

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 193**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2005 E 10152258 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2226394**

54 Título: **Razones de ARNm en sedimentos urinarios y/u orina como marcador pronóstico y/o  
tratanóstico del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**24.12.2004 CA 2491067  
23.09.2005 US 719557 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**21.09.2015**

73 Titular/es:

**STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT, THE  
UNIVERSITY MEDICAL CENTRE NIJMEGEN  
(100.0%)  
GEERT GROOTEPLEIN 10  
6500 HB NIJMEGEN, NL**

72 Inventor/es:

**HESSELS, DAPHNE;  
VERHAEGH, GERALD;  
SCHALKEN, JACK A. y  
WITJES, ALFRED J.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 546 193 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

Razones de ARNm en sedimentos urinarios y/u orina como marcador pronóstico y/o tratanóstico del cáncer de próstata.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, al cáncer de próstata. Más específicamente, la presente invención se refiere no sólo a un método para detectar el cáncer de próstata sino también para pronosticarlo y determinar el estadio del mismo. La presente invención se refiere a la estadificación y el pronóstico del cáncer de próstata mediante la determinación en una muestra de un paciente de la razón entre los ARNm expresados en sedimentos urinarios de pacientes. La invención se refiere adicionalmente al uso de las razones entre los ARNm prostáticos como un marcador tratanóstico del cáncer de próstata. También se describen kits que contienen cebadores de ácido nucleico y kits que contienen cebadores de ácido nucleico y sondas de ácido nucleico para diagnosticar, estadificar y pronosticar el cáncer de próstata en una muestra de humano afectado con cáncer de próstata.

**Antecedentes de la invención**

15 A lo largo de la última década, el cáncer de próstata se ha vuelto el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia entre los varones y la segunda causa principal de muerte masculina por cáncer, en la población occidental, después del cáncer de pulmón (Landis y col., 1998, CA Cancer J. Clin. 48(1):6-29). De todos los cánceres, la incidencia del cáncer de próstata se incrementa mucho más rápido con la edad. Como la longevidad se está incrementando entre la población occidental, continúa habiendo un aumento correspondiente en el número de cánceres de próstata, con un aumento esperado del 60%, solamente en esta década. La mortalidad se ha incrementado con una tasa más lenta, pero globalmente se ha duplicado en los últimos 50 años. Aunque la enfermedad se diagnostica típicamente en hombres con una edad superior a 65, su impacto sigue siendo significativo porque la esperanza de vida media de un hombre que muere por cáncer de próstata, se reduce en 9-10 años. Si se ha descubierto, el cáncer de próstata temprano se puede curar ahora quirúrgicamente en aproximadamente el 90% de los casos. Sin embargo, la enfermedad es lentamente fatal una vez que el tumor se expande fuera del área de la glándula y forma metástasis distantes. La detección precoz y la estadificación correcta tienen, por tanto, una gran importancia para la correcta elección de la terapia y deben mejorar la tasa de éxito de los tratamientos y reducir el índice de mortalidad asociado con el cáncer de próstata.

30 A pesar de numerosos avances en estos últimos años, la precisión con la que se puede determinar el estadio de una persona que padece cáncer de próstata, sigue siendo mejorable. La razón principal de ello es la falta de ensayos moleculares muy específicos y sensibles para determinar de forma adecuada el estadio y el hecho de que el tumor se expanda más allá de la próstata es generalmente microscópico más que macroscópico y, por lo tanto, difícil detectar. La exploración rectal digital de la próstata ha sido la piedra angular para determinar el estadio local del cáncer de próstata durante muchas décadas, pero a menudo se subestima la extensión de la enfermedad. Los ultrasonidos transrectales, por sí mismos, sólo tienen un valor limitado como medio para determinar el estadio del cáncer de próstata. La tomografía por ordenador y la formación de imágenes por resonancia magnética no han sido generalmente satisfactorias para determinar el estadio del cáncer de próstata (Kirby, 1997, "Prostate Cancer and Prostatic Diseases" 1:2-10). Unas aproximaciones recientes y prometedoras para determinar el estadio del cáncer de próstata implican el uso de tecnologías bioquímicas y moleculares, centradas en marcadores proteicos o en sus ácidos nucleicos correspondientes que se expresan preferentemente en las células de la próstata (Lange, 1997, en "Principles and Practice of Genitourinary Oncology" compiladores Lippincott-Raven, Ch. 41:417-425).

45 Los marcadores tumorales se encuentran frecuentemente en una muestra biológica de pacientes con cáncer en concentraciones elevadas comparados con los de personas sanas. Estos marcadores son frecuentemente proteínas o ácidos nucleicos que codifican tales proteínas. Los marcadores tumorales también pueden ser moléculas de ácido nucleico no codificantes. A veces tienen el potencial de ser útiles para determinar el estadio, vigilar y realizar un seguimiento de los pacientes con tumor.

50 El cambio de nivel del marcador tumoral, así como su valor comparado con una persona sana promedio, tiene el potencial de ser utilizado para monitorizar el tratamiento del cáncer. Una subida persistente o un valor superior a un umbral definido, puede ser indicativo de un cáncer recurrente o de un estadio concreto del cáncer. En algunos casos, los marcadores tumorales también se pueden utilizar para detectar las personas sospechosas de tener cáncer, estando frecuentemente dichos marcadores tumorales en un número elevado antes de la aparición de cualquier prueba clínica de la enfermedad.

55 La identificación de los marcadores o de los antígenos tumorales asociados con el cáncer de próstata, ha estimulado un interés considerable debido a su uso en la detección, el diagnóstico, el pronóstico, la gestión clínica y el tratamiento potencial del cáncer de próstata. De hecho, pacientes con la enfermedad confinada localmente, se pueden curar frecuentemente mediante prostatectomía radical o terapia de radiación, pero para pacientes con una enfermedad extendida de forma distante, no hay un tratamiento curativo disponible. Esto acentúa la necesidad de nuevas dianas terapéuticas específicas para la próstata (cáncer). Se han descrito distintos genes que se expresan específicamente en la próstata, p. ej., PSA (Sokoll y col., 1997, "Prostate-specific antigen. Its discovery and

biochemical characteristics". Urol. Clin. North. Am. 24:253-259), el antígeno de la membrana específico de la próstata (PSM: Fair y col., 1997, "Prostate-specific membrane antigen". Prostate 32:140-148), el antígeno de células pluripotenciales de la próstata (Reiter y col., 1998. "Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735-1740), TMPRSS2 (Lin y col., 1999. "Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2". Cancer Res. 59:4180-4184), PDEF (Oettgen y col., 2000. "PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression". J. Biol. Chem. 275:1216-1225), el gen-1 específico de la próstata (Herness, 2003. "A novel human prostate-specific gene-1 (HPG-1): molecular cloning, sequencing, and its potential involvement in prostate carcinogenesis". Cancer Res. 63:329-336), e incluso algunos ARN no codificantes (ARNnc), tales como PCA3 (Bussemakers y col., 1999. "DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer" [Cancer Res. 59:5975-5979], documentos de patentes WO98/045420, WO01/0235, WO2004/070056, WO2005/003387), PCGEM1 (Srikantan y col., 2000. "PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:12216-12221) y la agrupación de los genes P704P, P712P y P775P (Stolk y col. 2004. P704P, P712P y P775P: "A genomic cluster of prostate-specific genes". Prostate 60:214-226). Solamente una fracción de estos genes se ha asociado con el pronóstico, la progresión y/o la capacidad metastásica del cáncer de próstata y con potencial para ser dianas terapéuticas valiosas. Los marcadores tumorales de la próstata más conocidos, utilizados para la vigilancia, el seguimiento, la supervisión y la elección del tratamiento contra el cáncer de próstata son el PSA (antígeno específico de la próstata) y el antígeno PSM (de membrana específico de la próstata).

PSA es una proteasa de serina codificada por el gen PSA situado en el cromosoma 19. Esta glicoproteína se expresa bajo control andrógeno en las células epiteliales glandulares de la próstata y es secretada en el plasma seminal para licuarla. La proteína PSA está confinada normalmente en la próstata, pero en el caso de enfermedad prostática, tal como cáncer o BPH (hiperplasia benigna de la próstata), la PSA se filtra a la sangre en donde está presente en diferentes formas, incluyendo una forma que está unida a complejos proteicos y una forma no unida a los mismos (EL-Shirbiny, 1994, Adv. Clin. Chem. 31:99). La medición de las concentraciones totales en suero de PSA es uno de los ensayos bioquímicos empleados más frecuentemente y aprobados por la FDA, para la detección y el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata. Los estudios realizados hasta la fecha han sugerido que la detección con PSA, conjuntamente con exámenes rectales digitales y ultrasonidos transrectales, aumentan la detección de cánceres de próstata tempranos, a menudo porque todavía están localizados en la glándula misma (Brawer y col., 1992, J. Urol. 147:841). El PSA sérico es también útil para el control de pacientes después de la terapia, especialmente después de prostatectomía quirúrgica. Sin embargo, las mediciones de PSA total también identifican una gran cantidad de pacientes con niveles anormalmente elevados, en los que posteriormente se observa que no tienen cáncer de próstata. Recientemente, el concepto de medir el porcentaje de la razón entre PSA libre/total, ha mostrado que incrementa la especificidad de la detección del cáncer de próstata en hombres con un PSA entre 4 y 10 ng/ml (Letran y col., 1998, J. Urol. 160:426).

El gen de PSM codifica una glicoproteína transmembranal expresada por las células epiteliales de próstata normal, de hiperplasia benigna de la próstata y, en un mayor grado, de tejido prostático canceroso. Bajos niveles de PSM también se detectan en algunos tejidos distintos (Israeli y col., 1994, Cancer Res. 54:1807). PSA y PSM también han sido dianas para las vías de aproximación molecular al cáncer de próstata usando RT-PCR (transcripción inversa - reacción en cadena de la polimerasa). Los análisis con RT-PCR de sangre, ganglios linfáticos y médula ósea de pacientes con cáncer de próstata, empleando PSA y PSM, han mostrado la extrema sensibilidad de esta vía. Sin embargo, son necesarias otras investigaciones para establecer la utilidad de PSM como un marcador del cáncer de próstata.

Un marcador nuevo del cáncer de próstata, PCA3, fue descubierto hace algunos años mediante análisis de la expresión diferencial de genes, destinado a destacar los genes asociados con el desarrollo del cáncer de próstata (documento de solicitud de patente PCT número PCT/CA98/00346 y número de solicitud PCT/CA00/01154). PCA3 se sitúa en el cromosoma 9 y está compuesto por cuatro exones. Codifica por lo menos cuatro transcritos diferentes que se generan mediante corte y empalme alternativos y poliadenilación. Mediante el análisis con RT-PCR, se observó que la expresión de PCA3 estaba limitada a la próstata y estaba ausente en todos los demás tejidos, incluyendo los testículos, el ovario, la mama y la vejiga. El análisis con transferencia de tipo Northern mostraba que PCA3 se expresa de forma elevada en la gran mayoría de los cánceres de próstata examinados (47 de 50), mientras que no se detectaba la expresión o ésta era muy baja, en la hiperplasia benigna de la próstata o en células normales de la próstata de los mismos pacientes. Una búsqueda de la proteína codificada por el ORF putativo de PCA3, todavía no ha tenido éxito. Además, basándose en el análisis de la secuencia y en experimentos de traducción *in vitro*, no se ha encontrado un producto proteico para PCA3, por lo tanto se refuerza la opinión de que PCA3 es un ARN no codificante (ARNnc). Así, aunque, sigue siendo posible que un polipéptido sea codificado por PCA3 (y degradado, procesado, etc., rápidamente), parece muy probable que PCA3 es un ARNnc.

PCA3 sería así el primer ARN no codificante descrito en relación con el cáncer de próstata. Una cosa que se ha demostrado claramente, sin embargo, es que PCA3 es el gen más específico del cáncer de próstata identificado hasta la fecha. PCA3 se corta y se empalma alternativamente, se poliadenila y se hiperexpresa de 50-500 veces más en el 95% de los tejidos de cáncer de próstata y de metástasis de cáncer de próstata, en comparación con tejidos normales de la próstata (de Kok y col., 2002. "PCA3, a very sensitive and specific marker to detect prostate

tumors". *Cancer Res.* 62:2695-2698; Hessels y col., 2003. "PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer". *Eur. Urol.* 44:8-16). No se detecta una expresión en otros tejidos normales o cancerígenos. Se ha descrito un método para detectar la expresión del ARNm de PCA3 y de PSA como marcador de las células prostáticas en la orina (Tinzl y col., 2004, *Eur Urol.* 46(2):182-186).

