos específicos de PSA. Ejemplos de

cebadores adecuados para PSA, hK2/KLK2, PSMA, amplificación y detección (por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.551.778) son bien conocidos en la técnica, así como para transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1. En una realización, el oligonucleótido de PSA puede también hibridar con otros miembros de la familia de la calicreína, tal como calicreína 2 (hK2/hKLK2). Un ejemplo de este oligonucleótido es la SEC ID N° 12.

Como se sabe habitualmente en la técnica, las sondas y cebadores de oligonucleótidos se pueden diseñar teniendo en cuenta el punto de fusión de la hibridación de los mismos con su secuencia objetivo (véase más adelante y en Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2ª Edición, CSH Laboratories; Ausubel y col., 1994, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., N.Y.).

Para permitir la hibridación en las condiciones de ensayo de la presente divulgación, los cebadores y sondas oligonucleotídicas deberían comprender una secuencia de oligonucleótidos que tiene una identidad de al menos 70% (al menos 71%, 72%, 73%, 74%), preferentemente al menos 75% (75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81 %, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%) y más preferentemente, al menos 90% (90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) con una porción de un polinucleótido de PCA3. Las sondas y cebadores divulgados en el presente documento son los que hibridan con la secuencia de ácido nucleico de PCA3 (por ejemplo, ADNc o ARNm) en condiciones de hibridación rigurosas y los que hibridan con homólogos del gen de PCA3 en condiciones al menos moderadamente rigurosas. En ciertas realizaciones, las sondas y cebadores como se divulga en el presente documento tienen una identidad de secuencia completa con la secuencia del gen de PCA3 (por ejemplo, ADNc o ARNm). No obstante, las sondas y los cebadores que difieren de la secuencia del gen de PCA3 nativo que conserva la capacidad de hibridar con la secuencia del gen de PCA3 nativo en condiciones rigurosas también se pueden usar en los procedimientos divulgados. Debe entenderse que otras sondas y cebadores podrían diseñarse con facilidad y usarse en los procedimientos divulgados basados en la secuencia de ácido nucleico de PCA3 divulgada en el presente documento (SEC ID N° 9, 10 y 13) usando procedimientos de alineación por ordenador y de análisis de secuencia conocidos en la técnica (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, editado por by Cold Spring Harbor Laboratory, 2000).

Por ejemplo, un cebador puede estar diseñado de forma que sea complementario de un ARN corto de PCA3 que está asociado con un estado maligno del cáncer de próstata, mientras que un ARN largo de PCA3 está asociado con un estado no maligno (benigno) de la misma (PCT/CA00/01154 publicado con el n° WO 01/23550). De acuerdo con la presente divulgación, el uso de tal cebador con los otros reactivos necesarios daría lugar a un producto de amplificación únicamente cuando en la muestra está presente un ARN corto de PCA3 (por ejemplo, SEC ID N° 8) asociado con el cáncer de próstata. El PCA3 más largo (por ejemplo, SEC ID N° 7) no daría lugar a un amplicón. Por supuesto, la amplificación podría diseñarse para amplificar un ARNm de PCA3 corto y largo. En dicho formato, el ARNm de PCA3 largo podría usarse como el segundo marcador específico de próstata.

En una realización como se ha descrito anteriormente, la cuantificación de los productos de amplificación de PCA3 corto frente a largo podría llevarse a cabo con la detección de otro marcador específico de próstata para que sirva como prueba de diagnóstico molecular para el cáncer de próstata. En otra realización, los pares de cebadores (o sondas) específicos de PCA3 podrían diseñarse para evitar la detección del gen de PCA3 o de ARN de PCA3 no sometido a corte y empalme. Por ejemplo, las secuencias de los cebadores que se van a usar en los procedimientos divulgados podrían abarcar dos exones contiguos de modo que no pueda hibridar con una unión exón/intrón del gen de PCA3. El producto de amplificación obtenido mediante el uso de dicho cebador no tendría intrones entre dos exones escogidos (para ejemplos de dichos cebadores y sondas, véanse las tablas 1 y 2 más adelante). Por tanto, las variantes no sometidas a corte y empalme y el ADN genómico no se amplificaría. El experto en la técnica reconocerá que se pueden diseñar numerosas sondas y se pueden usar de acuerdo con una serie de realizaciones divulgadas en el presente documento. Dichas pruebas se pueden adaptar usando la secuencia de PCA3 y la del segundo marcador específico de próstata. Por supuesto, se puede diseñar un par de cebadores (y sondas) diferente de cualquier parte de las secuencias de PCA3 (SEC ID N° 7, 8, 9, 10 and 13) así como de la secuencia de PSA (número de acceso en genbank M27274, SEC ID N° 11) o cualquier otro segundo marcador específico de próstata escogido (p.ej., KLK2 (número de acceso en genbank NM005551), PSMA (número de acceso en genbank BC025672), transglutaminasa 4 (número de acceso en genbank BC007003), fosfatasa ácida (número de acceso en genbank BC016344), PCGEM 1 (número de acceso en genbank AF223389)).

Las sondas de la divulgación se pueden usar con estructuras de azúcar-fosfato naturales, así como estructuras modificadas, incluidas fosforotioatos, ditionatos, fosfonatos de alquilo y α -nucleótidos y similares. En general, Miller, 1988, Ann. Reports Med. Chem. 23:295 and Moran y col., 1987, Nucleic Acids Res., 14:5019. enseñan estructuras de azúcar-fosfato modificadas. Las sondas divulgadas en el presente documento se pueden construir con ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) y preferentemente, con ADN.

Aunque la presente divulgación no depende específicamente del uso de un marcador para la detección de una secuencia de ácido nucleico concreta, dicho marcador podría ser beneficioso, incrementando la sensibilidad de la detección. Además, permite la automatización. Las sondas se pueden marcar de acuerdo con numerosos procedimientos bien conocidos (Sambrook y col., 2000, ant.). Ejemplos no limitantes de marcadores y marcajes detectables incluyen ^3H , ^{14}C , ^{32}P y ^{35}S , ligandos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos. Otros marcadores detectables para usar con sondas, que pueden permitir un incremento de la sensibilidad del

procedimiento de la invención, incluyen biotina y radionucleótidos. Para el experto en la técnica será evidente que la elección de un marcador concreto dicta la madera en la que está unido a la sonda.

Como se sabe habitualmente, los nucleótidos radioactivos se pueden incorporar en las sondas de la invención mediante varios procedimientos. Ejemplos no limitantes de los mismos incluyen el tratamiento con cinasas de los extremos 5' de las sondas usando ³²P ATP y polinucleótido cinasa, usando el fragmento Klenow de Pol I de E. coli en presencia del dNTP radioactivo (por ejemplo, sonda de ADN marcado de forma uniforme usando cebadores oligonucleotídicos aleatorios), usando el sistema SP6/T7 para transcribir un segmento de ADN en presencia de uno o más NTP radioactivos y similares.

En una realización, el marcador usado en un ensayo de detección homogéneo es un compuesto quimioluminiscente (por ejemplo, patentes de EE.UU. n° 5.656.207, n° 5.658.737 y n° 5.639.604), más preferentemente un compuesto de éster de acridinio ("EA") tal como EA estándar derivados de los mismos. Procedimientos de unión de marcadores a ácidos nucleicos y la detección de marcadores son bien conocidos (por ejemplo, véanse Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapt 10 (1993) y las patentes de EE.UU. n° 5.658.737, n° 5.656.207, n° 5.547.842, n° 5.283.174 y n° 4.581.333. y la solicitud de patente europea n° 0747706). Los procedimientos preferidos de marcar una sonda con un compuesto EA unido a través de un ligador se han descrito anteriormente con detalle (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.639.604, ejemplo 8).

La amplificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada, u objetivo, se puede llevar a cabo mediante numerosos procedimientos adecuados. Véase, en general, Kwoh y col., 1990, Am. Biotechnol. Lab. 8: 14-25. Se han descrito numerosas técnicas de amplificación y se pueden adaptar fácilmente para adaptarlas a las necesidades concretas de un experto en la técnica. Ejemplos no limitantes de técnicas de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, RT PCR...), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), la amplificación basada en transcripción, el sistema replicasa Q β y NASBA (Kwoh y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173-1177; Lizardi y col., 1988, BioTechnology 6: 1197-1202; Malek y col., 1994, Methods Mol. Biol., 28: 253-260; and Sambrook y col., 2000, ant.). Otros ejemplos no limitantes de procedimientos de amplificación incluyen la amplificación en círculo rodante (RCA), la amplificación mediada por señal de tecnología de ARN (SMART), la reacción de amplificación compleja por división (SCAR), la amplificación del promotor dividido de ARN (SPAR).

Ejemplos no limitantes de procedimientos adecuados para detectar la presencia de los productos amplificados incluyen los siguientes: gel de agarosa o poliacrilamida, adición de pigmento de marcaje de ADN en la reacción de amplificación (tal como bromuro de etidio, picoverde, verde SYBER etc.) y detección con un aparato adecuado (en la mayoría de los casos un fluorómetro). Otros procedimientos adecuados incluyen reacción de secuenciación (manual o automático), análisis de restricción (siempre que los sitios de restricción se crearan en las secuencias amplificadas) o cualquier procedimiento que implica hibridación con una sonda específica de secuencia (transferencia de tipo Southern o Northern, sondas TaqMan™, balizas moleculares y similares). Por supuesto, otros procedimientos de amplificación están abarcados por la presente divulgación. Las balizas moleculares se ponen de ejemplo en el presente documento como un procedimiento para detectar los productos amplificados de acuerdo con la presente divulgación (véase más adelante).

Por supuesto, en alguna realización, se puede realizar la detección directa (por ejemplo, secuenciación) de secuencias de PCA3 específicas de cáncer así como la de otro marcador específico de la próstata en una muestra usando sondas o cebadores específicos.

En una realización, la presente divulgación ha aprovechado los avances tecnológicos en procedimientos para detectar e identificar los ácidos nucleicos. Por tanto, la presente divulgación es adecuada para la detección mediante una de estas herramientas denominadas balizas moleculares.

Las balizas moleculares son sondas/cebadores de hibridación oligonucleotídicos monocatenarios que forman estructuras tallo-bucle. El bucle contiene una secuencia de la sonda que es complementaria de una secuencia objetivo y el tallo está formado por la hibridación de las secuencias del brazo complementario que se localizan en ambos lados de la secuencia de la sonda/cebador. Un fluoróforo está unido covalentemente al extremo de un brazo y un inactivador está unido covalentemente al extremo del otro brazo. Las balizas moleculares no son fluorescentes cuando están libres en solución. No obstante, cuando hibridan con una hebra de ácido nucleico que contiene una secuencia objetivo sufren un cambio conformacional que les permiten brillar (véanse las patentes de EE.UU. 5.925.517 y 6.037.130). Las balizas moleculares se pueden usar como sondas/cebadores detectores de amplicón en ensayos diagnósticos. Dado que las balizas moleculares no hibridadas son oscuras, no es necesario aislar los híbridos sonda-objetivo para determinar, por ejemplo, el número de amplicones sintetizados durante un ensayo. Por tanto, las balizas moleculares simplifican las manipulaciones que a menudo se requieren cuando se usan medios tradicionales de detección e identificación.