5 El gen PCA3 está compuesto por 4 exones (e1-e4) y por 3 intrones (i1-i3). Aunque PCA3 parece que está reconocido como el mejor marcador del cáncer de próstata identificado jamás, esta especificidad se ha refutado en la bibliografía. Por ejemplo, Gandini y col., (*Cancer Res.* 2003; 63(15):4747) reivindican que la expresión específica de la próstata de PCA3 está restringida a la del exón 4 del gen PCA3. Sin embargo, los solicitantes han mostrado en una solicitud de patente reciente que esto no es el caso (documento WO05/003387). Hay una hiperexpresión de  
10 PCA3 que es por lo veces 20 veces mayor en carcinomas prostáticos, en comparación con tejidos normales o de BPH. Aunque la expresión de PCA3 parece que se incrementa con el grado del tumor y se detecta en lesiones metastásicas, una correlación verdadera entre la expresión de PCA3 y el grado del tumor no se ha establecido nunca.

15 En la investigación del cáncer, ahora se acepta sin problemas que la agresividad del cáncer está relacionada con el grado de invasión de la célula cancerosa. Cientos de artículos lo han demostrado. Aún más, los mecanismos moleculares asociados con la invasión y la metástasis cada vez se van entendiendo mejor. Sin embargo, estos hallazgos parecían restringidos a la detección de células cancerosas que circulaban en la sangre. La hipótesis de trabajo era que las células cancerosas invasivas migrarían con la corriente sanguínea y que de este modo, el número de células cancerosas en la circulación sería proporcional al grado de invasión de un cáncer. Mientras que  
20 este concepto ganó mucha atención hace más de cinco años, la validación experimental todavía no se ha conseguido. Así, el concepto de medir las células cancerosas en un fluido corporal, tal como sangre en particular, todavía se está debatiendo con vehemencia.

Con la introducción de tecnologías de amplificación altamente sensibles, tales como la tecnología de la PCR con la que se puede conseguir, en algunos estados, una detección tan pequeña como la de una sola célula tumoral en un  
25 fondo de células predominantemente normales, llegó a ser factible mejorar el diagnóstico del cáncer en muestras de sangre. Se supone que los transcritos de células epiteliales no se encuentran normalmente en la circulación sanguínea. Por lo tanto, la detección de estos transcritos en el suero o en el plasma podía indicar la presencia de células diseminadas del cáncer de próstata. En los últimos 12 años se han escrito numerosos artículos sobre la detección que se basa en la RT-PCR de células de cáncer de próstata diseminadas empleando el ARNm de PSA como diana. Sin embargo, se han observado diferencias notables en la sensibilidad de los ensayos basados en la  
30 RT-PCR, puesto que estos ensayos eran cualitativos, no estaban normalizados y eran difíciles de reproducir en diferentes laboratorios (Foster y col., 2004, *Oncogene*, 23, 5871-5879). Para mejorar la sensibilidad de estos ensayos, los investigadores emplearon PCR anidada. Desafortunadamente, esto condujo a la amplificación de falsos transcritos (Smith y col., 1995, "Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases" [*Cancer Res.* 55: 2640-2644]). Estos transcritos detectados fueron producidos y secretados en bajas cantidades por cualquier célula normal en el cuerpo, tal como las células sanguíneas o las células epiteliales normales. Consecuentemente, los transcritos de ARNm de PSA se encontraron en el suero de mujeres y de testigos sanos (Henke y col., 1997, "Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA  
35 mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood" [*Int. J. Cancer.* 70:52-56]). Como tales, estos métodos basados en RT-PCR tenían un valor limitado. Los nuevos ensayos sensibles, cuantitativos y más reproducibles que empleaban patrones internos exógenos para la detección de los transcritos de ARNm de PSA y hK2 superaron este problema (Ylikoski y col., 2002, "Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease" [*Clin. Chem.* 48:1265-1270]). Sin embargo, se presentó otro problema al usar transcritos organoespecíficos a diferencia de los transcritos específicos del cáncer, tales como ARNm de PSA y ARNm de hK2. De hecho, los transcritos del ARNm de PSA se detectaron en el suero o en el plasma de hombres con y sin cáncer de próstata, después de biopsias de la próstata, lo que conducía a una señal falsa positiva de la presencia de una célula cancerosa diseminada (Moreno y col., 1997, "Transrectal ultrasound-guided biopsy causes hematogenous dissemination of  
40 prostate cells as determined by RT-PCR" [*Urology* 49:515-520] y Polascik y col., 1999, "Influence of sextant prostate needle biopsy or surgery on the detection and harvest of intact circulating prostate cancer cells" [*J. Urol.* 162:749-752]). Por tanto, sigue existiendo una necesidad de identificar genes específicos del cáncer de próstata que sean auténticos y se hiperexpresen de forma elevada que podrían ser utilizados en un ensayo cuantitativo basado en la amplificación.

55 El primer indicio de la aparición de células cancerosas en el conducto (y por tanto en un fluido glandular) fue proporcionado por Hessels y col., 2003 (*Eur. Urol.* 44: 8-16). Todavía está sin demostrar si el aumento relativo del número de células cancerosas en un órgano está correlacionado con su capacidad invasora. También existe una necesidad de mostrar si el aumento de células cancerosas en un fluido glandular se correlacionaría con el aumento de la capacidad invasora de células cancerosas en esa glándula (p. ej., la próstata). También está sin determinar si tal capacidad invasora estaría reflejada en la sangre, la orina u otro líquido corporal. De hecho, aunque la hipótesis de que un aumento de las células cancerosas en la sangre (cuando se originan a partir de líquidos glandulares) se correlaciona con el grado del cáncer ya se ha propuesto hace bastante tiempo, la validación clínica de esa hipótesis  
60 todavía no se ha proporcionado.

Debido al hecho de que el cáncer de próstata permanece siendo una enfermedad que amenaza la vida, que alcanza una porción significativa de la población masculina, sigue habiendo una necesidad de un diagnóstico, un pronóstico y/o un tratamiento eficaces y rápidos. El desarrollo de ensayos moleculares para determinar el estadio de forma adecuada que posibilite, entre otras cosas, la selección de una terapia apropiada debe mejorar la tasa de supervivencia. Sin embargo, a pesar de numerosos avances en estos últimos años, la precisión con la que se puede determinar el estadio de una persona que padece cáncer de próstata no es óptima. Uno de los inconvenientes de usar PSA o PSM para determinar el estadio del cáncer de próstata es que estos marcadores se expresan en células normales y en cancerosas. Además, los tumores mal diferenciados pueden escapar al diagnóstico puesto que tienden a producir significativamente menos proteína PSA que los tumores menos agresivos. Este es el caso del 10% de los cánceres de próstata.

Por ello, sigue habiendo una necesidad de proporcionar un ensayo mejor para la estadificación y el pronóstico del cáncer de próstata. También sigue habiendo una necesidad de proporcionar un ensayo para el cáncer de próstata que sea más fiable y más específico para la detección, la estadificación y los métodos de tratamiento del cáncer de próstata.

La presente invención trata de satisfacer estas y otras necesidades.

La presente descripción se refiere a un número de documentos cuyo contenido se incorpora en la presente memoria mediante referencia en su totalidad.

### Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la razón entre PCA3 y un segundo marcador específico de la próstata, ambos expresados en una muestra de orina, no sólo establece la presencia, la ausencia o la predisposición al cáncer de próstata, sino que también determina de forma sorprendente, específica y sensible la capacidad agresiva del cáncer de próstata y las consecuencias de la enfermedad.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para pronosticar el cáncer de próstata en una muestra de orina de un paciente, que comprende:

- (a) valorar la cantidad de un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de un marcador específico de próstata en dicha muestra de orina;
- (b) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de dicho ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad del marcador específico de próstata; y
- (c) comparar dicho valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado,

en donde dicho valor de la razón por encima de dicho valor umbral predeterminado es indicativo de un cáncer de próstata más agresivo en comparación con un valor de la razón por debajo de dicho valor umbral predeterminado.

Además, se descubrió inesperadamente que el valor de la razón entre PCA3 y un segundo marcador específico de próstata (p. ej., PSA) podría estar correlacionado con el volumen del tumor. Puesto que el pronóstico de un paciente individual con carcinoma de próstata está fuertemente correlacionado con el volumen del tumor, los ensayos moleculares de la presente invención están validados adicionalmente como herramientas para el pronóstico y muestran su precisión en el pronóstico de la enfermedad. Por tanto, los médicos pueden tomar decisiones más capacitadas. Por ejemplo, el régimen de tratamiento específico se puede adaptar a cada paciente para tratar de forma más eficaz el cáncer de próstata, basándose en el valor de la razón que se determina. En una realización particular, este segundo marcador específico de la próstata es PSA.

Por ello, la presente invención da a conocer por primera vez un estudio de casos y testigos que muestra directamente la asociación entre la razón de la expresión entre PCA3/PSA en una muestra, el volumen del tumor y la agresividad del cáncer de próstata. Más particularmente, la presente invención se refiere a la determinación cuantitativa de la razón de la expresión entre los ARNm de PCA3/PSA en una muestra de orina como marcador para la estadificación y la agresividad del cáncer de próstata.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de próstata en una persona, que comprende: (a) determinar el valor de la razón entre los ARNm de PCA3/PSA expresados en una muestra; y (b) correlacionar la razón con la presencia o la ausencia de cáncer de próstata, así como la agresividad y el riesgo de mortalidad del cáncer de próstata.

En esta memoria, los términos "diagnóstico" (sustantivo), "diagnóstico" (adjetivo), "diagnosticar" y similares, tal y como son bien conocidos en la técnica, se refieren a una identificación del cáncer de próstata o a una predisposición a desarrollar cáncer de próstata, basándose en la detección de por lo menos una macromolécula (p. ej., PCA3, PSA). Los términos "prognosis", "pronóstico", "pronosticar" y similares, tal y como son bien conocidos en la técnica, se refieren a la capacidad de predecir, pronosticar o correlacionar una detección o una medición dada con las consecuencias futuras del cáncer de próstata del paciente (p. ej., estado canceroso, probabilidad de curar el cáncer

de próstata, supervivencia y similares). De acuerdo con una realización de la presente invención, una medición de la razón entre PCA3/PSA es un diagnóstico o una determinación del grado del tumor y/o del volumen del tumor. Por lo tanto, basándose en los conocimientos clínicos del grado del tumor y/o del volumen del tumor, esta razón posibilita un pronóstico de la enfermedad (p. ej., la tasa de supervivencia). En otra realización, una determinación de la razón a lo largo del tiempo posibilita predecir las consecuencias para el paciente (p. ej., aumento o disminución del estado cancerígeno, aumento o disminución del grado de un tumor prostático, probabilidad de curación del cáncer de próstata, supervivencia y similares).

Por razón de testigo normal se entiende una razón medida entre la expresión génica detectada en una persona normal y sana, o en una población de personas que no padecen cáncer de próstata. Una persona normal es una sin síntomas clínicos de cáncer de próstata. Un aumento en la razón entre PCA3/PSA se corresponde con un aumento en la cantidad de ARNm de PCA3 detectado en función de la cantidad de PSA detectado, y se correlaciona positivamente con el estado cancerígeno, el grado del tumor y el volumen del tumor, y se correlaciona negativamente con la tasa de supervivencia. En cambio, una disminución de la razón entre PCA3/PSA se corresponde con una disminución de la cantidad de ARNm de PCA3 detectado en función de la cantidad de PSA detectado y se correlaciona con una disminución del estado cancerígeno, del grado del tumor o del volumen del tumor, y se correlaciona con un aumento de la tasa de supervivencia.

La presente invención también se refiere a métodos de trataméntico, es decir, con el uso del ensayo molecular de la presente invención para diagnosticar la enfermedad, elegir o adaptar el régimen de tratamiento más adecuado o correcto y/o vigilar la respuesta del paciente al tratamiento.

Así, la presente invención también se refiere a un método para detectar, y para determinar más específicamente el estadio de un cáncer de próstata en una muestra procedente de una persona, a fin de elegir el tratamiento apropiado.

Los métodos de la invención se pueden realizar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Sin embargo, un método más preferido es un método realizado sobre muestras biológicas, particularmente sobre muestras de orina, resecciones del tejido de la próstata, biopsias del tejido de la próstata, semen o sobre lavados vesicales.

En una realización, la presente invención caracteriza un método para determinar el pronóstico del cáncer de próstata en una persona, que comprende: (a) determinar el valor de la razón entre PCA3/segundos ARNm específicos de próstata expresados en una muestra; y (b) correlacionar dicha razón entre PCA3/segundos ARNm específicos de próstata con la presencia o la ausencia de cáncer de próstata, así como la agresividad o el riesgo de mortalidad del cáncer de próstata. En una realización particular, el segundo ARNm específico de la próstata es ARNm de PSA y la muestra de orina se obtiene después de una exploración rectal digital (DRE).

En una realización particular, la presente invención se ocupa de un método para pronosticar el cáncer de próstata en una muestra biológica de un paciente, que comprende: (a) valorar la cantidad de ARNm de PCA3 específico del cáncer de próstata y la cantidad de PSA en la muestra biológica; (b) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA y (c) comparar el valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado, en donde un valor de la razón superior al valor umbral predeterminado es indicativo de mayor riesgo de mortalidad por cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón inferior al valor umbral predeterminado.

En otra realización particular, la presente invención se refiere a un método para pronosticar cáncer de próstata en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata; (b) poner en contacto la muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ARNm de PSA; (c) determinar la cantidad de ARNm de PCA3 y la cantidad de ARNm de PSA presentes en la muestra biológica; (d) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ARNm de PCA3 en función de la cantidad de ARNm de PSA; y (e) comparar el valor de la razón entre la cantidad de ARNm de PCA3 y la cantidad de ARNm de PSA con al menos un valor umbral predeterminado, en donde un valor de la razón superior al valor umbral predeterminado es indicativo de la presencia de un cáncer de próstata más agresivo en comparación con un valor de la razón inferior al valor umbral predeterminado que es indicativo de la presencia de un cáncer de próstata menos agresivo.

En otra realización particular, la presente invención se refiere a un método para determinar el volumen tumoral del cáncer de próstata en una muestra de orina, que comprende: (a) valorar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico del cáncer de próstata y la cantidad de PSA en una muestra; (b) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico del cáncer de próstata y la cantidad de PSA; y (c) comparar el valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado, en donde un valor de la razón superior al valor umbral predeterminado es indicativo de un mayor volumen tumoral del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón inferior al valor umbral predeterminado.

También se describe un método para monitorizar el crecimiento tumoral del cáncer de próstata en una muestra biológica de un paciente, que comprende: (a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en la muestra biológica en un primer punto temporal; (b) determinar un valor de la

razón entre la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA; (c) repetir las etapas (a) y (b) con una muestra biológica procedente del paciente en un punto temporal posterior; y (d) comparar el valor de la razón obtenido en la etapa (b) con el valor de la razón obtenido en la etapa (c), en donde un valor de la razón superior en la etapa (c) en comparación con el valor de la razón obtenido en la etapa (b) es indicativo de la progresión del cáncer de próstata y de un mayor volumen tumoral.

También se describe un método para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en una muestra biológica, que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata; (b) poner en contacto la muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PSA; (c) determinar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 y la cantidad de ácido nucleico de PSA presentes en la muestra biológica; (d) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ácido nucleico de PCA3 y la cantidad de ácido nucleico de PSA; (e) repetir las etapas (a) a (d) en un punto temporal posterior; y (f) comparar el valor de la razón obtenido en la etapa (d) con el valor de la razón obtenido en la etapa (e), en donde un valor de la razón superior en la etapa (e) en comparación con el valor de la razón obtenido en la etapa (d) es indicativo de la progresión del cáncer de próstata.

También se describe un kit para diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata, que comprende por lo menos un medio de recipiente que tiene dispensado en el mismo (a) al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata, seleccionado entre el grupo consistente en (i) una secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID n.º 1, (ii) una secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID n.º 2, (iii) una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a (i) o a (ii), y (iv) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas con la secuencia de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii); (b) al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PSA seleccionado entre el grupo consistente en (i) una secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID n.º 38, (ii) una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a (i), (iii) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas con la secuencia de ácido nucleico de (i) o (ii); y (c) instrucciones para determinar el diagnóstico y el pronóstico de cáncer de próstata, basadas en la detección de una razón particular entre el nivel de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y el nivel de ácido nucleico de PSA.

También se describe un método para determinar el riesgo de progresión del cáncer de próstata después del tratamiento, que comprende: (a) valorar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en una muestra antes del tratamiento; (b) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA; (c) repetir las etapas (a) y (b) con una muestra biológica procedente del paciente después del tratamiento; y (d) comparar el valor de la razón obtenido después del tratamiento con el valor de la razón obtenido antes del tratamiento, en donde un valor de la razón superior en la muestra después del tratamiento en comparación con el valor de la razón obtenido antes del tratamiento es indicativo de la progresión del cáncer de próstata.

Además, en una realización particular, la presente invención se refiere a un método para determinar el estadio del cáncer de próstata en una muestra de orina de un paciente, que comprende: (a) valorar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico del cáncer de próstata y la cantidad de PSA en la muestra biológica; (b) determinar un valor de la razón entre la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA; (c) comparar el valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado; y (d) correlacionar un valor de la razón con un estadio concreto del cáncer de próstata, en donde un valor de la razón superior al valor umbral predeterminado indica un estadio más avanzado del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón inferior al valor umbral predeterminado, con lo que se estadifica el cáncer de próstata.

En otra realización particular, la presente invención se refiere a un método para pronosticar el cáncer de próstata en un paciente humano, que comprende: (a) realizar un ensayo de amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos sobre una muestra de orina del paciente o sobre un extracto de la misma, empleando una primera pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y una segunda pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico de PSA; (b) cuantificar la secuencia de ácido nucleico de PCA3 y la secuencia de ácido nucleico de PSA; y (c) calcular una razón normalizada entre PCA3 y PSA, en donde la razón se puede correlacionar con un nivel de ARNm de PCA3 y un nivel de ARNm de PSA en el paciente, en donde la razón normalizada entre PCA3 y PSA se correlaciona positivamente con un grado o un estadio del cáncer de próstata.

También se describe un kit para pronosticar el cáncer de próstata en un paciente, que comprende: (a) una primera pareja de cebadores específica para la amplificación de un ácido nucleico de PCA3 asociado al cáncer de próstata presente en la muestra del paciente; (b) una segunda pareja de cebadores específica para la amplificación de un ácido nucleico de PSA; (c) reactivos que hacen posible la detección cuantitativa de los productos de amplificación del ácido nucleico de PCA3 y de PSA cuando el PCA3 y la segunda secuencia de ácido nucleico específico de la próstata están presentes; y (d) instrucciones para determinar el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de próstata basándose en la detección de una razón específica entre el nivel de ácido nucleico de PCA3 específico del cáncer de próstata y el nivel de ácido nucleico de PSA.

En todavía otra realización, se valoran los niveles séricos de la proteína PSA para hacer una preselección de los

pacientes que necesitan adicionalmente un análisis de la razón PCA3/PSA. En una realización particular, para el análisis adicional se emplea un valor umbral de 3 ng/ml del nivel de la proteína PSA sérica. Por supuesto, se pueden utilizar otros valores umbrales de la proteína PSA sérica, dependiendo de los requisitos particulares del ensayo (sensibilidad y especificidad de la diana). Además, los niveles séricos del ARNm de PSA podrían emplearse alternativamente de acuerdo con la presente invención para hacer la preselección de los pacientes que requieren un análisis de la razón PCA3/PSA.

En una realización relacionada, la razón entre los ARNm de PCA3/PSA expresados en una muestra se determina por detección de los ARN codificados por los genes de PCA3 y de PSA con un método de amplificación. En otra realización, el método de amplificación del ARN está acoplado a la detección en tiempo real de los productos amplificados mediante el uso de sondas específicas fluorescentes. En aún otra realización, el método de la amplificación es PCR o RT-PCR. En una realización adicional, la RT-PCR es una RT-PCR en tiempo real o un método relacionado que posibilita la detección en tiempo real de los productos amplificados.

En otra realización, los ARN codificados por los genes de PCA3 y de PSA se detectan en un extracto de ácido nucleico por un método de amplificación de ARN *in vitro*, denominado amplificación basada en ácidos nucleicos (NASBA). Por supuesto, se conocen otros métodos de amplificación de ARN, y, por tanto, los métodos presentes de la presente invención y los kits descritos en esta memoria no están limitados a la NASBA. Ejemplos no limitativos de tales métodos de amplificación de ARN incluyen la amplificación mediada por transcriptasa (TMA), la amplificación por círculo rodante, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR).

En otra realización, los productos amplificados se detectan en una fase homogénea con una sonda fluorescente. En una realización, se emplea la estrategia de balizas moleculares. En otra realización, los productos se detectan sobre fase sólida con un método fluorescente o colorimétrico. Se ha de saber, por tanto, que se pueden utilizar numerosos métodos fluorescentes, colorimétricos o enzimáticos de acuerdo con la presente invención para detectar y/o cuantificar los ARN. También se pueden utilizar en la presente invención otros tipos de sondas y cebadores marcados u otros tipos de métodos de detección (p. ej., ensayos de hibridación, tales como transferencias de tipo Northern, transferencias puntiformes o transferencias en ranuras, y sondas y cebadores radiomarcados).

La amplificación y/o la detección de los ARN codificados por los genes de PCA3 y de PSA para determinar el nivel y la razón de la expresión de estos ARN en una muestra se puede realizar simultáneamente o por separado. La muestra biológica se puede seleccionar del grupo consistente en resección de tejido de la próstata, biopsias de tejido de la próstata, semen y lavados vesicales. La muestra de orina obtenida después de una exploración rectal digital (DRE) es particularmente útil. Por supuesto, se ha de saber que los métodos y kits presentes también se podrían utilizar sobre una muestra de orina obtenida sin DRE, o en otros tipos de muestras, tales como esperma u orina mezclada con esperma (p. ej., primera muestra de orina después de una eyaculación), con la condición de que el método de amplificación y/o el método de detección sea suficientemente sensible para detectar los marcadores deseados (PCA3 y el segundo marcador). Los experimentos mostraban que los métodos de la presente invención y los kits descritos en esta memoria también se podrían realizar con estos tipos de muestras.

En una realización, los ARN codificados por los genes de PCA3 y de PSA se amplificaron a partir de una célula que estaba en una muestra de orina de micción procedente de una persona.

En una realización, se recogen las células de la muestra de orina y se realiza una extracción de los ácidos nucleicos totales. En una realización particular, la extracción de los ácidos nucleicos totales se realiza con un método de banda en fase sólida sobre perlas de sílice, tal y como describen Boom y col., 1990 (J. Clin. Microbiol. 28:495-503). En otra realización, se purifican los ácidos nucleicos con otro método de captura con diana (véase más abajo). Por supuesto, se ha de saber que existen numerosos métodos de extracción y de purificación de ácidos nucleicos y que, por ello, se podrían utilizar otros métodos de acuerdo con la presente invención. Ejemplos no limitativos incluyen un método de extracción con fenol/cloroformo y un método de purificación con captura de la diana (véase más abajo). Otros métodos similares se describen en los libros de texto a los que se hace referencia en esta memoria. También se debe reconocer que numerosos medios para estabilizar o para proteger las células de la próstata contenidas en la muestra de orina o en otra muestra, así como para estabilizar o proteger el ARN presente en estas células, son bien conocidos en la técnica.

En otra realización, los métodos de la presente invención se realizan con una muestra bruta, sin purificar o semipurificada.

Aunque se prefiere la determinación de una razón entre PCA3/segundo marcador específico de la próstata, basada en la detección del ARNm, la presente invención no está limitada por ello. Por ejemplo, una razón entre el ARNm de PCA3/proteína o polipéptido del segundo marcador específico de la próstata, se puede emplear muy bien de acuerdo con la presente invención. El tipo de entidad molecular (p. ej., ARNm o polipéptido) que se detecta con precisión se puede adaptar de este modo para adecuar las necesidades particulares mientras que el nivel de la macromolécula que se detecta se correlacione con la actividad transcripcional del gen a partir del cual se ha obtenido.

También se describe un kit tratánóstico, de diagnóstico y de pronóstico del cáncer de próstata para detectar la presencia y la cantidad de ácidos nucleicos de PCA3 y de PSA en una muestra. Tal kit comprende generalmente un primer medio de recipiente que tiene dispensado en el mismo al menos un sonda de oligonucleótido y/o un cebador que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 y/o de PSA (p. ej., ARN de PCA3, ARN de PSA) y un segundo medio de recipiente que contiene al menos otro cebador oligonucleotídico y/o sonda que se hibrida con las secuencias específicas de PCA3 o de PSA mencionadas anteriormente. Se describe que un tercer medio de recipiente contiene sondas que se hibridan específicamente con los productos de la amplificación de PCA3 y de PSA. Se describe que el kit incluye adicionalmente otros recipientes que comprenden componentes adicionales, tales como un oligonucleótido o un cebador adicional, y/o uno o varios de los siguientes: tampones, reactantes que se van a utilizar en el ensayo (p. ej., reactantes de lavado, polimerasas, testigos internos (IC) o similares) y reactantes capaces de detectar la presencia de sonda(s)/cebador(es) de ácido nucleico unidos. Por supuesto, son posibles numerosas realizaciones de los kits que se describen. Por ejemplo, los diferentes medios de recipiente se pueden dividir en reactantes para amplificación y reactivos para detección. También se describe que primer medio de recipiente contiene los reactantes para amplificación o para hibridación específicos para los ácidos nucleicos deseados de la presente invención (p. ej., PCA3, PSA y/o ácidos nucleicos de testigos internos) y el segundo medio de recipiente contiene los reactivos para detección. Alternativamente, los reactivos para detección y los reactantes para amplificación pueden estar contenidos en el mismo medio de recipiente. Por supuesto, la separación o la reunión de los reactantes en el mismo o en diferentes medios de recipiente es dictada por los tipos de métodos de extracción, de amplificación o de hibridación, y los métodos de detección utilizados, así como otros parámetros que incluyen la estabilidad, la necesidad de conservación, etc. Además, los kits pueden incluir adicionalmente instrucciones para la puesta en práctica de los métodos de diagnóstico, tratánóstico, y/o pronóstico de la presente invención. Tales instrucciones pueden referirse a detalles referentes al protocolo experimental, así como a los valores umbrales para la razón entre PCA3/segundo marcador específico de la próstata que se pueden utilizar.