Usando diferentes fluoróforos coloreados, las balizas moleculares también se pueden usar en ensayos de amplificación multiplexada tal como ensayos que están dirigidos a la amplificación y detección simultáneas de ácido

nucleico de PCA3 y del segundo ácido nucleico específico de próstata (por ejemplo, PSA, hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1). El diseño de las sondas/cebadores balizas moleculares es bien conocido en la técnica y comercialmente existen software dedicados a ayudar a su diseño (por ejemplo, Beacon designer de Premier Biosoft International). Las sondas/cebadores de balizas moleculares se pueden usar para en
5 varios ensayos de hibridación y amplificación (por ejemplo, NASBA y PCR).

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, el producto amplificado puede detectarse directamente usando balizas moleculares como cebadores para el ensayo de amplificación (por ejemplo, ensayos NASBA multiplexada en tiempo real o PCR) o indirectamente usando, dentro de los sitios de unión del par de cebadores, una
10 sonda baliza molecular de 18 a 25 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25), que hibrida específicamente con el producto de amplificación. Se prefieren las sondas o cebadores balizas moleculares que tienen una longitud comprendida entre 18 y 25 nucleótidos cuando se usan de acuerdo con la presente divulgación (Tyagi y col., 1996, Nature Biotechnol. 14: 303-308). Fragmentos más cortos podrían dar como resultado una señal menos fluorescente, mientras que fragmentos más largos no aumentan significativamente la señal. Por supuesto, no
15 obstante podrían usarse sondas y cebadores más cortos o más largos.

Ejemplos de cebadores de ácido nucleico que pueden derivar de secuencias de ARN de PCA3 se muestran a continuación en la tabla 1:

20 TABLA 1: Cebadores de ácido nucleico

	Tamaño (nº de bases)	Nucleótidos
Exón 1	98	1-98 de la SEC ID Nº 9
Exón 2	165	99-263 de la SEC ID Nº 9
Exón 3	183	264-446 de la SEC ID Nº 9
Exón 4a	539	447-985 de la SEC ID Nº 9
Exón 4b	1052	986-2037 de la SEC ID Nº 9
Exón 1	120	1-120 de la SEC ID Nº 10
Exón 2	165	121-285 de la SEC ID Nº 10
Exón 3	183	286-468 de la SEC ID Nº 10
Exón 4a	539	469-1007 de la SEC ID Nº 10
Exón 4b	1059	1008-2066 de la SEC ID Nº 10
Exón 4c	556	2067-2622 de la SEC ID Nº 10
Exón 4d	960	2623-3582 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 1	20	89-108 de la SEC ID Nº 9
Unión del exón 1	20	109-128 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 2	20	252-271 de la SEC ID Nº 9
Unión del exón 2	20	274-293 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 3	20	435-454 de la SEC ID Nº 9
Unión del exón 3	20	457-476 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 4	20	974-993 de la SEC ID Nº 9
Unión del exón 4	20	996-1015 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 5	20	2055-2074 de la SEC ID Nº 10
Unión del exón 6	20	2611-2630 de la SEC ID Nº 10

Debe entenderse que las secuencias y los tamaños de los cebadores indicados en la tabla 1 son arbitrarios y que se pueden diseñar una multitud de otras secuencias que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación.

25 Aunque la presente divulgación se puede llevar a cabo sin el uso de una sonda dirigida a secuencias de PCA3, tal como las uniones de exón de PCA3 de acuerdo con la presente invención, dichas sondas pueden añadir una especificidad adicional a los procedimientos y kits divulgados en el presente documento. Ejemplos de sondas de ácido nucleico específicos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación (y se pueden diseñar en base a las secuencias exónicas mostradas en la tabla 1) se exponen en la tabla 2, a continuación:

30

TABLA 2: Sondas de ácido nucleico

	Tamaño (nº de bases)	Nucleótidos
Sonda 1	20	1-20 de la SEC ID Nº 9
Sonda 2	30	1-30 de la SEC ID Nº 9
Sonda 3	40	1-40 de la SEC ID Nº 9
Sonda 4	20	1-20 de la SEC ID Nº 10
Sonda 5	30	1-30 de la SEC ID Nº 10
Sonda 6	40	1-40 de la SEC ID Nº 10
Sonda 7	20	89-108 de la SEC ID Nº 9
Sonda 8	30	114-143 de la SEC ID Nº 10
Sonda 9	30	257-286 de la SEC ID Nº 9
Sonda 10	20	284-303 de la SEC ID Nº 10
Sonda 11	20	274-293 de la SEC ID Nº 9

5 Por supuesto, como entenderá el experto en la técnica, se pueden diseñar una multitud de sondas adicionales a partir de la misma o de otra región de la SEC ID Nº 9, así como a partir de las SEC ID Nº 10 y 13 y otras secuencias de la presente divulgación, estén dirigidas a uniones exónicas o no. Quedará claro que los tamaños de las sondas indicados en la tabla 2 son arbitrarios y que se puede diseñar una multitud de otras secuencias que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación.

10 El experto en la técnica reconocerá fácilmente que las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente documento (por ejemplo, sondas y cebadores) se pueden incorporar en uno cualquiera de los formatos del kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

15 En una realización del procedimiento descrito anteriormente, una sonda de ácido nucleico se inmoviliza en un soporte sólido. Entre los ejemplos de dichos soportes sólidos se incluyen plásticos tales como policarbonatos, carbohidratos complejos tales como agarosa y sefarosa y resinas acrílicas, tales como esferas de poliacrilamida y de látex. En la técnica se conocen bien las técnicas para introducir acoplas las sondas de ácido nucleico a dichos soportes sólidos.

20 Las muestras de ensayo adecuadas para los procedimientos con sondas de ácido nucleico de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, células o extractos de ácido nucleico de células, o fluidos biológicos (por ejemplo, orina). La muestra usada en los procedimientos descritos anteriormente variarán según el formato del ensayo, el procedimiento de detección y la naturaleza de los tejidos, células o extractos que se van a analizar. En la técnica se conocen bien los procedimientos para preparar extractos de ácido nucleico de células y pueden adaptarse con facilidad con el fin de obtener una muestra que sea compatible con el procedimiento usado. Preferentemente, la muestra es una muestra de orina. Cuando se usa la muestra de orina, deberá contener al menos una célula de próstata con el fin de permitir la identificación del marcador específico de próstata de la presente invención. De hecho, suponiendo que la semivida del ARNm de PCA3 en una muestra biológica sin tratar no es adecuada para permitir fácilmente la conservación de la integridad de su secuencia, la muestra recogida, sea de orina o de otro tipo, debería, antes de someterla a un tratamiento, contener al menos una célula de próstata. Se reconocerá que el número de células en la muestra tendrán un impacto sobre la validación del ensayo y sobre el nivel relativo del PCA3 medido (o segundo marcador específico de próstata).

III. Kit para detectar la presencia de ácido nucleico de PCA3 en una muestra

35 En el presente documento también se divulga un kit para diagnosticar cáncer de próstata que sea sensible y específico (es decir, que disminuya el número de falsos positivos). Dicho kit generalmente comprende un primer medio contenedor que tiene dispuestos en su interior al menos una sonda o cebador oligonucleotídico que hibrida con una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata. En el presente documento también se divulga un kit que además comprende un segundo medio contenedor sondas o cebadores oligonucleotídicos que son específicos de un segundo marcador específico de próstata, de modo que se valida un resultado negativo con PCA3.

45 En una realización concreta de la presente invención, este kit (E) comprende un primer par que permite la amplificación de PSA, hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1). Por supuesto, la presente divulgación también abarca el uso de un tercer marcador específico de próstata.

Los oligonucleótidos (sondas o cebadores) del kit se pueden usar en, por ejemplo, un ensayo NASBA, PCR o de

hibridación. Los ensayos de amplificación se pueden adaptar para la detección en tiempo real de múltiples productos de amplificación (es decir, ensayos de amplificación en tiempo real multiplexados).

5 En una realización concreta relacionada, el kit además incluye otros contenedores que comprenden componentes tales como oligonucleótido o un cebador adicional y/o uno o más de los siguientes: tampones, reactivos a usar en el ensayo (por ejemplo, reactivos de lavado, polimerasas u otros) y reactivos capaces de detectar la presencia de sondas o cebadores de ácido nucleico unido. Ejemplos de reactivos de detección incluyen, entre otros, sondas marcadas radiactivamente, sondas marcadas enzimáticamente (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina) y sondas marcadas por afinidad (biotina, avidina o estreptavidina). En una realización, los reactivos de detección son sondas
10 balizas moleculares que hibridan específicamente con los productos de amplificación. En otra realización, los reactivos de detección son compuestos quimioluminiscentes tales como éster de acridinio (EA).

15 Por ejemplo, un kit compartimentalizado de acuerdo con la presente divulgación incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en contenedores separados. Dichos contenedores incluyen contenedores pequeños de vidrio, contenedores de plástico o tiras de plástico o papel. Dichos contenedores permiten la eficiente transferencia de reactivos de un compartimento a otro compartimento de modo que las muestras y los reactivos no sufren contaminación cruzada y los agentes o soluciones de cada contenedor pueden añadirse de un modo cuantitativo de un compartimento a otro. Dichos contenedores incluirán un contenedor que aceptará la muestra de ensayo (por ejemplo, un extracto de ARN de una muestra biológica o de células), un contenedor que contiene los cebadores
20 usados en el ensayo, contenedores que contienen enzimas, contenedores que contienen reactivos de lavado y contenedores que contienen los reactivos usados para detectar los productos de extensión. Como se ha mencionado anteriormente, un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación puede adaptar la separación o combinación de los reactivos de acuerdo con el tipo de kit que se prefiere (por ejemplo, un kit de diagnóstico basado en procedimientos de amplificación o hibridación o ambos), los tipos de reactivos usados y su
25 estabilizada u otras propiedades intrínsecas. En una realización, un contenedor contiene los reactivos de amplificación y un contenedor aparte contiene el reactivo de detección. En otra realización, los reactivos de amplificación y detección están contenidos en el mismo contenedor.

30 Los kits también pueden contener oligonucleótidos que sirven como oligómeros de captura para purificar los ácidos nucleicos objetivo de una muestra. Ejemplos de oligómeros de captura tienen secuencias de al menos 15 nucleótidos complementarios de una porción del ácido nucleico objetivo de PCA3. Las realizaciones de los oligómeros de captura pueden tener bases adicionales unidas en un extremo 3' o 5' de la secuencia que es complementaria a la secuencia objetivo de PCA3 que puede actuar funcionalmente en una etapa de hibridación para capturar el ácido nucleico objetivo. Dichas secuencias adicionales son, preferentemente, una secuencia de cola homopolimérica, tal como una secuencia de poli-A o de poli-T, aunque otras realizaciones de secuencias de cola
35 están incluídas en los oligómeros de captura divulgados en el presente documento. En una realización, se puede usar la proteína de unión CAP (por ejemplo, eIF4G-4E) o parte de la misma para capturar los ARNm que contienen la estructura de CAP (Edery y col., 1987, Gene 74 (2): 517-525). En otra realización se usa un reactivo de captura no específico (por ejemplo, esferas de sílice).

40 Kits útiles para poner en práctica los procedimientos divulgados en el presente documento pueden incluir los que incluyen cualquier oligonucleótido de amplificación y/o sondas de detección divulgados en el presente documento que se envasan en combinación. Los kits también pueden incluir oligómeros de captura para purificar el ácido nucleico objetivo de PCA3 de una muestra, cuyos oligómeros de captura pueden envasarse en combinación con los
45 oligonucleótidos de amplificación y/o las sondas de detección.