En un aspecto relacionado, se describen sondas y cebadores de ácidos nucleicos para la detección específica de la presencia de ARNm de PCA3 y del segundo marcador específico del cáncer de próstata (p. ej., PSA) en una muestra. También se describe una ordenación de ácidos nucleicos que se unen a uno o a varios ácidos nucleicos de PCA3/PSA

En una realización particular, la presente invención se refiere a los métodos y kits para pronosticar el cáncer de próstata en un paciente, basándose en una determinación de la razón PCA3/PSA a partir de sedimentos urinarios después de una DRE, en donde la razón actúa como un marcador para el tratánóstico y para el pronóstico, basándose en el aumento del porcentaje de células cancerosas en la orina después de la DRE.

En una realización particular de la presente invención, la detección de PCA3 se basa en usar el exón 1 de PCA3 como diana, mediante un cebador. En una realización tal particular, se emplean cebadores a cada lado del intrón 1 para amplificar una porción de las secuencias del exón 1 y del exón 2 de PCA3 (el intrón 1 es un intrón con aproximadamente 20 kb). Se pueden diseñar numerosos ejemplos de parejas de cebadores a partir de las secuencias de PCA3 de la presente invención y, por supuesto, no están limitadas al exón 1.

Así, la presente invención muestra por primera vez que la razón entre la expresión de PCA3 y de un segundo marcador específico del cáncer de próstata (p. ej., PSA) no sólo es útil para el diagnóstico, sino también para el pronóstico y el tratánóstico. Por supuesto, la razón del pronóstico de la presente invención se puede emplear opcionalmente junto a otros marcadores del cáncer de próstata y de enfermedades neoplásicas, tales como el activador de plasminógeno urinario, el receptor del activador de plasminógeno urinario, el inhibidor 1 del plasminógeno, p53, E-caderina, PSM, VEGF, etc.

Además, según los conocimientos de los inventores, antes de la presente invención no había informes que describieran que, en los líquidos glandulares (por ejemplo, mama o próstata), el número de células cancerosas en la evaginación se correlacionaba con la capacidad invasiva del cáncer. Además, no había una técnica anterior que mostrara o sugiriera que la razón entre el ARNm de PCA3 y un segundo ARNm específico de la próstata (p. ej., PSA) aumentara con el volumen del tumor y la agresividad del cáncer y, por tanto, que tal razón se pudiera utilizar como un marcador para el tratánóstico, el pronóstico o para la estadificación. Se afirma en esta memoria que antes de la presente invención no se podía predecir si las células cancerosas agresivas iban a migrar al torrente sanguíneo o a la orina. El valor para el tratánóstico y para el pronóstico de la razón de la presente invención se basa en demostrar un número de fenómenos que no se habían mostrado previamente: (1) las células del cáncer de próstata agresivas son más invasivas; (2) las células más invasivas también son más capaces de invadir los acinos prostáticos; (3) de este forma se incrementará la fracción de células cancerosas en el sedimento urinario; (4) de modo que aumentará la razón entre los ARNm de PCA3/segundo marcador (p. ej., PSA); (5) el volumen del tumor también está correlacionado con la razón entre los ARNm de PCA3/segundo marcador; y (6) el aumento ligero de PCA3 con el grado y la disminución ligera del ARNm de PSA puede potenciar este efecto.

Así, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, una vez que se determina la razón entre PCA3/segundo marcador (p. ej., PSA) es posible: (1) determinar la presencia, la ausencia o la predisposición a desarrollar cáncer de próstata; (2) si se detecta cáncer de próstata, determinar el estadio, el volumen del tumor, el grado del tumor y la agresividad del cáncer; (3) pronosticar las consecuencias de la enfermedad (pronóstico); y (4) identificar la terapia más apropiada para el paciente.

Además, una ventaja particular de la presente invención es el uso de una razón de la presente invención como herramienta para el tratánóstico, el diagnóstico y el pronóstico. Aunque el valor particular de la razón PCA3/segundo marcador (p. ej., PSA) varía dependiendo del segundo marcador utilizado (para un estadio/grado/volumen tumoral dado) es probable variar sólo levemente con el tipo de método de amplificación/detección (una vez que se eligen las parejas concretas de PCA3/segundo marcador). Así, mientras que los métodos utilizados para determinar el nivel de PCA3 y el segundo marcador son comparables en términos de sensibilidad y especificidad, el valor de la razón para una muestra dada debe ser más o menos el mismo (es decir, considerado estadísticamente similar debido a la variación en el método elegido). Por lo tanto, una vez que se elijen las parejas de marcadores, se pueden utilizar diversos métodos de detección de forma intercambiable, con tal que los métodos tengan una especificidad y sensibilidad similares.

A menos que se definan de otra manera, los términos y la nomenclatura científicos y tecnológicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el conocido habitualmente por una persona experta en la técnica a la que se refiere esta invención. Las definiciones comúnmente entendidas de los términos de biología molecular se pueden encontrar, por ejemplo, en el Diccionario de Microbiología y Biología Molecular, 2ª ed. (Singleton y col., 1994, John Wiley & Sons, Nueva York, NY) o el Diccionario Harper Collins de Biología (Hale y Marham, 1991, Harper Perennial, Nueva York, NY), Rieger y col., Glosario de genética: Clásica y molecular, 5ª edición, Springer-Verlag, Nueva York, 1991; Alberts y col., Biología molecular de la célula, 4ª edición, Garland science, Nueva York, 2002; y Lewin, Genes VII, Oxford University Press, Nueva York, 2000. Generalmente, los procedimientos de los métodos de biología molecular y similares son métodos comunes empleados en la técnica. Tales técnicas convencionales se pueden encontrar en manuales de referencia, tales como por ejemplo Sambrook y col., (2000, Molecular Cloning – A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratories); y Ausubel y col., (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

Otros objetos y ventajas de la presente invención se aclaran en la descripción siguiente.

#### Definiciones

En la presente descripción, se emplea extensivamente una variedad de términos. Para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, incluyendo el alcance que se va a dar a tales términos, se proporcionan las siguientes definiciones.

Las secuencias de nucleótidos se presentan en esta memoria con una cadena sencilla, en la dirección a 5' a 3', de izquierda a derecha, usando los símbolos de nucleótidos de una letra, tal y como se emplean generalmente en la técnica y de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza conjuntamente con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar “uno” pero también es compatible con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más que uno”.

A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o el método que se va a emplear para determinar el valor. De forma rutinaria, una desviación del 10% al 15%, preferentemente del 10%, está dentro del alcance del término “aproximadamente”.

El término molécula o secuencia de “ARN” o “ADN” (así como a veces el término “oligonucleótido”) se refiere a una molécula que comprende generalmente los desoxirribonucleótidos adenina (A), guanina (G), timina (T) y/o citosina (C). En el “ARN”, la T está sustituida por uracilo (U).

La presente descripción se refiere a una variedad de términos rutinarios de la tecnología recombinante del ADN (rADN). Sin embargo, se proporcionan definiciones de ejemplos seleccionados de tales términos del rADN para mayor claridad y coherencia.

Tal y como se emplea en esta memoria, “molécula de ácido nucleico” o “polinucleótidos” se refiere a un polímero de nucleótidos. Ejemplos no limitativos de los mismos incluyen el ADN (p. ej., ADN genómico, ADNc), moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y quimeras de los mismos. La molécula de ácido nucleico se puede obtener por técnicas de clonación o sintetizada. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario (cadena codificante o cadena no codificante [antisentido]). El ácido ribonucleico (ARN) y el ácido desoxirribonucleico (ADN) convencionales están incluidos en la expresión “ácido nucleico” y los polinucleótidos como análogos de los mismos. Una cadena principal de ácido nucleico puede comprender una variedad de enlaces conocidos en la técnica, que incluyen uno o varios enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces péptido-ácido nucleico (denominados “ácidos peptidonucleicos” (PNA); Hydig-Hielsen y col., documento de publicación internacional PCT número 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, p. ej., sustituciones 2'-metoxi (que contienen un resto 2'-O-metilribofuranosilo; véase el documento PCT número WO 98/02582) y/o sustituciones 2'-haluro. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos conocidos de las mismas (p. ej., inosina u otros; véase “The Biochemistry of the Nucleic Acids” 5-36, Adams y col., compiladores, 11ª ed., 1992), o derivados conocidos de las bases púricas o pirimidínicas (véase, Cook, documento de publicación

internacional PCT, número WO 93/13121) o residuos “abásicos” en los cuales la cadena principal no incluye bases nitrogenadas en uno o más residuos (Arnold y col., documento de patente de EE.UU., número 5.585.481). Un ácido nucleico puede comprender solamente azúcares, bases y enlaces convencionales, tal y como se encuentra en el ARN y el ADN, o puede incluir tanto componentes convencionales como sustituciones (p. ej., bases convencionales unidas a través de una cadena principal metoxi, o un ácido nucleico que incluye bases convencionales y uno o más análogos de las bases).

Molécula de ácido nucleico aislada. Una “molécula de ácido nucleico aislada”, tal y como se entiende generalmente y se emplea en esta memoria, se refiere a un polímero de nucleótidos, e incluye, pero no debe limitarse a los mismos, ADN y ARN. La molécula de ácido nucleico “aislada” se purifica de su estado natural *in vivo*, obtenida por clonación o sintetizada químicamente.

La terminología “ácido nucleico de PCA3” y “ácido nucleico de PSA” o “polinucleótidos de PCA3” y “polinucleótidos de PSA”, se refiere a una secuencia de ácido nucleico de PCA3 o de PSA nativa. En una realización, el ácido nucleico de PCA3 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID n.ºs 1 y 2. En una realización relacionada, el ácido nucleico de PSA tiene la secuencia descrita en la SEQ ID n.º 38. En otra realización, el ácido nucleico de PSA codifica una proteína de PSA. En una realización particular, la secuencia de ácido nucleico de PCA3 que contiene el ORF previsto codifica un polipéptido de PCA3. En otra realización, los ácidos nucleicos de PCA3 y de PSA son secuencias de ácido nucleico no codificante. En aún otra realización, las secuencias de PCA3 y de PSA, que son reconocidas como dianas por las secuencias de PCA3 y de PSA incluidas en la presente invención, son secuencias naturales de PCA3 y de PSA encontradas en la muestra de una persona.

La terminología “pareja de amplificación” o “pareja de cebadores” se refiere en esta memoria a parejas de los oligonucleótidos (oligos) de la presente invención que se seleccionan para ser utilizados juntos en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada mediante alguno de los diferentes tipos de procesos de amplificación. Ejemplos no limitativos de una pareja de cebadores para amplificar PSA son SEQ ID n.ºs 36 y 37.

“Amplificación” se refiere a cualquier procedimiento *in vitro* conocido para obtener copias múltiples (“amplicones”) de una secuencia de ácido nucleico deseada o de su complemento o de fragmentos de la misma. La amplificación *in vitro* se refiere a la producción de un ácido nucleico amplificado que puede contener algo menos que la secuencia completa de la región deseada o su complemento. Los métodos conocidos para la amplificación *in vitro* incluyen, p. ej., la amplificación mediada por transcripción, la amplificación mediada por replicasa, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por reacción en cadena de la ligasa (LCR) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA que incluye el método de amplificación por desplazamiento múltiple de cadena (MSDA)). La amplificación mediada por replicasa emplea moléculas de ARN autorreplicantes y una replicasa tal como la replicasa de Q $\beta$  (p. ej., Kramer y col., documento de patente de EE.UU., número 4.786.600). La amplificación por PCR es bien conocida y emplea una polimerasa de ADN, cebadores y ciclación térmica para sintetizar muchas copias de las dos cadenas complementarias de ADN o de ADNc (p. ej., Mullis y col., documentos de patentes de EE.UU. n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159). La amplificación por LCR emplea al menos cuatro oligonucleótidos separados para amplificar una diana y su cadena complementaria, con numerosos ciclos de hibridación, de ligación y de desnaturalización (p. ej., el documento de publicación de la solicitud de patente europea número 0 320 308). La SDA es un método en el cual un cebador contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que permite que la endonucleasa haga una mella en una hebra de un dúplex de ADN hemimodificado que incluye la secuencia deseada, seguido por la amplificación en una serie de etapas de extensión del cebador y desplazamiento de la hebra (p. ej., Walker y col., documento de patente de EE.UU. número 5.422.252). Otros dos métodos de amplificación conocidos por desplazamiento de la hebra no requieren hacer una mella con la endonucleasa (Dattagupta y col., documento de patente de EE.UU. n.º 6.087.133 y el documento de patente de EE.UU. n.º 6.124.120 (MSDA)). Los expertos en la técnica han de saber que las secuencias de cebador oligonucleotídico de la presente invención se pueden emplear fácilmente en cualquier método de amplificación *in vitro* que se base en la extensión del cebador con una polimerasa (véase 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, tercera edición, CSH Laboratories). Según lo conocido en general en la técnica, los oligos se diseñan para unirse a una secuencia complementaria en determinadas condiciones.