50 En una realización adicional, las células contenidas en muestras de orina miccionadas obtenidas tras un tacto rectal atento se recogen y se lisan en un tampón de lisis. Se extraen los ácidos nucleicos (por ejemplo, del lisado mediante extracción en fase sólida en, por ejemplo, esferas de sílice). La detección de la presencia de ARN codificado por el gen de PCA3 en el extracto de ácido nucleico se realiza mediante una amplificación de ARN específica *in vitro* acoplada a detección en tiempo real de productos amplificados mediante sondas específicas de fluorescencia. En este procedimiento, de forma simultánea a la amplificación del ARN específico de cáncer de próstata de PCA3 se produce la amplificación del segundo marcador específico de próstata (tal como el ARN de PSA) como control de la presencia en la muestra de orina de células de próstata.

55 Los procedimientos de cribado y de diagnóstico divulgados en el presente documento no requieren que se detecte la totalidad de la secuencia de ARN de PCA3. En su lugar, solo es necesario detectar 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 dicho ácido nucleico o una estructura alterada de dicho ácido nucleico (tal como un patrón de corte y empalme aberrante). Con este fin, se usa cualquiera de las sondas o cebadores como se han descrito anteriormente y se pueden diseñar muchas más según lo convencionalmente conocido en la técnica en base a las secuencias
60 descritas en el presente documento y otras conocidas en la técnica.

65 Debe entenderse que aunque la siguiente discusión está dirigida específicamente a pacientes humanos, las enseñanzas también son aplicables a cualquier animal que exprese PCA3.

Los procedimientos de diagnóstico y cribado divulgados en el presente documento son especialmente útiles para un paciente que se sospecha que está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada con una alteración del nivel de expresión de PCA3 según los antecedentes familiares o para un paciente en el que se desee diagnosticar una enfermedad relacionada con PCA3 (por ejemplo, cáncer de próstata). Los procedimientos divulgados en el presente documento también se pueden usar para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en un paciente como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 1

10 Rendimiento clínico usando una realización ilustrativa de los procedimientos divulgados en el presente documento

Estimando el rendimiento clínico del procedimiento se realizó un estudio piloto con 517 pacientes en los que se han programado biopsias con aguja guiadas por ultrasonidos procedentes de cinco centros médicos universitarios ubicados en Montreal y Quebec (Canadá) entre septiembre de 2001 y junio de 2002. Cada muestra se procesó usando las etapas siguientes:

Obtención de muestras

Tras un tacto rectal atento se obtuvieron los primeros 20 a 30 ml de orina miccionada en contenedores de plástico de 80 ml (el paciente orina directamente en el contenedor estéril).

Inmediatamente se añadió un volumen igual de tampón de muestras (fosfato 0,1M (Na_2HPO_4 0,06M, NaH_2PO_4 0,04M) NaCl 0,3M, pH 7,0) y la solución se mezcló mediante inversión.

Si no se procesa inmediatamente, las muestras se refrigeraron entre 2-8°C durante hasta tres días hasta su posterior procesamiento. En vista de la etapa de recuperación de células deberá evitarse la congelación.

Recuperación de células

La muestra se mezcló mediante inversión y el contenedor se golpeó suavemente sobre la bancada con el fin de desprender las células de las paredes internas del mismo. Después se transfirió la muestra a uno o dos (en caso necesario) tubos cónicos de polipropileno (40 ml/tubo).

Las células se sedimentaron mediante centrifugación en una centrífuga de mesa a 1.400 g durante 15 minutos. Por último, se decantó el sobrenadante y las células se lisaron de inmediato.

Lisis celular

Al sedimento celular de la orina se añadieron 400 μl de tampón de lisis (GuSCN 4,68M, EDTA 20Mm, 1,2% de Triton X-100™, Tris-HCl 46 mM, pH 7,2).

Después, el sedimento celular se agitó en vórtex enérgicamente durante 20 segundos con el fin de lisar las células. Es importante asegurarse de que no queda nada de materia particulada. El lisado era transparente y no demasiado viscoso.

El lisado se transfirió a microtubos de 1,5 ml y se agitó en vórtex durante 30 segundos.

Ahora, si se desea, las células lisadas se pueden almacenar a $\leq -70^\circ\text{C}$ de forma indefinida.

50 *Extracción de ácido nucleico*

La suspensión de sílice (60 g de sílice $\pm 80\%$ de tamaño de partícula de 1-5 μm , añadir agua MilliQ a un volumen final de 500 ml) primero se agitó en vórtex enérgicamente durante 30 segundos hasta que se obtuvo una suspensión homogénea opaca.

Después, inmediatamente se extrajeron 200 μl de la suspensión y se añadieron a la muestra lisada. A continuación, se agitaron en vórtex enérgicamente todos los tubos durante 15 segundos uniendo los ácidos nucleicos a la sílice.

En una gradilla de tubos de ensayo se preparó una serie de columnas de Microspin™ Columns identificando cada unidad de filtro con el número adecuado de paciente.

El contenido de cada microtubo que contiene las células lisadas y la sílice se transfirieron a la unidad de filtro de membrana de una columna Microspin™. Facilitando la transferencia de la materia particulada, el microtubo se agitó en vórtex brevemente (aproximadamente 5 segundos) con el fin de resuspender el contenido. Se realizó lo mismo antes de la transferencia. Las puntas se cambiaron entre muestras.

ES 2 427 853 T3

Las columnas Microspin™ se centrifugaron en una microcentrífuga no refrigerada a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente (18°C-25°C). El filtro de membrana retuvo los ácidos nucleicos unidos a sílice, mientras que otros componentes celulares permanecieron en el flujo.

5 Entretanto se preparó una serie de microtubos de 2 ml correspondientes al número de columnas Microspin™.

Las unidades de filtro de membrana que contenían la sílice se transfirieron a nuevos microtubos de 2 ml. A cada unidad de filtro de membrana se añadieron 500 µl de tampón de lavado (GuSCN 5,3M, Tris-HCl 52 mM, pH 6,4) Después, las columnas Microspin™ se centrifugaron en una microcentrífuga no refrigerada a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

En una gradilla de tubos de ensayo se preparó una serie nueva de microtubos de 2 ml.

15 Las unidades de filtro de membrana con la sílice se transfirieron a nuevos microtubos de 2 ml. A las unidades de filtro de membrana se añadieron 600 µl de etanol al 70%. Después, las columnas Microspin™ se centrifugaron en una microcentrífuga no refrigerada a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

En una gradilla de tubos de ensayo se preparó una serie nueva de microtubos de 2 ml.

20 Las unidades de filtro de membrana con la sílice se transfirieron a nuevos microtubos de 2 ml. Desechar los microtubos que contienen el flujo continuo.

La unidad de filtro de membrana que contiene microtubos se transfirieron a continuación a un bloque de calentamiento a 65°C ± 1°C instalado en una campana de humos.

25 Todos los tubos se abrieron cuidadosamente garantizando la evaporación y se incubaron durante aproximadamente 10 minutos secando la sílice.

30 A cada unidad de filtro de membrana se añadieron 200 µl de tampón de elución (agua sin DNasa/RNasa)

Después, las unidades de filtro de membrana se centrifugaron en una microcentrífuga a 10.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

35 Las etapas de elución se repitieron una vez obteniendo un segundo eluato. Estas etapas eluyen ácidos nucleicos de la sílice y los concentran en el flujo continuo.

Se extrajeron las unidades de microfiltro y se conservaron los dos microtubos que contenían la elución con ácido nucleico.

40 Para cada eluato, tres alícuotas de ≈ 50 µl de ácidos nucleicos se almacenaron a ≤-70°C

Amplificación y detección de ARN in vitro

45 La muestra del eluato de ácido nucleico a analizar se descongeló primero en hielo. La mezcla de la reacción se preparó después de acuerdo con el número de reacciones a realizar. Cada muestra se realizó al menos por duplicado.

50 10 µl de la mezcla de reacción se distribuyó en microtubos identificados [Tris-HCl 80mM, pH 8,5, MgCl₂ 24mM, KCl 180mM, DTT 10mM, 2mM de cada dNTP, 4mM de rATP, rUTP, CTP, rGTP 3mM, ITP 1 mM, 30% de DMSO, 3% de sacarosa, 1% de D-Manitol, 1% de Dextrano T-40, cebadores de PSA 208nM (N2psaP1 B, SEC ID N° 1 y N2psaP2B, SEC ID N° 2), cebadores de PCA-3 417nM (NOpcaP1A, SEC ID N° 3 y N0pcaP2B, SEC ID N° 4), baliza de PSA 84nM (BpsaRD-4, SEC ID N1 5), baliza de PCA-3 166nM (BpcaFD-4, SEC ID N° 6).

55 A cada tubo se añadieron 5 µl del eluato de la muestra con ácido nucleico y se mezclaron.

Los tubos se colocaron en un a thermocycler™, se calentaron a 65°C ± 1 °C durante un periodo de 5 minutos y después, la temperatura se mantuvo a 41°C. Tras 5 minutos a 41°C, los tubos se recuperaron y centrifugaron brevemente con el fin de eliminar las gotas de condensación de las tapas.

60 Las siguientes etapas se llevaron a cabo mejor rápidamente y la temperatura del tubo se mantuvo, preferentemente, a 41°C.

65 Después, a cada tubo se añadieron rápidamente 5 µl de la mezcla de enzimas (sorbitol 375mM, 0,105 µg/µl de BSA, 0,08 unidades de Rnasa H, 32,0 unidades de ARN polimerasa de T7, 6,4 unidades de AMV-RT) y los tubos se mezclaron suavemente.

Los tubos se volvieron a colocar en el incubador EasyQ™. Cuando el último tubo se hubo colocado, el incubador se mantuvo a una temperatura de 41 °C ± 0,5 °C durante 5 minutos.

- 5 Después, se centrifugaron los tubos brevemente. Rápidamente, todos los tubos de transfirieron a un espectrofluorímetro con termostato para la amplificación de ARN *in vitro* y detección del producto amplificado en tiempo real con las características siguientes: (1) la fuente de luz fue una lámpara halógena de cuarzo, (2) el filtro usado para la fluorescencia ROX (6-carboxi-x-rodamina-N-succinimidil-éster) a 550-620 nm y para FAM (6-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimida éster) fue a 485-530 nm , (3) el tiempo de integración de la fluorescencia por tubo fue de 20 ms; y (4) la emisión de ROX y FAM se leyó cada 30 s y el bloqueo del tubo de fijó a la temperatura de 41 °C ± 1 °C.

Resultados

- 15 Los datos de fluorescencia generados durante las dos horas de amplificación se sometieron a ajustes siguiendo el abordaje de Brown [Computer Methods and Programs in Biomedicine 65 (2001) 191-200].

Según la proporción de corte del PSA (fluo máx/fluo mín) de 1,3, de los 517 pacientes que se han analizado, 443 tenían cantidades adecuadas de células de próstata en la orina.

- 20 En esta población de pacientes, el 34% (151/443) tenía cáncer de próstata confirmado mediante histología.

TABLA 3: Biopsias positivas frente a las categorías de tPSA

tPSA	Porcentaje de pacientes	Biopsias positivas
< 4 ng/ml	21 % (n=94)	20% (n=19)
4-10 ng/ml	55% (n=243)	35% (n=85)
> 10 ng/ml	24% (n=106)	44%(n=47)

- 25 La especificidad clínica (Sp) y la sensibilidad (Se) del procedimiento se ha estimado tras una clasificación estructurada en árbol usando el software S-plus™ [Insightful Corporation, Seattle, WA, USA] a partir de los datos en bruto del fluorímetro. Se han definido tres árboles estructurados para los tres tipos de pacientes definidos como un PSA en sangre total (tPSA) por debajo de 4 ng/ml, entre 4-10 ng/ml y por encima de 10 ng/ml (véanse las Figuras 2 - 4 y la tabla 4).

- 30 TABLA 4: Sensibilidad y especificidad del procedimiento

tPSA	Número	% de Se	% de Sp
< 4 ng/ml	94	74 (14/19)	91 (68/75)
4-10 ng/ml	243	59 (50/85)	91 (144/158)
> 10 ng/ml	106	79 (37/47)	80 (47/59)
Global	443	67 (101/151)	89 (259/292)

TABLA 5: Rendimiento del procedimiento frente al tPSA total y al fPSA libre

	% de Se	% de Sp
tPSA ≥ 2,5 ng/ml	100% (58/58)	6% (5/88)
tPSA ≥ 4,0 ng/ml	88% (51/58)	15% (13/88)
FPSA/tPSA ≤ 0,15	72% (42/58)	56% (49/88)
FPSA/tPSA ≤ 0,13	66% (38/58)	67% (59/88)
uPM3™	64% (37/58)	91 % (80/88)

146/443 pacientes con fPSA disponible

- 35 El estudio demostró que el procedimiento tiene un valor predictivo positivo (VPP) del 75% en comparación con el PSA total (4,0 ng/ml) con un VPP de solo el 38%. El valor predictivo negativo del procedimiento es del 84% en comparación con el 81% para tPSA. La precisión global del procedimiento es del 81% en comparación con una precisión del 47% para tPSA.

40

Lista de Secuencias

<110>. DIAGNOCURE INC.
 <120> PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR CÁNCER DE PRÓSTATA EN UNA MUESTRA DE ORINA
 <130> 11957.81
 5 <150> US 60/445.436
 <151> 7-2-2003
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 10 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 aattctaata cgactcacta tagggaggat gaaacaggct gtgccga 47
 15 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 20 agcattccca accctggcag 20
 <210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 25 aattctaata cgactcacta tagggcctgc ccatcctta agгаа 45
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 30 caggaagcac aaaaggaagc 20
 <210> 5
 <211> 26
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 40 <223> n = ROX
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> n = DABCYL
 45 <400> 5
 ncccagtctg cggcgggtgt ctgggn 26
 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n = FAM
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (30)..(30)
 <223> n = DABCYL
 <400> 6
 60 ncgctgtga gggaaggaca ttagaagcgn 30
 <210> 7
 <211> 506
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 7

ES 2 427 853 T3

caggaagcac aaaaggaagc acagaggtaa gtgctttata aagcactcaa tttctactca 60
gaaatthttg atggccttaa gttcctctac tcgthttctat ccttcctact cactgtcctc 120
ccggaatcca ctaccgattt tctatthttctt gcctogtatt gtctgactgg ctcaacttga 180
thttatctca cggagtctgg atthttctacc cgggctcacc tcogtccctc catatthtgc 240
ctccactthc acagatocct gggagaaatg cccggccgcc atcttgggtc atcgatgagc 300
ctcgcctgtg gcctgttccc gcttgtgagg gaaggacatt agaaaatgaa ttgatgtgtt 360
ccttaaagga tgggcaggaa aacagatcct gttgtggata thttatthgaa cgggattaca 420
gatttgaat gaagtcacca aagtgagcat taccaatgag aggaaaacag acgagaaaat 480
cttgatggct tcacaagaca tgcaac 506
<210> 8
<211> 278
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<400> 8
caggaagcac aaaaggaagc acagagatcc ctgggagaaa tgcccggccg ccatcttggg 60
tcatcgatga gcctgcctt gtgcctggtc ccgcttgtga gggaaggaca ttagaaaatg 120
aattgatgtg thccttaaag gatgggcagg aaaacagatc ctgthtggga thttattht 180
aacgggatta cagatthgaa atgaagtcac caaagtgagc attaccaatg agaggaaaac 240
agacgagaaa atcttgatgg thtcacaaga catgcaac 278
<210> 9
<211> 2037
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<222> (1472)..(1472)
15 <223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> misc_feature
<222> (1517)..(1517)
<223> n es a, c, g, o t
20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1563)..(1563)
<223> n es a, c, g, o t
<400> 9
agaagctggc atcagaaaaa cagaggggag atthtgtgtg ctgcagccga gggagaccag 60
gaagatctgc atggtgggaa ggacctgatg atacagagga attacaacac atatacttag 120
tgtthcaatg aacaccaaga taaataagtg aagagctagt ccgctgtgag thcctcagt 180
gacacagggc tggatcacca tcgacggcac thttctgagta ctcagtgcag caaagaaaga 240
ctacagacat ctcaatggca ggggtgagaa ataagaaagg ctgctgactt taccatctga 300
ggccacacat ctgctgaaat ggagataatt aacatcacta gaaacagcaa gatgacaata 360
taatgtctaa gtagtgacat gthtttgcac atthccagcc cthttaaata thcacacaca 420
25 caggaagcac aaaaggaagc acagagatcc ctgggagaaa tgcccggccg ccatcttggg 480

ES 2 427 853 T3

tcatcgatga gcctcgccct gtgcctggtc ccgcttgtga ggggaaggaca ttagaaaatg 540
 aattgatgtg ttccttaaag gatgggcagg aaaacagatc ctgttgtgga tatttatttg 600
 aacgggatta cagatttgaa atgaagtcac aaagtgagca ttaccaatga gaggaaaaca 660
 gacgagaaaa tcttgatggc ttcacaagac atgcaacaaa caaaatggaa tactgtgatg 720
 acatgaggca gccaaactgg ggaggagata accacggggc agagggtcag gattctggcc 780
 ctgctgccta aactgtgctg tcataaccaa atcatttcat atttctaacc ctcaaaaaca 840
 agctgttgta atatctgatc tctacggttc cttctgggcc caacattctc catatatcca 900
 gccacactca tttttaatat ttagttccca gatctgtact gtgacctttc tacactgtag 960
 aataacatta ctcatcttgt tcaaagacc ttcgtgttgc tgcctaatat gtagctgact 1020
 gtttttccta aggagtgttc tggcccaggg gatctgtgaa caggctggga agcatctcaa 1080
 gatctttcca gggttatact tactagcaca cagcatgatc attacggagt gaattatcta 1140
 atcaacatca tcctcagtgt ctttgcccat actgaaattc atttcccact tttgtgcca 1200
 ttctcaagac ctcaaaatgt cattccatta atatcacagg attaactttt ttttttaacc 1260
 tggagaatt caatgttaca tgcagctatg ggaatttaac tacatatctt gttttccagt 1320
 gcaaagatga ctaagtcctt tatccctccc cttgtttga tttttttcc agtataaagt 1380
 taaaatgctt agccttgtac tgaggctgta tacagcacag cctctcccca tcctccagc 1440
 cttatctgtc atcaccatca acccctccca tnysacctaa acaaaatcta acttgaatt 1500
 cttgaacat gtcaggncat acattrttcc ttctgcctga gaagctcttc cttgtctctt 1560
 aantctagaa tgatgtaaag ttttgaataa gttgactatc ttacttcatg caaagaagg 1620
 acacatatga gattcatcat cacatgagac agcaaatact aaaagtgtaa tttgattata 1680
 agagtttaga taaatatatg aaatgcaaga kccacagagg gaatgtttat ggggcacggt 1740
 tgtaagcctg ggatgtgaag maaaggcagg gaacctcata gtatcttata taatatactt 1800
 catttctcta tctctatcac aatatccaac aagcttttca cagaattcat gcagtgcaaa 1860
 tccccaaagg taacctttat ccatttcatg gtgagtgcgc tttagaattt tggcaaatca 1920
 tactggtcac ttatctcaac tttgagatgt gtttgcctt gtagttaatt gaaagaaata 1980
 gggcactctt gtgagccact ttagggttca ctctggcaa taaagaattt acaaaga 2037

<210> 10
 <211> 3582
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

5

ES 2 427 853 T3

acagaagaaa tagcaagtgc cgagaagctg gcatcagaaa aacagagggg agatttgtgt 60
 ggctgcagcc gagggagacc aggaagatct gcatggtggg aaggacctga tgatacagag 120
 gaattacaac acatatactt agtgtttcaa tgaacaccaa gataaataag tgaagagcta 180
 gtccgctgtg agtctctca gtgacacagg gctggatcac catcgacggc actttctgag 240
 tactcagtgc agcaaagaaa gactacagac atctcaatgg caggggtgag aaataagaaa 300
 ggctgctgac ttaccatct gaggccacac atctgctgaa atggagataa ttaacatcac 360
 tagaaacagc aagatgacaa tataatgtct aagtagtgac atgtttttgc acatttccag 420
 cccctttaa tatccacaca cacaggaagc aaaaaggaa gcacagagat ccctgggaga 480
 aatgcccgcc cgccatcttg ggtcatcgat gagcctcgcc ctgtgcctgg tcccgcttgt 540
 gagggaaagga cattagaaaa tgaattgatg tgttcttaa aggatgggca ggaaaacaga 600
 tcctgttgtg gatatttatt tgaacgggat tacagatttg aatgaagtc acaaagtgag 660
 cattaccaat gagaggaaaa cagacgagaa aatcttgatg gcttcacaag acatgcaaca 720
 aacaaaatgg aatactgtga tgacatgagg cagccaagct ggggaggaga taaccacggg 780
 gcagagggtc aggattcttg ccctgctgcc taaactgtgc gttcataacc aaatcatttc 840
 atatttctaa ccctcaaac aaagctgttg taatatctga tctctacggt tccttctggg 900
 cccaacattc tccatatatc cagccaact catttttaat atttagttcc cagatctgta 960
 ctgtgacctt tctacactgt agaataacat tactcatttt gttcaaagac ccttcgtggt 1020
 gctgcctaat atgtagctga ctgtttttcc taaggagtgt tctggcccag gggatctgtg 1080
 aacaggctgg gaagcatctc aagatcttc cagggttata cttactagca cacagcatga 1140
 tcattacgga gtgaattatc taatcaacat catcctcagt gtctttgcc atactgaaat 1200
 tcatttcca cttttgtgcc cattctcaag acctcaaat gtcattccat taatatcaca 1260
 ggattaactt ttttttttaa cctggaagaa ttcaatgta catgcagcta tgggaattta 1320
 attacatatt ttgttttcca gtgcaaagat gactaagtcc tttatccctc ccctttgttt 1380
 gatTTTTTTT ccagtataaa gttaaaatgc ttagccttgt actgaggctg tatacagcac 1440
 agcctctccc catccctoca gccttatctg tcatcaccat caaccctcc cataccacct 1500
 aaacaaatc taactgttaa ttcttgaac atgtcaggac atacattatt ctttctgcct 1560
 gagaagctct tccttgctc ttaaactctag aatgatgtaa agttttgaat aagttgacta 1620
 tcttacttca tgcaaagaag ggacacatat gagattcacc atcacatgag acagcaata 1680