Electroforesis en gel de agarosa. La técnica de uso más extendido (aunque no la única) para fraccionar ADN bicatenario es la electroforesis en gel de agarosa. El principio de este método es que las moléculas de ADN migran por el gel como si fuera un tamiz que retarda el movimiento de las moléculas más grandes en mayor grado y el movimiento de las moléculas más pequeñas en menor grado. Obsérvese que cuanto más pequeño sea el fragmento de ADN, mayor será la movilidad electroforética en el gel de agarosa.

Los fragmentos de ADN fraccionados por la electroforesis en gel de agarosa se pueden visualizar directamente por un procedimiento de tinción, si el número de fragmentos incluidos en el patrón es pequeño. Para visualizar un pequeño subconjunto de estos fragmentos, se puede aplicar una metodología denominada procedimiento de hibridación (p. ej., hibridación de tipo Southern).

“Hibridación de ácidos nucleicos” se refiere en general a la hibridación de dos moléculas de ácido nucleico

monocatenarias que tienen secuencias de bases complementarias, que en las condiciones apropiadas formarán una estructura bicatenaria favorecida termodinámicamente. Ejemplos de las condiciones de hibridación se pueden encontrar en los dos manuales de laboratorio mencionados anteriormente (Sambrook y col., 2000, véase más arriba, y Ausubel y col., 1994, véase más arriba, o además en Higgins y Hames (compiladores) "Nucleic acid hybridization, a practical approach" IRL Press Oxford, Washington DC, (1985)) y se conocen generalmente en la técnica. En el caso de una hibridación a un filtro de nitrocelulosa (u otro soporte distinto del nilón), como por ejemplo en el bien conocido procedimiento de transferencia de tipo Southern, se puede incubar un filtro de nitrocelulosa durante una noche a una temperatura representativa de la condición rigurosa deseada (60 - 65°C para muy rigurosa, 50-60°C para una condición rigurosa moderada y 40-45°C para condiciones poco rigurosas), con una sonda marcada en una solución muy salina (6 x SSC o 5 x SSPE), 5 x Denhardt, 0,5% de SDS, y 100 µg/ml de ADN de arrastre desnaturalizado (p. ej., ADN de esperma de salmón). La sonda que no se une específicamente se puede separar a continuación por lavado mediante varios lavados en 0,2 x SSC/0,1% de SDS a una temperatura que se selecciona en función de la condición rigurosa deseada: temperatura ambiente (poco rigurosa), 42°C (moderadamente rigurosa) o 65°C (muy rigurosa). La concentración de sal y de SDS de las soluciones de lavado también se pueden ajustar para acomodar a la condición rigurosa deseada. La temperatura seleccionada y la concentración salina se basan en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido de ADN. Por supuesto, los híbridos de ARN-ADN también se pueden formar y detectar. En tales casos, las condiciones de hibridación y lavado se pueden adaptar según los métodos bien conocidos por una persona con conocimientos en la técnica. Preferiblemente se emplean condiciones rigurosas (Sambrook y col., 2000, véase más arriba). Otros protocolos o kits de hibridación, disponibles en el comercio (p. ej., ExpressHyb<sup>®</sup> de BD Biosciencias Clontech) que usan diferentes soluciones de reasociación y de lavado también se pueden utilizar, ya que son bien conocidos en la técnica. Tal y como se conoce bien, la longitud de la sonda y la composición del ácido nucleico que se va a determinar constituyen otros parámetros de las condiciones de hibridación. Obsérvese que variaciones en las condiciones anteriores se pueden conseguir a través de la inclusión y/o sustitución de reactantes bloqueantes alternativos, utilizados para suprimir el ruido de fondo en experimentos de hibridación. Los reactantes bloqueantes típicos incluyen el reactante de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN desnaturalizado de esperma de salmón y formulaciones registradas disponibles en el mercado. La inclusión de reactantes bloqueantes específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente debido a problemas de compatibilidad. La hibridación de moléculas de ácido nucleico también comprende fragmentos de las moléculas descritas anteriormente. Además, las moléculas de ácido nucleico que se hibridan con cualquier molécula de ácido nucleico mencionada anteriormente también incluyen fragmentos complementarios, derivados y variantes alélicas de estas moléculas. Además, un complejo de hibridación se refiere a un complejo entre dos secuencias de ácido nucleico en virtud de la formación de puentes de hidrógeno entre las bases complementarias G y C y entre las bases complementarias A y T; estos puentes de hidrógeno pueden estar adicionalmente estabilizados por interacciones de apilamiento de bases. Las dos secuencias complementarias de ácido nucleico se unen en una configuración antiparalela. Se puede formar en solución un complejo de hibridación (p. ej., análisis de C<sub>0</sub>t o de R<sub>0</sub>t) o entre una secuencia de ácido nucleico presente en la solución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido (p. ej., membranas, filtros, chips, pasadores o portaobjetos de vidrio a los cuales se han fijado, p. ej., células).

Los términos complementario o complementariedad se refieren a la unión natural de polinucleótidos, en condiciones salinas y de temperatura permisivas, mediante apareamiento de las bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas monocatenarias puede ser "parcial", en la cual solamente se unen algunos de los ácidos nucleicos, o puede ser completa, cuando existe una complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la resistencia de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, que dependen de la unión entre las hebras de ácido nucleico.

El término "se hibrida" tal y como se utiliza de acuerdo con la presente invención, puede referirse a hibridaciones en condiciones rigurosas o no rigurosas, tal y como se ha descrito en esta memoria anteriormente. La determinación de las condiciones está dentro de los conocimientos del especialista en la técnica y se pueden determinar según los protocolos descritos en la técnica. La expresión "secuencias que se hibridan" se refiere preferiblemente a secuencias que muestran una identidad de secuencia de por lo menos el 40%, preferiblemente por lo menos el 50%, más preferiblemente por lo menos el 60%, incluso más preferiblemente por lo menos el 70%, particularmente preferida por lo menos el 80%, más particularmente preferida, por lo menos el 90%, incluso más particularmente preferida, por lo menos el 95% y lo más preferible una identidad de por lo menos el 97%. Por otra parte, la expresión "secuencias que se hibridan" se refiere preferiblemente a secuencias que codifican una proteína PSA que tiene una identidad de la secuencia de por lo menos el 40%, preferiblemente por lo menos el 50%, más preferiblemente por lo menos el 60%, incluso más preferiblemente por lo menos el 70%, particularmente preferida al menos el 80%, más particularmente preferida, por lo menos el 90%, incluso más particularmente preferida, por lo menos el 95% y lo más preferido una identidad de por lo menos identidad el 97% con una secuencia de aminoácidos de una proteína PSA.

De acuerdo con la presente invención, el término "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (p. ej., identidad del 60% o del 65%, preferiblemente, identidad del 70-95%, más preferiblemente identidad de al

menos 95%), cuando se comparan y se alinean con una correspondencia máxima, con una ventana de comparación, o con una región designada tal y como se mide con un algoritmo para la comparación de secuencias, que es conocido en la técnica, o mediante el alineamiento manual y la inspección visual. Las secuencias que tienen, por ejemplo, 60% a 95% o más de identidad de la secuencia, se consideraron que son sustancialmente idénticas.

5 Tal definición también se aplica al complemento de una secuencia del ensayo. Preferentemente, la identidad descrita existe sobre una región que tiene por lo menos aproximadamente de 15 a 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, más preferiblemente, sobre una región que tiene aproximadamente de 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica saben cómo determinar el porcentaje de identidad entre/a lo largo de secuencias mediante, por ejemplo, algoritmos tales como los que se basan en el programa de ordenador

10 CLUSTALW (Thompson, Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTDB (Brutlag, App. Biosci. 6 (1990), 237-245), según se conoce en la técnica. Aunque el algoritmo de FASTDB no considera típicamente en su cálculo las deleciones o las adiciones internas discordantes en las secuencias, es decir, los huecos, esto se puede corregir manualmente para evitar una sobrestimación de los % de identidad. CLUSTALW, sin embargo, tiene en cuenta los huecos de la secuencia en sus cálculos de la identidad. También están disponibles para los especialistas en esta

15 técnica los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402). El programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico emplea por defecto una longitud de palabra (W) de 11, un valor esperado (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP emplea por defecto una longitud de palabra (W) de 3, y un valor esperado (E) de 10. La matriz de puntuaciones BLOSUM62 (Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, (1989), 10915) emplea alineamientos (B) de 50, valor

20 esperado (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas hebras. Por otra parte, la presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico cuya secuencia está degenerada en comparación con la secuencia de una molécula que se hibrida, descrita anteriormente. Cuando se utiliza de acuerdo con la presente invención, la expresión "estar degenerado como resultado del código genético" significa que debido a la redundancia del código genético, diferentes secuencias de nucleótidos codifican el mismo aminoácido. La presente invención también se

25 refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una o varias mutaciones o deleciones, y a moléculas de ácido nucleico que se hibridan con una de las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria, que muestran una(s) mutación(iones) o una(s) deleción(iones).

Una "sonda" significa incluir un oligómero de ácido nucleico que se hibrida específicamente con una secuencia diana, en un ácido nucleico o su complemento, en condiciones que favorecen la hibridación, de tal modo que

30 permiten la detección de la secuencia diana o de su ácido nucleico amplificado. La detección puede ser directa (es decir, el resultado de una sonda que se hibrida directamente con la diana o con la secuencia amplificada) o indirecta (es decir, el resultado de una sonda que se hibrida con una estructura molecular intermedia que enlaza la sonda con la diana o la secuencia amplificada). Una "diana" de una sonda se refiere en general a una secuencia dentro de una secuencia de ácidos nucleicos amplificada (es decir, un subconjunto de la secuencia amplificada) que se hibrida

35 específicamente con al menos a una porción de la secuencia de la sonda mediante puentes de hidrógeno convencionales o "apareamiento de las bases." Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten una hibridación estable de una secuencia de la sonda con una secuencia diana, incluso si las dos secuencias no son totalmente complementarias. Una sonda puede estar marcada o sin marcar. Una sonda se puede producir mediante clonación molecular de una secuencia de ADN específica o también se puede sintetizar.

40 Numerosos cebadores y sondas que se pueden diseñar y utilizar en el contexto de la presente invención pueden ser determinados fácilmente por una persona experta en la técnica a la que pertenece la presente invención. Ejemplos no limitativos de cebadores y de sondas se muestran en las Tablas 2-4. Una persona experta en la técnica puede diseñar muchas sondas y cebadores diferentes, basándose en las enseñanzas de esta memoria y en el conocimiento general común.

45 "Suficientemente complementaria" significa una secuencia contigua de bases de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con otra secuencia mediante puentes de hidrógeno entre una serie de bases complementarias. Las secuencias de bases complementarias pueden ser complementarias en cada posición en la secuencia mediante el apareamiento de bases convencional (p. ej., emparejamiento de G:C, A:T o A:U) o pueden contener uno o varios residuos (que incluyen residuos abásicos) que no son complementarios mediante el emparejamiento de bases

50 convencional, pero que permiten que la secuencia completa se hibride específicamente con otra secuencia de bases en condiciones de hibridación apropiadas. Las bases contiguas de un oligómero son complementarias preferiblemente al menos aproximadamente en el 80% (81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%), preferiblemente al menos aproximadamente en el 90% con la secuencia con la que el oligómero se hibrida específicamente el oligómero. Las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidas por los

55 expertos en la técnica, se pueden predecir fácilmente basándose en la composición y las condiciones de la secuencia, o se pueden determinar empíricamente usando un ensayo de rutina (véase Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", segunda edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY, 1989) en las secciones 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 y 11.47-11.57, particularmente en las secciones 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 y 11.55-11.57).

60 Las secuencias de ácido nucleico pueden ser detectadas por hibridación con una secuencia complementaria (p. ej., sondas de oligonucleótidos) (véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 5.503.980 (Cantor), 5.202.231 (Drmanac y col.), 5.149.625 (Church y col.), 5.112.736 (Caldwell y col.), 5.068.176 (Vijg y col.), y 5.002.867 (Macevicz)). Los métodos para detectar la hibridación pueden hacer uso de una micromatriz de sondas (p. ej., en un

chip de ADN) para proporcionar la información de la secuencia sobre el ácido nucleico de la diana que se hibrida selectivamente con una secuencia de la sonda exactamente complementaria, en un conjunto de cuatro secuencias relacionadas de la sonda que difieren en un nucleótido (véanse los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.837.832 y 5.861.242 (Chee y col.)).

5 Una etapa de la detección puede emplear una variedad de métodos conocidos para detectar la presencia de ácido nucleico, mediante la hibridación con una sonda de oligonucleótido. Un ejemplo específico de una etapa de detección emplea un método de detección homogéneo, tal como se ha descrito con detalle previamente en Arnold y col., *Clinical Chemistry* 35:1588-1594 (1989), y los documentos de patente de EE.UU. nº 5.658.737 (Nelson y col.), 5.118.801 y 5.312.728 (Lizardi y col.).

10 Los tipos de métodos de detección en los cuales se pueden utilizar sondas, incluyen las transferencias de tipo Southern (detección del ADN), las transferencias puntiformes o las transferencias por ranuras (ADN, ARN), y las transferencias de tipo Northern (detección del ARN). Las proteínas marcadas también se podrían utilizar para detectar una secuencia de ácido nucleico concreta a la cual se une (p. ej., detección de proteínas mediante tecnología de tipo Western: Guichet y col., 1997, *Nature* 385(6616): 548-552; y Schwartz y col., 2001, *EMBO* 20(3):510-519). Otros métodos de detección incluyen kits que contienen reactantes de la presente invención sobre un dispositivo de varilla y similares. Por supuesto, puede ser preferible el uso de un método de detección que sea susceptible de automatización. Un ejemplo no limitativo de eso incluye un chip u otro soporte que comprende una o varias (p. ej., una micromatriz) de diferentes sondas.

20 Un "marcador" se refiere a un resto molecular o a un 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 (p. ej., una secuencia amplificada). La marcación directa puede tener lugar a través de enlaces o interacciones que enlazan el marcador con el ácido nucleico (p. ej., enlaces covalentes o interacciones no covalentes), mientras que la marcación indirecta puede tener lugar mediante un "enlazador" o un resto que actúe como puente, tal como un(os) oligonucleótido(s) adicional(es), que se marca de forma directa o indirecta. Los restos que tienden un puente pueden amplificar una señal detectable. Los marcadores pueden incluir cualquier resto detectable (p. ej., un radionucleido, un ligando tal como biotina o avidina, una enzima o un sustrato enzimático, un grupo reactivo, un cromóforo tal como un colorante o una partícula con color, un compuesto luminiscente que incluye un compuesto bioluminiscente, fosforescente o quimioluminiscente, y un compuesto fluorescente). Preferiblemente, el marcador sobre una sonda marcada es detectable en un sistema de ensayo homogéneo, es decir, en una mezcla, el marcador unido muestra un cambio detectable comparado con un marcador no unido.

25 Se conocen otros métodos para marcar ácidos nucleicos mediante los cuales un marcador se fija a una cadena de ácido nucleico cuando es fragmentada, lo que es útil para marcar ácidos nucleicos que se van a detectar por hibridación con una micromatriz de sondas de ADN inmovilizadas (p. ej., véase el documento de patente PCT nº PCT/IB99/02073).

35 Un "marcador detectable homogéneo" se refiere a un marcador cuya presencia se puede detectar de forma homogénea, basándose en si la sonda marcada se hibrida con una secuencia diana. Un marcador homogéneo y detectable se puede detectar sin eliminar físicamente las formas hibridadas de las no hibridadas de la sonda marcada. Los marcadores detectables homogéneos y los métodos para detectarlos han sido descritos detalladamente en otro lugar (p. ej., véanse los documentos de patentes de EE.UU. nº 5.283.174, 5.656.207 y 40 5.658.737).

Tal y como se emplea en esta memoria, "oligonucleótidos" u "oligos" definen una molécula que tiene dos o más nucleótidos (ribo- o desoxirribonucleótidos). El tamaño del oligo se establecerá por la situación particular y, en última instancia, por el uso particular del mismo, y será adaptado por consiguiente por la persona con conocimientos en la técnica. Un oligonucleótido se puede sintetizar químicamente o se puede obtener por clonación según métodos bien conocidos. Aunque están generalmente en forma monocatenaria, pueden estar en forma bicatenaria o incluso contener una "región reguladora". Pueden contener nucleótidos raros naturales o sintéticos. Se pueden diseñar para mejorar un criterio dado, como por ejemplo, la estabilidad. Las quimeras de desoxirribonucleótidos y de ribonucleótidos también pueden estar dentro del alcance de la presente invención.

50 Amplificación de la secuencia. Un método para generar grandes cantidades de una secuencia diana. Generalmente, uno o varios cebadores de la amplificación están reasociados con una secuencia de ácido nucleico. Con las enzimas apropiadas, se amplifican las secuencias que se encuentran adyacentes a los cebadores, o entre los mismos.

Tal y como se emplea en esta memoria, un "cebador" define un oligonucleótido que es capaz de reasociarse con una secuencia diana, creando de este modo una región bicatenaria que puede servir como punto de iniciación para la síntesis de ácidos nucleicos en las condiciones adecuadas. Los cebadores se pueden diseñar, por ejemplo, para ser específicos de determinados alelos, de modo que se utilicen en un sistema de amplificación específico del alelo. Por ejemplo, se puede diseñar un cebador para que sea complementario a un ARN corto de PCA3 que está asociado con un estado canceroso de la próstata, mientras que un ARN largo de PCA3 está asociado con un estado no canceroso (benigno) de la misma (documento PCT/CA00/01154 publicado con el número WO 01/23550). La región 5' del cebador puede ser no complementaria a la secuencia del ácido nucleico diana e incluir bases

- adicionales, tales como una secuencia de promotor (que se denomina un “cebador del promotor”). Los expertos en la materia apreciarán que cualquier oligómero que puede actuar como cebador se puede modificar para incluir la secuencia 5' del promotor, y de este modo actuar como un cebador del promotor. De forma semejante, cualquier cebador del promotor puede servir como cebador, independientemente de su secuencia promotora funcional. Por supuesto, se conoce en la técnica el diseño de un cebador a partir de una secuencia de ácido nucleico conocida. En cuanto a los oligos, pueden comprender una variedad de tipos de diferentes nucleótidos. Los técnicos expertos pueden determinar fácilmente la especificidad de los cebadores seleccionados y de las sondas (p. ej., PSA, PCA3, secuencias testigos, etc....) realizando alineaciones/búsquedas por ordenador, usando bases de datos bien conocidas (p. ej., GenBank®).
- 5
- 10 Cebador de la amplificación. Un oligonucleótido que es capaz de reasociarse adyacente a una secuencia diana y servir como punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se pone en condiciones en las cuales se inicia la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico.
- NASBA. Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA, del inglés “Nucleic Acid Sequence Based Amplification”) se puede realizar de acuerdo con técnicas conocidas (Malek y col., *Methods Mol. Biol.*, 28:253-260, documentos de patente de EE.UU. nº 5.399.491 y 5.554.516). En una realización, la amplificación NASBA se inicia con la reasociación de un cebador P1 complementario (que contiene el promotor de la polimerasa de ARN de T7) con la diana de ARNm. La transcriptasa inversa (RTasa) sintetiza entonces una hebra de ADN complementaria. El híbrido de ADN/ARN bicatenario es reconocido por la ARNasa H que digiere la hebra de ARN, dejando una molécula de ADN monocatenaria, a la cual se puede unir el cebador P2 sentido. P2 sirve de anclaje para la RTasa que sintetiza una segunda hebra de ADN. El ADN bicatenario resultante tiene un promotor funcional de la polimerasa de ARN de T7, reconocido por la enzima respectiva. La reacción NASBA puede entrar entonces en la fase de *amplificación cíclica* que comprende seis etapas: (1) síntesis de moléculas cortas de ARN monocatenario complementario ( $10^1$  a  $10^3$  copias por molde de ADN) a través de la polimerasa de ARN de T7; (2) reasociación del cebador P2 con estas moléculas de ARN; (3) síntesis de una hebra de ADN complementaria mediante RTasa; (4) digestión de la hebra de ARN del híbrido ADN/ARN; (5) reasociación del cebador P1 con el ADN monocatenario; y (5) generación de moléculas de ADN bicatenarias mediante RTasa. Debido a que la reacción de NASBA es isotérmica (41°C), la amplificación específica del ssARN es posible si se evita la desnaturalización del dsADN en el procedimiento de preparación de la muestra. De este modo, es posible recoger el ARN en un fondo de dsADN sin obtener resultados falsos positivos debido al dsADN genómico.
- 15
- 20
- 25
- 30 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa se puede realizar de acuerdo con técnicas bien conocidas. Véanse, p. ej., los documentos de patentes de EE.UU. nº 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; y 4.965.188 (las descripciones de las tres patentes de los EE. UU. se incorporan en la presente memoria por referencia). En general, la PCR implica un tratamiento de una muestra de ácido nucleico (p. ej., en presencia de una polimerasa de ADN termoestable) en condiciones de hibridación, con un cebador oligonucleotídico para cada hebra de la secuencia específica que se va a detectar. Un producto de la extensión de cada cebador que se sintetiza es complementario a cada una de las dos cadenas de ácido nucleico, con los cebadores suficientemente complementarios a cada hebra de la secuencia específica, para hibridarse con ella. El producto de la extensión sintetizado a partir de cada cebador también puede servir como molde para una síntesis adicional de los productos de la extensión con los mismos cebadores. Después de un número suficiente de tandas de síntesis de los productos de la extensión, la muestra se analiza para determinar si está presente la secuencia o las secuencias que se van a detectar. La detección de la secuencia amplificada se puede realizar mediante visualización después de la tinción con bromuro de etidio (EtBr) del ADN, después de la electroforesis en gel, o con un marcador detectable de acuerdo con técnicas conocidas, y similares. Para una revisión de las técnicas de PCR, véase “PCR Protocols, A Guide to Methods and Amplifications”, Michael y col., compiladores, Acad. Press, 1990.
- 35
- 40
- 45 La reacción en cadena de la ligasa (LCR) se puede realizar de acuerdo con técnicas bien conocidas (Weiss, 1991, *Science* 254:1292). La adaptación del protocolo para cumplir con las necesidades deseadas la puede realizar una persona experta en la técnica. La amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) también se realiza de acuerdo con técnicas conocidas o adaptaciones de las mismas, para cumplir con las necesidades particulares (Walker y col. (1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:392-396; e *ibid*, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:1691-1696).
- 50
- 55 Captura de la diana. En una realización, se incluye la captura de la diana en el método para aumentar la concentración o la pureza del ácido nucleico de la diana antes de la amplificación *in vitro*. Preferiblemente, la captura de la diana implica un método relativamente sencillo para hibridar y aislar el ácido nucleico diana, tal y como se ha descrito detalladamente en otro lugar (p. ej., véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 6.110.678, 6.280.952, y 6.534.273). Hablando en general, la captura de la diana se puede dividir en dos familias, específica de la secuencia e inespecífica de la secuencia. En el método inespecífico, un reactante (p. ej., perlas de sílice) se utiliza para capturar inespecíficamente los ácidos nucleicos. En el método específico de la secuencia, un oligonucleótido fijado a un soporte sólido se pone en contacto con una mezcla que contiene el ácido nucleico diana en las condiciones de hibridación apropiadas para permitir que el ácido nucleico de la diana se fije al soporte sólido para permitir la purificación de la diana a partir de otros componentes de la muestra. La captura de la diana puede ser el resultado de una hibridación directa entre el ácido nucleico diana y un oligonucleótido fijado al soporte sólido, pero preferiblemente es el resultado de la hibridación indirecta con un oligonucleótido que forma un complejo de
- 60

hibridación que enlaza el ácido nucleico diana con el oligonucleótido sobre el soporte sólido. El soporte sólido es preferiblemente una partícula que se puede separar de la solución, más preferiblemente una partícula paramagnética que se puede recuperar aplicando un campo magnético sobre el recipiente. Después de la separación, el ácido nucleico diana enlazado con el soporte sólido se lava y se amplifica cuando la secuencia diana se pone en contacto con los cebadores, los sustratos y las enzimas apropiados en una reacción de amplificación *in vitro*.

Generalmente, las secuencias de oligómero de captura incluyen una secuencia que se une específicamente con la secuencia diana, cuando el método de captura es de hecho específico, y una secuencia de la "cola" que enlaza el complejo con una secuencia inmovilizada a través de hibridación. Es decir, el oligómero de captura incluye una secuencia que se une específicamente a su PCA3, PSA o a otra secuencia diana marcadora específicas de la próstata (p. ej., hK2/CLK2, PMSA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, PCGEM1) y a una secuencia de cola fijada covalentemente en 3' (p. ej., un homopolímero complementario a una secuencia homopolimérica inmovilizada). La secuencia de la cola que tiene, por ejemplo, de 5 a 50 nucleótidos de longitud, se hibrida con la secuencia inmovilizada para enlazar el complejo que contiene la diana con el soporte sólido y purificar de este modo el ácido nucleico diana hibridado de otros componentes de la muestra. Un oligómero de captura puede emplear cualquier enlace de la cadena principal, pero algunas realizaciones incluyen uno o varios enlaces 2'-metoxi. Por supuesto, otros métodos de captura son bien conocidos en la técnica. El método de captura sobre la estructura de casquete (Eder y col., 1988, gene 74(2):517-525, documento de patente de EE.UU. nº 5.219.989) y el método basado en sílice son dos ejemplos no limitativos de los métodos de captura.