ES 2 427 853 T3

ctaaaagtgt aatttgatta taagagttta gataaatata tgaatgcaa gagccacaga 1740
 gggaatgttt atggggcacg tttgtaagcc tgggatgtga agcaaaggca gggaacctca 1800
 tagtatctta tataatatac ttcattttctc tatctctatc acaatatcca acaagctttt 1860
 cacagaattc atgcagtgca aatcccaaaa ggtaaccttt atccatttca tggtagagtgc 1920
 gctttagaat tttggcaaat catactggtc acttatctca actttgagat gtgtttgtcc 1980
 ttgtagttaa ttgaaagaaa tagggcactc ttgtgagcca ctttagggtt cactcctggc 2040
 aataaagaat ttacaagag ctactcagga ccagttgtta agagctctgt gtgtgtgtgt 2100
 gtgtgtgtgt gagtgtacat gccaaagtgt gcctctctct cttgacctat tatttcagac 2160
 ttaaacaag catgttttca aatggcacta tgagctgcca atgatgtatc accaccatat 2220
 ctctatttc tccagtaaat gtgataataa tgtcatctgt taacataaaa aaagtttgac 2280
 ttcacaaaag cagctggaaa tggacaacca caatatgcat aaatctaact cctaccatca 2340
 gctacacact gcttgacata tattgttaga agcacctcgc atttgtgggt tctcttaagc 2400
 aaaatacttg cattaggtct cagctggggc tgtgcatcag gcggtttgag aaatattcaa 2460
 ttctcagcag aagccagaat ttgaattccc tcatctttta ggaatcattt accaggtttg 2520
 gagaggattc agacagctca ggtgctttca ctaatgtctc tgaacttctg tccctctttg 2580
 tgttcatgga tagtccaata aataatgtta tctttgaact gatgctcata ggagagaata 2640
 taagaactct gagtgatatc aacattaggg attcaaagaa atattagatt taagctcaca 2700
 ctggtcaaaa ggaaccaaga tacaagaac tctgagctgt catcgtcccc atctctgtga 2760
 gccacaacca acagcaggac ccaacgcatg tctgagatcc ttaaatcaag gaaaccagtg 2820
 tcatgagttg aattctccta ttatggatgc tagcttctgg ccatctctgg ctctcctctt 2880
 gacacatatt agcttctagc ctttgcttcc acgactttta tcttttctcc aacacatcgc 2940
 ttaccaatcc tctctctgct ctgttgcttt ggacttcccc acaagaattt caacgactct 3000
 caagtctttt ctccatccc caccactaac ctgaattgcc tagaccctta tttttattaa 3060
 tttccaatag atgctgccta tgggctaata ttgctttaga tgaacattag atatttaaag 3120
 tctaagaggt tcaaaatoca actcattatc ttctctttct ttcacctccc ctgctcctct 3180
 ccctatatta ctgattgact gaacaggatg gtcccaaga tgccagtcaa atgagaaacc 3240
 cagtggctcc ttgtgatca tgcattgcaag actgctgaag ccagaggatg actgattacg 3300
 cctcatgggt ggaggggacc actcctgggc cttcgtgatt gtcaggagca agacctgaga 3360
 tgctccctgc cttcagtgct ctctgcatct cccctttcta atgaagatcc atagaatttg 3420
 ctacatttga gaattccaat taggaactca catgttttat ctgccctatc aattttttaa 3480
 acttgctgaa aattaagttt tttcaaaatc tgccttgta aattactttt tcttacagtg 3540
 tcttgacata ctatatcaac tttgattctt tgttacaact tt 3582

<210> 11
 <211> 7130
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

5

ES 2 427 853 T3

gaattccaca ttgtttgctg cacgttggat tttgaaatgc tagggaactt tgggagactc	60
atatttctgg gctagaggat ctgtggacca caagatcttt ttatgatgac agtagcaatg	120
tatctgtgga gctggattct gggttgggag tgcaaggaaa agaatgtact aaatgccaaag	180
acatctatTT caggagcatg aggaataaaa gttctagttt ctgggtctcag ,agtgggtgcag	240
ggatcaggga gtctcacaat ctctgagtg ctgggtgtctt agggcacact gggctcttga	300
gtgcaaagga tctaggcacg tgaggctttg tatgaagaat cggggatcgt acccaccccc	360
tgtttctggt tcatcctggg catgtctcct ctgcctttgt cccttagatg aagtctccat	420
gagctacaag ggcctgggtg atccagggtg atctagtaat tgcagaacag caagtgtctag	480
ctctccctcc ccttccacag ctctgggtgt gggagggggt tgtccagcct ccagcagcat	540
gggagggcc ttggtcagcc tctgggtgcc agcagggcag gggcggagtc ctggggaatg	600
aaggTTTTat agggctcctg ggggaggctc ccagcccca agcttaccac ctgcacccgg	660
agagctgtgt caccatgtgg gtcccgttg tcttctcac cctgtccgtg acgtggattg	720
gtgagagggg ccatggttgg ggggatgcag gagagggagc cagccctgac tgtcaagctg	780
aggctcttTc ccccccaacc cagcacccca gccagacag ggagctgggc tcttttctgt	840
ctctcccagc cccacttcaa gcccataccc ccagcccctc catattgcaa cagtctcac	900
tcccacacca ggtcccgcct ccctcccact taccacagaa ctttctccc attgccagc	960
cagctccctg ctcccagctg ctttactaaa ggggaagttc ctgggcatct cagtgtttct	1020
ctttgtgggg ctcaaacct ccaaggacct ctctcaatgc cattggttcc ttggaccgta	1080
tactgggtcc atctctgag cccctcaatc ctatcacagt ctactgactt ttcccattca	1140
gctgtgagtg tccaacccta tcccagagac cttgatgctt ggcctcccaa tcttgcccta	1200
ggatacccag atgccaacca gacacctcct tcttctagc caggetatct ggcctgagac	1260

ES 2 427 853 T3

aacaatggg tccctcagtc tggcaatggg actctgagaa ctctcattc cctgactctt 1320
agcccagac tcttcattca gtggcccaca ttttcttag gaaaaacatg agcatcccca 1380
gccacaactg ccagctctct gattcccaa atctgcatcc ttttcaaac ctaaaaaca 1440
aaagaaaaac aaataaaaca aaaccaactc agaccagaac tgttttctca acctgggact 1500
tcctaaactt tccaaaacct tcctcttcca gcaactgaac ctggccataa ggcacttatc 1560
cctgggttctt agcaccctt atcccctcag aatccacaac ttgtaccaag tttcccttct 1620
cccagtccaa gaccccaaat caccacaaag gaccaatcc ccagactcaa gatatggtct 1680
gggcgctgtc ttgtgtctcc taccctgatc cctgggttca actctgctcc cagagcatga 1740
agcctctcca ccagcaccag ccaccaacct gcaaacctag ggaagattga cagaattccc 1800
agcctttccc agctccccct gcccatgtcc caggactccc agccttgggt ctctgcccc 1860
gtgtcttttc aaaccacat cctaaatcca tctctatcc gagtccccca gttccccctg 1920
tcaacctga tttccctgat ctagcaccct ctctgcaggc gctgcgcccc tcatcctgtc 1980
tcggattgtg ggaggctggg agtgcgagaa gcattcccaa ccctggcagg tgcttgtggc 2040
ctctcgtggc agggcagctc gcggcggtgt tctggtgcac ccccagtggg tcctcacagc 2100
tgcccactgc atcaggaagt gagtaggggc ctgggtctg gggagcagggt gtctgtgtcc 2160
cagaggaata acagctgggc attttcccca ggataacctc taaggccagc cttgggactg 2220
ggggagagag gaaagttct ggttcaggtc acatggggag gcagggttg ggctggacca 2280
ccctccccat ggctgcctgg gtctccatct gtgtccctct atgtctcttt gtgtcgcttt 2340
cattatgtct ctggtaact ggcttcgggt gtgtctctcc gtgtgactat tttgttctct 2400
ctctccctct ctctctgtc ttcagtctcc atatctccc ctctctctgt ccttctctgg 2460
tccctctcta gccagtgtgt ctaccctgt atctctctgc caggctctgt ctctcggctc 2520
ctgtctcacc tgtgccttct cctactgaa cacacgcacg ggatgggcct ggggggacct 2580
tgagaaaagg aagggtttg gctgggcgcg gtggctcaca cctgtaatcc cagcactttg 2640
ggaggccaag gcaggtagat cacctgaggt caggagtctg agaccagcct ggccaactgg 2700
tgaaacccca tctctactaa aaatacaaaa aattagccag gcgtgggtggc gcatgcctgt 2760
agtcccagct actcaggagg ctgagggagg agaattgctt gaacctggga ggttgaggtt 2820
gcagtgagcc gagaccgtgc cactgcactc cagcctgggt gacagagtga gactccgcct 2880
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaagaaa aggaatcttt 2940
tatccctgat gtgtgtgggt atgagggtat gagagggcc ctctcactcc attccttctc 3000

ES 2 427 853 T3

caggacatcc ctccactctt gggagacaca gagaagggtt ggttccagct ggagctggga 3060
 ggggcaattg agggaggagg aaggagaagg ggaaggaaa acagggtatg ggggaaagga 3120
 ccctggggag cgaagtggag gatacaacct tgggcctgca ggccaggcta cctaccact 3180
 tggaaacca cgccaaagcc gcattctacag ctgagccact ctgaggcctc ccctccccgg 3240
 cggccccac tcagctccaa agtctctctc ccttttctct ccacacttt atcatcccc 3300
 ggattcctct ctacttgggt ctctattctc ctttgacttc ctgcttcctt ttctcattca 3360
 tctgtttctc actttctgcc tggttttggt cttctctctc tctttctctg gcccatgtct 3420
 gtttctctat gtttctgtct tttctttctc atcctgtgta ttttcggctc accttgtttg 3480
 tcaactgttct cccctctgcc ctttcattct ctctgtcctt ttaccctctt cctttttccc 3540
 ttggtttctc tcagtttctg tatctgcctt tcaccctctc aactgctgtt ttcccactc 3600
 gttgtctgta tttttggcct gaactgtgtc ttcccacacc ctgtgttttt ctcaactgtt 3660
 ctttttctct tttggagcct cctccttget cctctgtccc ttctctcttt ccttatcatc 3720
 ctgcctctc attcctgcgt ctgcttcctc ccagcaaaa gcgtgatctt gctgggtcgg 3780
 cacagcctgt ttcatcctga agacacaggc caggtatttc aggtcagcca cagcttccca 3840
 caccgctct acgatatgag cctcctgaag aatcgattcc tcaggccagg tgatgactcc 3900
 agccacgacc tcagtctgct ccgcctgtca gagcctgccg agctcacgga tgctgtgaag 3960
 gtcattggacc tgcccacca ggagccagca ctggggacca cctgctacgc ctcaaggctgg 4020
 ggcagcattg aaccagagga gtgtacgctt gggccagatg gtgcagccgg gagccagat 4080
 gcctgggtct gagggaggag gggacaggac tcctgggtct gagggaggag ggccaaggaa 4140
 ccaggtgggg tocagcccac aacagtgttt ttgcctggcc cgtagtcttg accccaaaga 4200
 aacttcagtg tgtggacctc catgttattt ccaatgacgt gtgtgcgcaa gttcacctc 4260
 agaaggtgac caagttcatg ctgtgtgctg gacgctggac agggggcaaa agcacctgct 4320
 cggtgagtca tccctactcc caagatcttg aggggaaagg tgagtgggga ccttaattct 4380
 gggctggggt ctagaagcca acaaggcgtc tgcctcccct gctcccagc tgtagccatg 4440
 ccaoctcccc gtgtctcatc tcattccctc cttccctctt ctttgactcc ctcaaggcaa 4500
 taggttattc ttacagcaca actcatctgt tctgcgttc agcacacggt tactaggcac 4560
 ctgctatgca ccagcactg ccctagagcc tgggacatag cagtgaacag acagagagca 4620
 gccctccct tctgtagccc ccaagccagt gaggggcaca ggcaggaaca gggaccacaa 4680

ES 2 427 853 T3

cacagaaaag ctggagggtg tcaggaggtg atcaggctct cggggaggga gaaggggtgg 4740
ggagtgtgac tgggaggaga catcctgcag aagggtggag tgagcaaaca cctgccgcag 4800
gggaggggag ggcctgcgg cacctggggg agcagagggg acagcatctg gccaggcctg 4860
ggaggagggg cctagagggc gtcaggagca gagaggaggt tgccctggctg gagtgaagga 4920
tcggggcagg gtgcgagagg gaagaaagga cccctcctgc agggcctcac ctggggcaca 4980
ggaggacact gcttttctc tgaggagtca ggaactgtgg atgggtgctg acagaagcag 5040
gacagggcct ggctcagggtg tccagaggct gccgctggcc tccctatggg atcagactgc 5100
agggagggag ggcagcaggg atgtggaggg agtgatgatg gggctgacct gggggtggct 5160
ccaggcattg tccccacctg ggccttacc cagcctccct cacaggctcc tggccctcag 5220
tctctccct cactccatt ctccacctac ccacagtggg tcattctgat caccgaactg 5280
accatgccag ccctgccgat ggtcctccat ggctccctag tgccctggag aggaggtgtc 5340
tagtcagaga gtagtccctg aagggtggct ctgtgaggag ccacggggac agcatcctgc 5400
agatggtcct ggccttgtc ccaccgacct gtctacaagg actgtcctcg tggaccctcc 5460
cctctgcaca ggagctggac cctgaagtcc cttccctacc ggccaggact ggagccccta 5520
cccctctgtt ggaatccctg cccaccttct tctggaagtc ggctctggag acatttctct 5580
cttcttcaa agctgggaac tgctatctgt tatctgcctg tccaggctctg aaagatagga 5640
ttgccaggc agaaactggg actgacctat ctactctct cctgctttt acccttaggg 5700
tgattctggg ggcccacttg tctgtaatgg tgtgcttcaa ggtatcacgt catggggcag 5760
tgaaccatgt gccctgccg aaaggccttc cctgtacacc aagggtgtgc attaccgga 5820
gtggatcaag gacaccatcg tggccaacct ctgagcacct ctatcaactc cctattgtag 5880
taaacttga accttgaaa tgaccaggcc aagactcaag cctccccagt tctactgacc 5940
tttgtcctta ggtgtgagg ccagggttg taggaaaaga aatcagcaga cacagggtga 6000
gaccagagtg tttcttaaat ggtgtaattt tgtcctctct gtgtcctggg gaatactggc 6060
catgcctgga gacatatcac tcaatttctc tgaggacaca gataggatgg ggtgtctgtg 6120
ttatttggg gatacagaga tgaagaggg gtgggatcca cactgagaga gtggagagtg 6180
acatgtgctg gacactgtcc atgaagcact gagcagaagc tggaggcaca acgcaccaga 6240
cactcacagc aaggatggag ctgaaaacat aaccactct gtcctggagg cactgggaag 6300
cctagagaag gctgtgagcc aaggagggag ggtcttcctt tggcatggga tggggatgaa 6360
gtaaggagag ggactggacc ccctggaagc tgattcacta tggggggagg tgtattgaag 6420

ES 2 427 853 T3

```

tcctccagac aaccctcaga tttgatgatt tcctagtaga actcacagaa ataaagagct 6480
cttatactgt ggtttattct ggtttggtac attgacagga gacacactga aatcagcaaa 6540
ggaaacaggc atctaagtgg ggatgtgaag aaaacagggg aaatctttca gttgttttct 6600
cccagtgggg tgttggtggac agcacttaaa tcacacagaa gtgatgtgtg accttggtga 6660
tgaagtatth ccaactaagg aagctcacct gagccttagt gtccagagtt cttattgggg 6720
gtctgtagga taggcatggg gtactggaat agctgacctt aacttctcag acctgagggt 6780
ccaagagtt caagcagata cagcatggcc tagagcctca gatgtacaaa aacaggcatt 6840
catcatgaat cgcaactgta gcatgaatca tctggcacgg cccaaggccc caggtatacc 6900
aaggcacttg ggccgaatgt tccaagggat taaatgtcat ctcccaggag ttattcaagg 6960
gtgagccctg tacttggaac gttcaggctt tgagcagtgc agggctgctg agtcaacctt 7020
ttactgtaca ggggggtgag ggaaagggag aagatgagga aaccgcctag ggatctgggt 7080
ctgtctgtg gccgagtgga ccatggggct atcccaagaa ggaggaattc 7130
<210> 12
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Homo sapiens
<400> 12
agcattccca accctggcag 20
<210> 13
<211> 3923
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 13
acagaagaaa tagcaagtgc cgagaagctg gcatcagaaa aacagagggg agattttgtg 60
ggctgcagcc gagggagacc aggaagatct gcatggtggg aaggacctga tgatacagag 120
gaattacaac acatatactt agtgtttcaa 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 atgtttttgc acatttccag 420
cccctttaa tatccacaca cacaggaagc acaaaaggaa gcacagagat ccctgggaga 480

```

ES 2 427 853 T3

aatgcccggc cgccatcttg ggtcatcgat gagcctcgcc ctgtgcctgg tcccgcttgt 540
gaggggaagga cattagaaaa tgaattgatg tgttccttaa aggatgggca ggaaaacaga 600
tcctgtttgtg gatatttatt tgaacgggat tacagatttg aatgaagtc acaaagtgag 660
cattaccaat gagaggaaaa cagacgagaa aatcttgatg gcttcacaag acatgcaaca 720
aacaaaatgg aatactgtga tgacatgagg cagccaagct ggggaggaga taaccacggg 780
gcagagggtc aggattctgg ccctgctgcc taaactgtgc gttcataacc aatcatttc 840
atatttctaa ccctcaaac aaagctgttg taatatctga tctctacggt tccttctggg 900
cccaacattc tccatatatc cagccacact ctttttaat atttagttcc cagatctgta 960
ctgtgacctt tctacactgt agaataacat tactcatttt gttcaaagac ccttctgttt 1020
gctgccta atgtagctga ctgtttttcc taaggagtgt tctggcccag gggatctgtg 1080
aacaggctgg gaagcatctc aagatctttc cagggttata cttactagca cacagcatga 1140
tcattacgga gtgaattatc taatcaacat catcctcagt gtctttgcc atactgaaat 1200
tcatttcca cttttgtgcc cattctcaag acctcaaat gtcattccat taatatcaca 1260
ggattaactt ttttttttaa cctggaagaa ttcaatgtta catgcagcta tgggaattta 1320
attaatatt ttgttttcca gtgcaaagat gactaagtcc tttatccctc ccctttgttt 1380
gattttttt ccagtataaa gttaaaatgc ttagccttgt actgaggctg tatacagcac 1440
agcctctccc catccctcca gccttatctg tcatcaccat caaccctcc catacaccct 1500
aaacaaatc taacttgtaa ttccttgaac atgtcaggac atacattatt ccttctgct 1560
gagaagctct tcottgtctc ttaaactag aatgatgtaa agttttgaat aagttgacta 1620
tcttacttca tgcaaagaag ggacacatat gagattcatc atcacatgag acagcaaata 1680
ctaaaagtgt aatttgatta taagagttta gataaatata tgaaatgcaa gagccacaga 1740
gggaatgttt atggggcacg tttgtaagcc tgggatgtga agcaaaggca gggaacctca 1800
tagtatctta tataatatac ttcatttctc tatctctatc acaatatoca acaagctttt 1860
cacagaattc atgcagtgca aatccccaaa ggtaaccttt atccatttca tggtgagtgc 1920
gctttagaat tttggcaaat catactggtc acttatctca actttgagat gtgtttgtcc 1980
ttgtagttaa ttgaaagaaa tagggcactc ttgtgagcca ctttagggtt cactcctggc 2040
aataaagaat ttacaaagag ctactcagga ccagttgtta agagctctgt gtgtgtgtgt 2100
gtgtgtgtgt gagtgtacat gccaaagtgt gcctctctct cttgacccat tatttcagac 2160
ttaaaacaag catgttttca aatggcacta tgagctgcca atgatgtatc accaccatat 2220

ES 2 427 853 T3

ctcattattc tccagtaaat gtgataataa tgtcatctgt taacataaaa aaagtttgac 2280
 ttcacaaaag cagctggaaa tggacaacca caatatgcat aaatctaact cctaccatca 2340
 gctacacact gcttgacata tattgttaga agcacctcgc atttgtgggt tctcttaagc 2400
 aaaataactg cattaggtct cagctggggc tgtgcatcag gcggtttgag aaatattcaa 2460
 ttctcagcag aagccagaat ttgaattccc tcatctttta ggaatcattt accaggtttg 2520
 gagaggattc agacagctca ggtgctttca ctaatgtctc tgaacttctg tccctctttg 2580
 tgttcatgga tagtccaata aataatgta tctttgaact gatgctcata ggagagaata 2640
 taagaactct gagtgatata aacattaggg attcaaagaa atattagatt taagctcaca 2700
 ctggtcaaaa ggaaccaaga tacaagaac tctgagctgt catcgtcccc atctctgtga 2760
 gccacaacca acagcaggac ccaacgcatg tctgagatcc ttaaatcaag gaaaccagtg 2820
 tcatgagttg aattctccta ttatggatgc tagcttctgg ccatctctgg ctctctctt 2880
 gacacatatt agcttctagc ctttgcctcc acgactttta tctttctcc aacacatcgc 2940
 ttaccaatcc tctctctgct ctggtgcttt ggacttcccc acaagaattt caacgactct 3000
 caagtctttt ctccatccc caccactaac ctgaatgcct agacccttat tttattaat 3060
 ttccaataga tgctgcctat gggctatatt gcttttagatg aacattagat atttaaagct 3120
 caagaggttc aaaatccaac tcattatctt ctctttcttt cacctccctg ctctctccc 3180
 tatattactg attgcaactga acagcatggg ccccaatgta gccatgcaaa tgagaaaccc 3240
 agtggctcct tgtggtacat gcatgcaaga ctgctgaagc cagaaggatg actgattacg 3300
 cctcatgggt ggaggggacc actcctgggc cttcgtgatt gtcaggagca agacctgaga 3360
 tgctccctgc ctccagtgtc ctctgcatct cccctttcta atgaagatcc atagaatttg 3420
 ctacatttga gaattccaat taggaactca catgttttat ctgccctatc aattttttaa 3480
 acttgctgaa aattaagttt tttcaaaatc tgtccttgta aattactttt tcttacagtg 3540
 tcttggcata ctatatcaac tttgattctt tgttacaact tttcttactc ttttatcacc 3600
 aaagtggctt ttattctctt tattattatt attttctttt actactatat tacgttgta 3660
 ttattttggt ctctatagta tcaatttatt tgatttagtt tcaatttatt tttattgctg 3720
 acttttaaaa taagtgattc ggggggtggg agaacagggg agggagagca ttaggacaaa 3780
 tacctaatac atgtgggact taaaacctag atgatgggtt gataggtgca gcaaaccact 3840
 atggcacacg tatacctgtg taacaaacct acacattctg cacatgtatc ccagaacgta 3900
 aagtaaaatt taaaaaaaaag tga 3923