Una "sonda inmovilizada" o un "ácido nucleico inmovilizado" se refieren a un ácido nucleico que se une, directa o indirectamente, con 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 diana unida, del material no unido en una muestra. Cualquier soporte sólido conocido puede ser utilizado, por ejemplo las matrices y las partículas libres en solución, fabricadas con cualquier material conocido (p. ej., nitrocelulosa, nilón, vidrio, poliacrilato, polímeros mezclados, poliestireno, polipropileno de silano y partículas metálicas, preferentemente partículas paramagnéticas). Los soportes preferidos son esferas paramagnéticas monodispersas (es decir, de tamaño uniforme  $\pm$  aproximadamente 5%), que proporcionan de este modo resultados consistentes, a los cuales se une directamente de forma estable una sonda inmovilizada, (p. ej., a través de un enlace covalente directo, una quelación o una interacción iónica), o indirectamente (p. ej., a través de uno o de varios enlazadores), permitiendo la hibridación con otro ácido nucleico en solución.

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

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "purificado" se refiere a una molécula (p. ej., ácido nucleico) que se ha separado de un componente de la composición en la cual estaba presente originalmente. Así, por ejemplo, un "ácido nucleico purificado" se ha purificado a un nivel no encontrado en la naturaleza. Una molécula "sustancialmente pura" es una molécula que carece de la mayoría de otros componentes (p. ej., 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100% exenta de contaminantes). Por el contrario, el término "bruto" significa moléculas que no se han separado de los componentes de la composición original en la cual estaban presentes. Brevemente, las unidades (p. ej., 66, 67,... 81, 82, 83, 84, 85,... 91, 92%....) no se enumeran específicamente, pero sin embargo se consideran dentro del alcance de la presente invención.

La terminología "pronóstico", "estadificación" y "determinación de la agresividad" se definen en esta memoria como la predicción del grado de gravedad del cáncer de próstata y de su evolución, así como la perspectiva de recuperación tal y como se anticipa a partir del curso usual de la enfermedad. Según la presente invención, una vez que se ha determinado la agresividad del cáncer de próstata, se pueden escoger los métodos apropiados determinados.

En esta memoria, la terminología "la puntuación de Gleason", que es bien conocida en la técnica, es el sistema de uso general más común para graduar/estadificar y pronosticar el adenocarcinoma. El sistema describe una escala de puntuación de 2 a 10, siendo 2 el estado menos agresivo y 10 el más agresivo. La puntuación es la suma de los dos patrones más comunes (grado 1-5) del crecimiento tumoral encontrado. Para hacer el recuento, un patrón (grado) tiene que ocupar más del 5% de la muestra de la biopsia. El sistema de puntuación requiere material de la biopsia (biopsia del núcleo o muestras quirúrgicas) para ser exacto; no se pueden utilizar preparaciones citológicas.

El "grado de Gleason" es el sistema más común empleado para graduar el cáncer de próstata. Implica asignar números al tejido canceroso de la próstata, que varían de 1 a 5, basándose en cómo las células cancerosas imitan la forma en que las células normales forman glándulas. Se asignan dos grados a los patrones más comunes de células que aparecen; estos dos grados (pueden ser iguales o diferentes) se suman a continuación para determinar la puntuación de Gleason (un número del 2 al 10).

El sistema de Gleason está basado exclusivamente en el patrón estructural de las glándulas del tumor de próstata. Este evalúa la eficacia de las células de cualquier cáncer particular para ser capaces de estructurarse ellas mismas en glándulas, que se asemejan a las de la próstata normal. La capacidad de un tumor de imitar la estructura de una

glándula normal se denomina su *diferenciación*, y la experiencia ha mostrado que un tumor cuya estructura es cercana a la normal (bien diferenciada) tendrá probablemente un *comportamiento biológico* relativamente cercano al normal, es decir, que no es un cáncer muy agresivo.

5 El principio es bastante simple, una graduación de Gleason en la que se gradúa desde muy bien diferenciado (grado 1) hasta muy poco diferenciado (grado 5), se realiza generalmente en gran parte por la observación de la imagen microscópica del cáncer con poco aumento. Existen detalles adicionales importantes que requieren un mayor aumento, y la capacidad para graduar con precisión cualquier tumor se consigue solamente con mucha práctica y experiencia en anatomopatología.

10 Los grados 1 y 2 de Gleason: estos dos grados se asemejan mucho a la próstata normal. Son los grados menos importantes porque aparecen raramente en la población general y porque confieren un pronóstico favorable que es únicamente ligeramente mejor que el grado 3. Ambos grados están compuestos por masa; en el grado 2 hay más agregado suelto y algunas glándulas migran (invaden) el músculo circundante (estroma).

15 Grado 3 de Gleason: este es el grado más frecuente con mucho y también se considera bien diferenciado (como los grados 1 y 2). Esto es debido a que los tres grados tienen una "unidad glandular" normal, similar a la de una próstata normal; es decir, cada célula forma parte de una fila circular que forma el revestimiento de un espacio central (el lumen). El lumen contiene la secreción prostática como una próstata normal, y cada unidad glandular está rodeada por el músculo de la próstata que mantiene las unidades de las glándulas separadas. En contraposición con el grado 2, la migración de las glándulas (invasión) al estroma (músculo) es muy relevante y es la característica principal. Las células son más oscuras que pálidas y las glándulas tienen a menudo formas más variables.

20 Grado 4 de Gleason: este es probablemente el grado más importante porque es bastante frecuente y debido al hecho de que, si está presente en gran cantidad, el pronóstico del paciente se suele empeorar (pero no siempre) de forma considerable. Aquí también hay un gran aumento en la pérdida de la estructura. Por primera vez, se observan roturas y la *pérdida de la unidad glandular normal*. De hecho, el grado 4 se identifica casi enteramente por la pérdida de la capacidad de formar unidades glandulares individuales y separadas, cada una con su lumen separado (espacio secretor). Esta distinción importante es simple en el concepto, pero compleja en la práctica. La razón es que hay una variedad de vías aparentes diferentes en las cuales el esfuerzo del cáncer para formar las unidades glandulares se puede distorsionar. Cada cáncer tiene su propio conjunto parcial de herramientas con las cuales destruye parte de la estructura normal. El grado 4 es como las ramas de un árbol grande, que se extienden en muchas direcciones desde el tronco (bien diferenciado) de los grados 1, 2 y 3. Se necesita mucha experiencia para dictar este diagnóstico, y no todos los patrones se distinguen fácilmente del grado 3. Esta es la clase principal de cáncer de próstata poco diferenciado, y su distinción del grado 3 es la decisión generalmente más importante para la determinación del grado.

35 Grado 5 de Gleason: El grado 5 de Gleason es un grado importante porque predice generalmente otra etapa significativa hacia un pronóstico desfavorable. Su importancia global para la población general es reducida por el hecho de que es menos frecuente que el grado 4, y se observa raramente en los hombres en los que se ha diagnosticado un cáncer de próstata temprano en desarrollo. Este grado también muestra muchos patrones, mostrando todos que no hay *ningún indicio* de ninguna tentativa de formar unidades glandulares. Este grado se denomina frecuentemente *indiferenciado*, porque sus características no se distinguen significativamente para darle una apariencia diferente de los cánceres indiferenciados que aparecen en otros órganos.

40 Cuando un patólogo estudia las muestras de un cáncer de próstata al microscopio y les da un grado de Gleason, se realiza un intento de identificar dos patrones estructurales y se asigna un grado de Gleason a cada uno. Puede haber un patrón primario o más frecuente y a continuación un patrón secundario o segundo patrón más frecuente, los cuales trata de encontrar el patólogo para cada muestra; alternativamente, puede haber a menudo solamente un único grado puro.

45 Al desarrollar su sistema, el Dr. Gleason descubrió que dando una combinación de los grados de los dos patrones más frecuentes que se podía observar en cualquier muestra de un paciente particular era capaz de predecir mejor la probabilidad de que un paciente particular mejorara o empeorara. Por lo tanto, aunque pueda parecer confusa, la puntuación de Gleason que da generalmente un médico a un paciente es realmente una combinación o una suma de dos números, y es suficientemente exacta para ser utilizada de forma extensa. Estas sumas o puntuaciones combinadas de Gleason pueden ser determinadas del modo siguiente:

- La menor puntuación posible de Gleason es 2 (1 + 1), en donde el patrón primario y el secundario tienen un grado de Gleason 1 y, por lo tanto, cuando se adicionan ambos, su suma combinada es 2.
- Unas puntuaciones muy típicas de Gleason podrían ser 5 (2 + 3), en donde el patrón primario tiene un grado de Gleason 2 y el patrón secundario tiene un grado 3, o 6 (3 + 3), un patrón puro.
- 55 • Otra puntuación típica de Gleason puede ser 7 (4 + 3), en donde el patrón primario tiene un grado de Gleason 4 y el patrón secundario tiene un grado 3.
- Finalmente, la puntuación más alta posible de Gleason es 10 (5 + 5), cuando los patrones primario y secundario

tienen ambos el grado de Gleason más alterado que es 5.

Otro modo de determinar el estadio del cáncer de próstata es usando el *sistema TNM*. Este describe la extensión del tumor primario (estadio T), la ausencia o la presencia de propagación a los ganglios linfáticos vecinos (estadio N) y la ausencia o la presencia de propagación distante, o *metástasis* (estadio M). Cada categoría de la clasificación TNM se divide en subcategorías representativas de su estadio particular. Por ejemplo, los tumores primarios (estadio T) se pueden clasificar en:

T1: El tumor no se puede palpar en una exploración rectal digital (DRE), o no se puede ver con estudios de formación de imagen, pero se han encontrado células cancerosas en la biopsia de una muestra;

T2: El tumor se puede palpar durante un DRE y el cáncer está limitado dentro de la glándula prostática;

10 T3: El tumor se ha extendido por la cápsula prostática (una capa de tejido fibroso que rodea la glándula prostática) y/o a las vesículas seminales (dos pequeñas bolsas próximas a la próstata que almacenan el semen), pero otros órganos no están afectados;

T4: El tumor se ha propagado o fijado a tejidos cercanos a la próstata (con excepción de las vesículas seminales).

La implicación de los ganglios linfáticos se divide en las 4 categorías siguientes:

15 N0: El cáncer no se ha extendido a ningún ganglio linfático;

N1: El cáncer se ha extendido a un solo ganglio linfático regional (dentro de la pelvis) y no es más mayor de 2 centímetros;

N2: El cáncer se ha extendido a uno o a varios ganglios linfáticos regionales y es mayor de 2 centímetros, pero no más de 5 centímetros; y

20 N3: El cáncer se ha extendido a un ganglio linfático y es mayor de 5 centímetros (2 pulgadas).

La metástasis se divide generalmente en las dos categorías siguientes:

M0: El cáncer no tiene metástasis (diseminación) más allá de los ganglios linfáticos regionales; y

M1: El cáncer tiene metástasis en ganglios linfáticos distantes (parte exterior de la pelvis), en los huesos, o en otros órganos distantes, tales como los pulmones, el hígado o el cerebro.

25 Además, el estadio T se divide adicionalmente en las subcategorías T1a-c, T2a-c, T3a-c y T4a-b. Las características de cada una de ellas se conocen bien en la técnica y se pueden encontrar en muchos libros de texto.

30 Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología “marcador específico de la próstata” se refiere a cualquier molécula cuya presencia en la muestra indica que tal muestra contiene células de la próstata (o un marcador de las mismas). Por lo tanto, una “secuencia específica de la próstata” se refiere a un ácido nucleico o a una secuencia proteica encontrada específicamente en las células de la próstata y que generalmente no está en otros tejidos que podrían “contaminar” una muestra concreta. Para mayor certeza, cuando se emplea una muestra de orina, el segundo marcador específico de la próstata de acuerdo con la presente invención no tiene que expresarse solamente en la próstata. De hecho, los marcadores que sólo se expresan en un órgano o un tejido son muy raros. Sin embargo, si el segundo marcador específico de la próstata se expresa en un tejido que no es de la próstata, esta expresión del tejido no prostático no debe comprometer la especificidad de este segundo marcador, con la condición de que esto ocurra en células de tejidos o de órganos que normalmente no están presente en la muestra de orina. Así, cuando la orina es la muestra, este segundo marcador específico de la próstata no se expresa normalmente en otros tipos de células (p. ej., células las vías del aparato urinario) que se encuentran en la muestra de orina. De forma similar, si se emplea otro tipo de muestra (p. ej., una muestra de esperma), el segundo marcador específico de la próstata no debe ser expresado en otros tipos de células que se encuentran normalmente dentro de tal muestra.