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para detectar cáncer de próstata en una muestra de orina de un paciente humano, que comprende:
- 5 (a) realizar un ensayo de amplificación del ARN *in vitro* con dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma, usando un primer par de cebadores específico de una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata;
- 10 (b) realizar un segundo ensayo de amplificación del ARN *in vitro* con dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma, usando un segundo par de cebadores específico de una segunda secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata; y
- 15 (c) detectar dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata y dicha secuencia de ácido nucleico específica de la próstata;
- en el que la detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata o un incremento del nivel del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales se correlaciona con un riesgo de desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en dicho paciente; y
- 20 en el que una ausencia de detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata o detección de un menor nivel del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y la detección de dicha segunda secuencia de ácido nucleico específica de próstata se correlaciona con una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha amplificación de ARN se lleva a cabo en tiempo real.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha detección se realiza mediante detección por fluorescencia, quimioluminiscencia o colorimetría.
- 30 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho segundo ácido nucleico específico de próstata se selecciona del grupo que consiste en: ácido nucleico de PSA, calicreína humana 2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1.
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho ácido nucleico específico de próstata es ácido nucleico de PSA.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho ácido nucleico de PSA hibrida con la calicreína humana 2.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos primeros y segundos pares de cebadores son específicos del ARNm de PCA3 y secuencias de ARNm específicas de próstata, respectivamente.
- 45 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho ensayo de amplificación de ARN se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA);
- 50 (b) reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
- (c) ensayo de amplificación mediada por transcripción (TMA); y
- (d) reacción en cadena de la ligasa.
- 55 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha amplificación de PCA3 y dicho segundo ácido nucleico específico de próstata se realiza de forma simultánea.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha amplificación de PCA3 se lleva a cabo usando un par de cebadores compuesto por las SEC ID N° 3 y 4.
- 60 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicha detección de PCA3 se lleva a cabo usando una baliza molecular.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicha baliza tiene la secuencia expuesta en la SEC ID N° 6.
- 65 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que dicha amplificación de PSA se lleva

a cabo usando un par de cebadores compuesto por las SEC ID N° 1 y 2.

14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que dicha detección de PSA se lleva a cabo usando una baliza molecular de PSA.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dicha baliza de PSA tiene la secuencia expuesta en la SEC ID N° 5.

16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que dicha amplificación simultánea se lleva a cabo en un contenedor.

17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que dicha detección de PSA se lleva a cabo usando un marcador quimioluminiscente en un procedimiento de detección homogéneo.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho material quimioluminiscente es éster de acridinio.

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho ARN se extrae de dicha al menos una célula de próstata.

20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho ARN se extrae usando:

(a) un procedimiento de purificación a base de sílice; o

(b) un procedimiento de captura objetivo.

21. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que dicha muestra de orina es una muestra de orina miccionada de un paciente que tiene un mayor número de células de próstata en la misma.

22. El uso de un kit para evaluar la presencia de cáncer de próstata en un paciente o evaluar el riesgo de dicho paciente de desarrollar dicho cáncer analizando una muestra de orina de dicho paciente, en el que dicho kit comprende:

(a) un primer par de cebadores para amplificar un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata asociado con el cáncer de próstata de dicha muestra que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma;

(b) un segundo par de cebadores para amplificar un segundo ARNm específico de cáncer de próstata; y

(c) reactivos que permiten una detección de dicho PCA3 y dichos segundos productos de amplificación del ácido nucleico específico de próstata cuando está presente dicho PCA3 y/o dicho ARNm específico de próstata;

en el que dicho uso permite:

una correlación de una detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 o un nivel incrementado del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales se correlaciona con un riesgo de desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en dicho paciente; y

una correlación de una ausencia de detección de dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 o detección de un menor nivel del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y la detección de dicha segunda secuencia de ácido nucleico específica de próstata, con una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en el que dicho ARNm específico de próstata se selecciona del grupo que consiste en: ARNm de PSA, calicreína humana 2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1.

24. Un procedimiento de amplificación de ARN *in vitro* para determinar una predisposición a desarrollar cáncer de próstata o una presencia de cáncer de próstata en un paciente, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un polinucleótido de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13.

(ii) una secuencia de polinucleótido que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de polinucleótidos de (i); y

(iii) una secuencia de polinucleótidos completamente complementaria a la de (i) o (ii);

5 (b) poner en contacto dicha muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata;

10 (c) detectar en dicha muestra de orina la cantidad de dicho PCA3 y dichos segundos polinucleótidos específicos de próstata; y

15 (d) comparar la cantidad de dicho polinucleótido de PCA3 que hibrida con el oligonucleótido con un valor de corte predeterminado, validando dicha detección de PCA3 con dicha detección de dichos segundos polinucleótidos específicos de próstata y de este modo, determinar la presencia o ausencia de cáncer de próstata en la muestra de orina o extracto de la misma.

20 25. El procedimiento de la reivindicación 24, en el que dicho ARNm específico de próstata se selecciona del grupo que consiste en: ARNm de PSA, calicreína humana 2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1 y un ARNm de PCA3 específico de próstata que no está asociado con el cáncer de próstata.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en el que:

(a) dicho ARNm de PCA3 y dicho segundo ARNm específico de próstata se amplifican de forma simultánea en el mismo contenedor;

25 (b) la detección de dicho ácido nucleico de PCA3 y dicho segundo ácido nucleico específico de próstata se realiza en el mismo contenedor; o

(c) una combinación de (a) y (b).

30 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, 23 o 26, en el que dicho kit comprende además un control interno (CI), así como un cebador y/o una sonda y/o un reactivo para la amplificación y/o hibridación y/o detección de dicho control interno.

35 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho control interno (CI) se selecciona del grupo que consiste en:

(a) ácido nucleico purificado;

40 (b) células;

(c) partículas virales que contienen ácidos nucleicos objetivos; y

(d) orgánulos.

45 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en el que la detección de dicho ácido nucleico de control interno (CI) de dicho PCA3 y de dicho segundo ácido nucleico específico de próstata es diferente.

50 30. El procedimiento de la reivindicación 24 o 25, en el que la cantidad de dicho polinucleótido de PCA3 y de dicho segundo polinucleótido específico de próstata se determina usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un ensayo de amplificación; y

55 (b) un ensayo de hibridación.

31. El procedimiento de la reivindicación 24, 25 o 30, en el que la cantidad de dicho polinucleótido de PCA3 y de dicho segundo polinucleótido específico de próstata se determina usando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en:

60 (a) reacción en cadena de la polimerasa (PCR);

(b) amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA);

65 (c) amplificación mediada por transcripción (TMA); y

(d) reacción en cadena de la ligasa (LCR).

32. Un procedimiento *in vitro* de monitorizar una variación en el tiempo en el nivel de un ARNm de PCA3 asociado con cáncer de próstata en un paciente, que comprende:

5 (a) poner en contacto una muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con dicho ARNm de PCA3 asociado con el cáncer de próstata seleccionado del grupo que consiste en:

10 (i) un polinucleótido de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13.

(ii) una secuencia de polinucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con la secuencia de nucleótidos de (i); y

15 (iii) una secuencia de polinucleótidos completamente complementaria a la de (i) o (ii);

(b) poner en contacto dicha muestra de orina de dicho paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma con al menos un oligonucleótido que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata;

20 (c) detectar en dicha muestra de orina las cantidades de dicho ARNm de PCA3 y dicho segundo ARNm específico de próstata;

(d) repetir las etapas (a) y (b) usando una muestra de orina del paciente que comprende al menos una célula de próstata o extracto de ácido nucleico de la misma del paciente en un punto de tiempo posterior; y

25 (e) comparar la cantidad de dicho ARNm de PCA3 detectado en la etapa (d) con la cantidad de ARNm de PCA3 detectado en la etapa (c) y de este modo monitorizar la variación en el tiempo en el nivel de dicho ARNm de PCA3 asociado con el cáncer de próstata en el paciente,

30 en el que una ausencia de detección de dicho ARNm de PCA3 se valida mediante la detección de dicho ARNm de PCA3 específico de próstata en dicha muestra de orina.

33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicho segundo ARNm específico de próstata se selecciona del grupo que consiste en:

35 (a) ARNm de PSA, calicreína humana 2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1 y un ARNm de PCA3 específico de próstata que no está asociado con el cáncer de próstata; y

40 (b) un ARNm de PSA que también es hibridable con otros miembros de la familia de la calicreína.

34. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, 24, 25 y 30 a 33, en el que la muestra de orina o extracto de la misma está enriquecida con un control interno (CI) seleccionado del grupo que consiste en:

45 (a) ácido nucleico purificado;

(b) células;

(c) partículas virales que contienen ácidos nucleicos objetivos; y

50 (d) orgánulos.

35. El uso de un kit de diagnóstico para la detección de cáncer de próstata en un paciente o para evaluar el riesgo de dicho paciente de desarrollar dicho cáncer analizando una muestra de orina de dicho paciente, en el que dicho kit de diagnóstico comprende:

55 (a) al menos un contenedor que tiene dispuesto en el mismo al menos una sonda oligonucleotídica o cebador que hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata de dicha muestra seleccionado del grupo que consiste en:

60 (i) una secuencia de polinucleótidos de PCA3 de acuerdo con las SEC ID N° 9, 10 o 13;

(ii) una secuencia de polinucleótidos que es completamente complementaria a la de (i); y

(iii) una secuencia de polinucleótidos que hibrida en condiciones de rigurosidad elevada con (i) o (ii);

65 (b) al menos una sonda oligonucleotídica o cebador que hibrida con un segundo ARNm específico de próstata o

complementario del mismo de dicha muestra; y

(c) reactivos que permiten una detección de dicho ARNm de PCA3 y de dicho segundo ARNm específico de próstata cuando está presente dicho ARNm de PCA3 y/o dicho ARNm específico de próstata;

5 en el que una ausencia de detección de dicho ARNm de PCA3 o detección de un menor nivel del mismo en comparación con la cantidad presente en las muestras control normales y una presencia de dicho segundo ARNm específico de próstata valida una ausencia de cáncer de próstata o un menor riesgo de desarrollar el mismo en dicho paciente.

10 36. El uso de acuerdo con la reivindicación 35, en el que dicho reactivo de detección comprende un grupo indicador o marcador seleccionado del grupo que consiste en:

(a) radioisótopos;

15 (b) enzimas;

(c) grupos fluorescentes;

20 (d) biotina;

(e) grupos quimioluminiscentes; y

25 (f) partículas de pigmento.

37. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha muestra de orina que tiene un número incrementado de células de próstata es una muestra de orina de un tacto rectal.

38. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha muestra de orina contiene esperma.

exón 3

TAGAACAGC AAGATGACAA TATAATGCTT AAGTAGTGAC ATGTTTTTTC ACATTTCAG

Supuesto ORF

CCCCTTTAA TATCCACACA CACAGGAGC ACAAAGGAA GCACAGAGAT CCCTGGGAGA

A

AATGCCCGGC CGCCAICTTG GGTCAATCGAT GAGCCCTGCC CTGTGCCCTGG TCCCCTTCT

exón 4

GAGGGAAGGA CATTAGAAA TGAATTGATG TCTTCCCTTAA AGGATGGCA GGAAAACAGA

B

C

~~-----~~

prune.misclass(b94.dup1.pca.tr, mejor = 9)

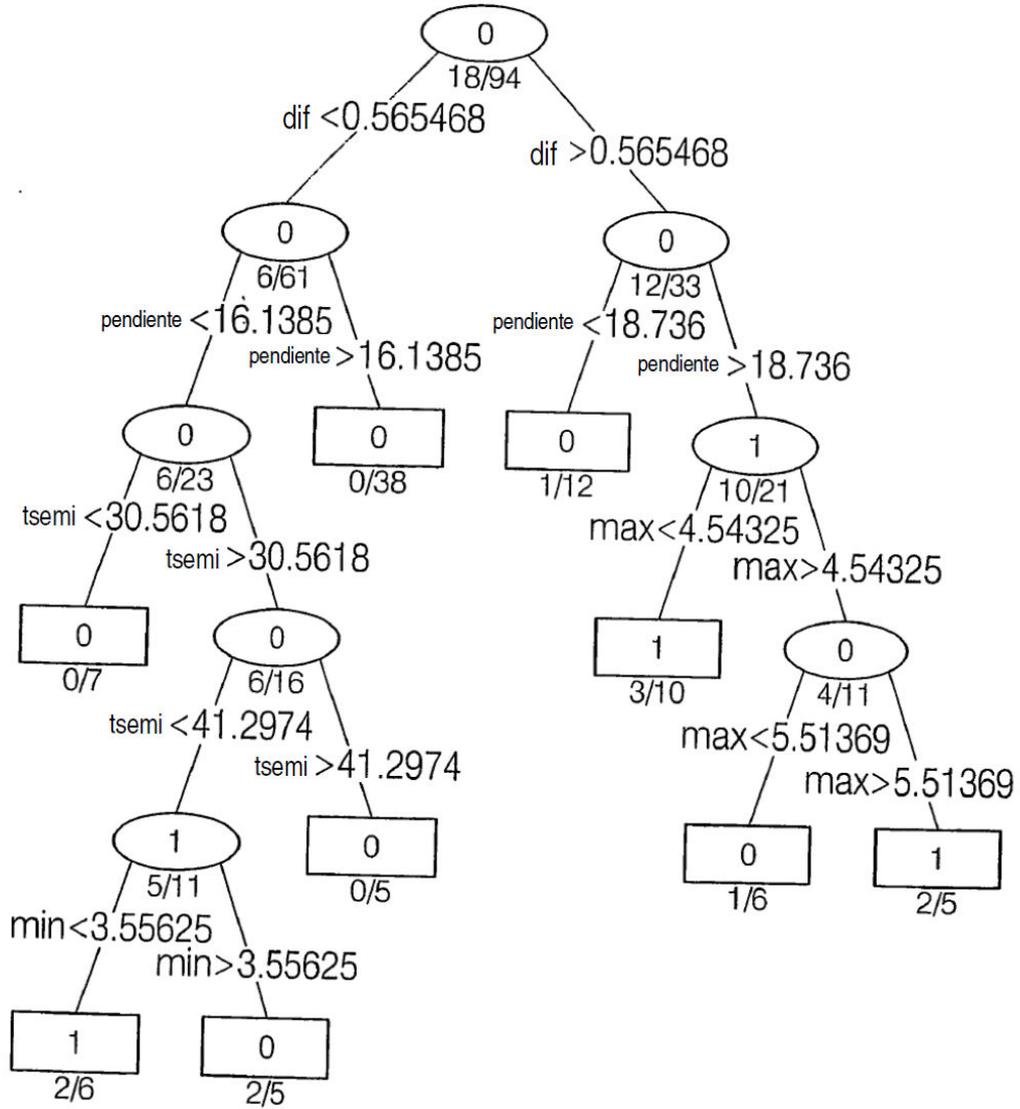


FIG. 2

prune.misclass(b243.dup1.pca.tr, mejor = 12)

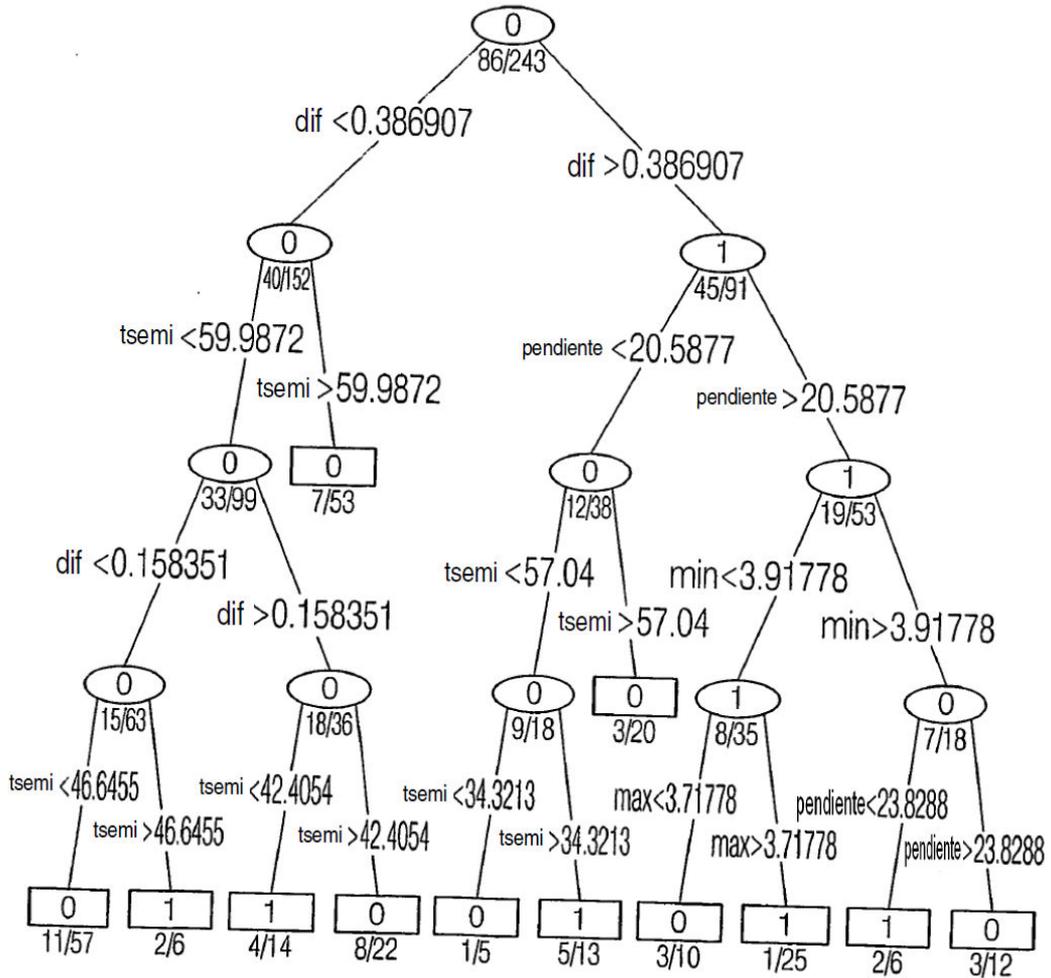


Fig. 3

prune.misclass(b106.dup1.pca.tr, mejor = 11)

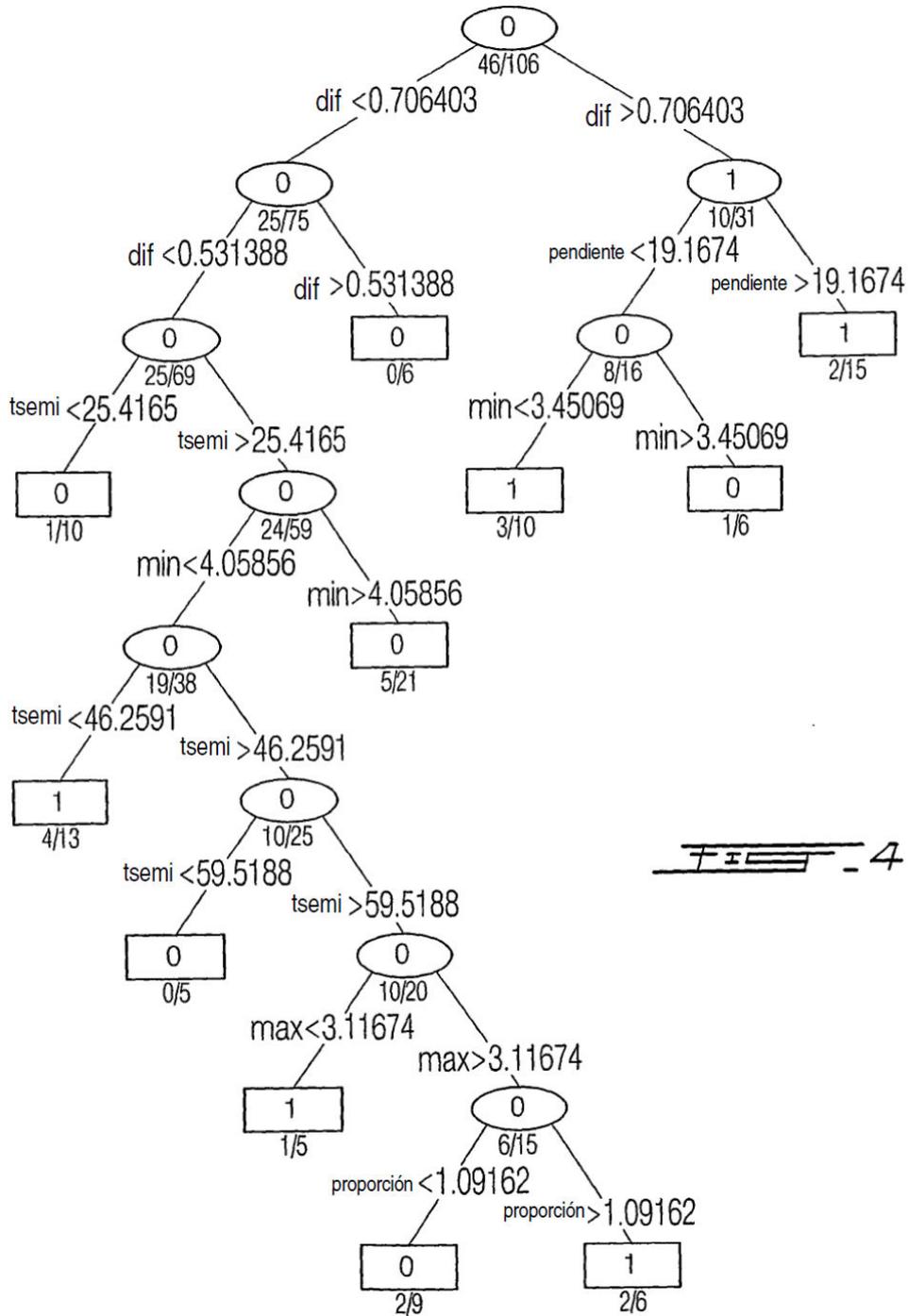


FIG. 4