45 Muestra testigo. La expresión “muestra testigo” o “muestra normal” significa en esta memoria una muestra que no contiene un cáncer elegido específicamente. En una realización particular, la muestra testigo no contiene cáncer de próstata ni es indicativa de la ausencia de cáncer de próstata. Las muestras testigo se pueden obtener a partir de pacientes/individuos que no están afectados de cáncer de próstata. Se pueden utilizar también otros tipos de muestras testigo. Por ejemplo, un marcador específico de la próstata se puede utilizar para asegurar que la muestra contiene células específicas de la próstata (este marcador se describe generalmente en esta memoria como el segundo marcador específico de la próstata). En un aspecto relacionado, se puede diseñar una reacción testigo para controlar el método mismo (p. ej., la extracción celular, la captura, la reacción de amplificación o el método de detección, el número de células presente en la muestra, una combinación de los mismos o cualquier etapa que se pudiera vigilar para validar positivamente que la ausencia de una señal (p. ej., la ausencia de la señal PCA3) no es el resultado de un defecto en una o en varias etapas). Una vez que se determina un valor umbral, se puede diseñar una muestra testigo dando una característica señal del valor umbral predeterminado y se puede emplear en los

métodos de la presente invención. Los ensayos de diagnóstico/pronóstico se caracterizan generalmente por los 4 indicadores siguientes del comportamiento: sensibilidad (Se), especificidad (Sp), valor predictivo positivo (VPP), y valor predictivo negativo (VPN). La tabla siguiente presenta los datos utilizados para calcular los 4 indicadores del comportamiento.

5 Tabla 1:

|        |     | Enfermedad/estado |              |       |
|--------|-----|-------------------|--------------|-------|
|        |     | Presencia (+)     | Ausencia (-) |       |
| Ensayo | (+) | A                 | b            | a + b |
|        | (-) | C                 | d            | c + d |
|        |     | A + c             | a + b        |       |

10 La sensibilidad se corresponde con la proporción de personas que tienen un ensayo del diagnóstico positivo que han padecido de verdad la enfermedad o el estado ( $Se = a/(a + c)$ ). La especificidad se refiere a la proporción de personas que tienen un ensayo de diagnóstico negativo y las que no tienen la enfermedad o el estado ( $Sp = d/(b + d)$ ). El valor predictivo positivo se refiere a la probabilidad de tener realmente la enfermedad o el estado (p. ej., cáncer de pulmón) cuando el ensayo de diagnóstico es positivo ( $VPP = a/(a + b)$ ). Finalmente, el valor predictivo negativo es indicativo de la probabilidad de no tener realmente la enfermedad/el estado cuando el ensayo de diagnóstico es negativo ( $VPN = c/(c + d)$ ). Los valores se expresan generalmente en %. La Se y la Sp se refieren generalmente a la precisión del ensayo, mientras que el VPP y el VPN se refieren a su utilidad clínica.

15 Valor de corte (umbral). El valor umbral de la predisposición o la presencia de cáncer de próstata se define a partir de una población de pacientes sin cáncer de próstata como la señal promedio de polinucleótidos de PCA3, o de fragmentos de los mismos, dividida por la señal promedio de los polinucleótidos, los polipéptidos o los fragmentos del segundo marcador específico del cáncer de próstata (p. ej., PSA), más n desviaciones estándares (o la señal media promedio de las mismas). Los valores umbrales indicativos de la presencia o de la predisposición a desarrollar cáncer de próstata pueden ser iguales o alternativamente, pueden ser valores diferentes. Puesto que los marcadores tumorales en muchos casos no sólo son producidos por células tumorales, la utilidad clínica obtenida a partir de un marcador dado implica a menudo encontrar un equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad. Tal compromiso se alcanza a menudo con un valor "umbral" específico, que se basa empíricamente en los datos recogidos. Se debe saber, por tanto, que un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención será capaz, con una experimentación rutinaria, de seleccionar un valor umbral concreto basándose en la especificidad y la sensibilidad deseadas, el tipo de muestra usada, la preparación de la misma, el estadio del cáncer, el hecho de que se emplea una razón más que un nivel absoluto de expresión de PCA3, y otros factores tales descritos en esta memoria. Más específicamente, en el caso de PCA3, la persona experta en la técnica puede escoger el valor umbral para que sea superior o inferior a los valores de las razones de ejemplo de  $132 \times 10^{-3}$  y  $200 \times 10^{-3}$ , descritos en esta memoria. Sin hacer específicamente un listado de los todos los valores útiles superiores e inferiores que se pueden seleccionar para PCA3/PSA, y que están dentro del alcance de la presente invención, se debe saber que, por ejemplo, una razón normalizada de  $100 \times 10^{-3}$ ,  $150 \times 10^{-3}$ ,  $175 \times 10^{-3}$  o  $250 \times 10^{-3}$  podría ser seleccionada por un técnico experto para elegir un nivel útil de especificidad y de sensibilidad. Además, cuando se determina el nivel sérico de proteína PSA, se puede utilizar un umbral distinto del valor ejemplificado en esta memoria de 3 ng/ml, de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un valor umbral de 5 ng/ml, 10 ng/ml, etc., se puede utilizar de acuerdo con la presente invención cuando se realiza opcionalmente una preselección de las muestras en las que hay que someter a ensayo adicionalmente la razón PCA3/PCA. Los valores umbrales para determinar el estadio o para determinar la agresividad (pronóstico) del cáncer de próstata se definen a partir de una población de pacientes que tienen cáncer de próstata en diferentes estadios o con una agresividad diferente (puntuación de Gleason) como la señal promedio de polinucleótidos de PCA3, o de fragmentos de los mismos, dividida por la señal promedio de polinucleótidos, polipéptidos o fragmentos de los mismos, de un segundo marcador específico de la próstata (p. ej., PSA), más n desviaciones estándares (o su señal media promedio) para un estadio específico del cáncer de próstata. Dependiendo de la especificidad y de la sensibilidad deseadas del ensayo y del estadio, grado o volumen concreto del tumor de la próstata que se va a detectar, se escogerá un valor umbral particular.

45 Las terminologías "nivel" y "cantidad" se emplean en esta memoria de forma intercambiable cuando hacen referencia a PCA3, a PSA o a otro marcador que se está midiendo.

Una persona experta en la técnica ha de saber que se pueden emplear numerosos métodos estadísticos en el contexto de la presente invención para determinar si el ensayo es positivo o negativo o para determinar el estadio, el grado, el volumen particular del tumor de la próstata o su agresividad.

50 Variante. El término "variante" se refiere en esta memoria a una proteína o a una molécula de ácido nucleico que es

sustancialmente similar en estructura y actividad biológica a la proteína o al ácido nucleico de la presente invención, para mantener por lo menos una de sus actividades biológicas. Así, con la condición de que dos moléculas posean una actividad común y se puedan sustituir entre sí, se consideran variantes, tal y como se emplea este término en esta memoria, incluso si la composición o la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una molécula no es idéntica a la de la molécula encontrada en la otra secuencia, o si la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos no es idéntica.

Por una "muestra biológica" o una "muestra de un paciente" se entiende cualquier tejido o material obtenido a partir de un ser humano vivo o muerto que pueda contener los ácidos nucleicos diana de PCA3 y de PSA. Las muestras incluyen, por ejemplo, cualquier tejido o material que pueda contener células específicas para las dianas de PCA3 y de PSA (u otro marcador específico de la próstata), tal como una biopsia de la próstata, orina, semen, lavados vesicales u otros fluidos, tejidos o materiales corporales. La muestra preferida según la presente invención es una muestra de orina recogida después de una exploración rectal digital (u otros medios que aumentan el contenido en células de la próstata de la orina). La muestra biológica se puede tratar para romper físicamente el tejido o la estructura celular, liberando de este modo los componentes intracelulares en una solución que puede contener adicionalmente enzimas, tampones, sales, detergentes y similares que se utilizan para preparar la muestra para el análisis. En una realización particular, la muestra es una muestra de orina tomada después de un DRE.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes después de la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de las realizaciones preferidas de la misma, dadas únicamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

## 20 Breve descripción de los dibujos

Habiendo así pues descrito la invención en general, se hace ahora referencia a los dibujos adjuntos, mostrados a modo de ilustración de una realización preferida de la misma y en donde:

La Figura 1 muestra una realización de un principio del ensayo de la presente invención.

La Figura 2 muestra un análisis, basado en el gen de PCA3, de sedimentos urinarios después de una DRE extensa. La Figura 2A muestra una representación gráfica de la sensibilidad sobre la especificidad. Los sedimentos urinarios fueron obtenidos después de una DRE extensa de una cohorte de 108 hombres con niveles de PSA sérico  $>3$  ng/ml. La eficacia del diagnóstico del ensayo basado en PCA3 de los sedimentos urinarios se visualiza con una curva de rendimiento diagnóstico (ROC). Basándose en esta curva ROC, se determinó un nivel umbral de  $200 \times 10^{-3}$ . La Figura 2B muestra los valores de PCA3/PSA obtenidos a partir de los sedimentos urinarios de la Figura 2A, pero resumidos en un diagrama de cajas. Se observa el valor de la mediana de PCA3/PSA (línea horizontal negra y gruesa), valores atípicos (círculos abiertos) y extremos (estrellas). El valor umbral está indicado por una línea discontinua.

La Figura 3 muestra la significación del pronóstico con PCA3/PSA. Los sedimentos urinarios fueron obtenidos después de una DRE extensa de una cohorte nueva de 136 hombres con niveles de PSA sérico  $>3$  ng/ml. En un diagrama de cajas, los valores de PCA3/PSA obtenidos a partir de estos sedimentos urinarios se correlacionaron con la puntuación de Gleason. Se mostraron el valor de la mediana de PCA3/PSA (línea horizontal gruesa y negra), valores atípicos (círculos abiertos) y extremos (estrellas). Debido a pequeños ajustes en el ensayo, se determinó un nuevo valor umbral de  $132 \times 10^{-3}$  que se indica por una línea discontinua.

La Figura 4 muestra que el comportamiento de PCA3/PSA correlacionado con la puntuación de Gleason. En 49 pacientes, el cáncer fue identificado mediante evaluación histopatológica de las biopsias. En este caso, la distribución de las puntuaciones de Gleason se muestra en los casos en los que el ensayo de PCA3/PSA era positivo/verdadero positivo y en los que el ensayo era negativo, empleando un valor umbral de  $132 \times 10^{-3}$  para la razón PCA3/PSA. Los números de los casos están en el eje y.

La Figura 5 muestra una realización de la presente invención en donde se muestra una correlación entre las puntuaciones de Gleason (sin cáncer y puntuaciones 4-9) y la razón media y mediana para los ARNm de PCA3/PSA en biopsias.

La Figura 6 es similar a la Figura 5 salvo que la correlación entre las puntuaciones de Gleason (sin cancer y puntuaciones 4-9) y la razón entre la media y la mediana para los ARNm de PCA3/PSA se presenta como un gráfico.

La Figura 7 muestra la sensibilidad por grado del método de la presente invención, usando un umbral de PCA3/PSA de  $132 \times 10^{-3}$ .

La Figura 8 es similar a la Figura 7 salvo que los resultados se presentan en un gráfico.

La Figura 9 muestra la relación entre el volumen tumoral promedio y las razones particulares de los ARNm de PCA3/PSA (es decir, inferior a  $132 \times 10^{-3}$  y superior a  $132 \times 10^{-3}$ ).

### Descripción de realizaciones ilustrativas

Uno de los desafíos principales para los marcadores en el cáncer de próstata es cumplir con los requerimientos de un ensayo diagnóstico que también pronostique el comportamiento clínico del cáncer de próstata. El gen PCA3 se hipereexpresa fuertemente en el cáncer de próstata cuando se compara con las células epiteliales no cancerosas de la próstata, debido a un único mecanismo de regulación de la transcripción. En esta memoria se muestra que las células agresivas son más invasivas y por tanto más susceptibles de movilizarse y filtrarse en el sistema ductal. Además, se ha mostrado de forma inesperada que la razón PCA3/segundo marcador específico de la próstata (p. ej., PSA) esté correlacionada con el volumen del tumor. Por lo tanto, después de una DRE extensa, la razón PCA3/PSA de los ARNm se puede correlacionar con el estadio, el grado, el volumen del tumor y de este modo, con la agresividad biológica del cáncer de próstata, posibilitando así un diagnóstico y un pronóstico del cáncer más exactos, así como la prescripción médica de un régimen de tratamiento más apropiado para el paciente.

La Tabla 4 muestra la expresión de PCA3 en la próstata. La Tabla 6 muestra una comparación de la expresión del ARNm de PCA3 en la próstata. La Tabla 7 muestra la correlación entre PCA3/PSA y la malignidad del cáncer de próstata.

En una realización, se sometió a ensayo prospectivo una cohorte nueva de pacientes que ingresaron en la clínica con niveles séricos de PSA elevados (> 3 ng/ml). Los pacientes recibieron información sobre el estudio y firmaron su consentimiento para entrar en el estudio. Para la determinación histológica, se realizó una biopsia guiada por ultrasonidos para estudiar la presencia o la ausencia de cáncer. En 49 pacientes, el cáncer fue identificado por la evaluación histopatológica de las biopsias. Se compararon la histología y la razón entre los ARNm de PCA3/PSA obtenidos inmediatamente antes de las biopsias.

Asombrosamente, se observó una correlación clara entre la puntuación de Gleason y el nivel de la razón PCA3/PSA de los ARNm (Figuras 3, 5 y 6). Posteriormente, se estudió la distribución de los grados de Gleason en los casos en los que el ensayo era positivo/verdadero positivo y en los que el ensayo era negativo. Los falsos negativos tenían claramente un grado menor que los verdaderos positivos.

La razón entre los ARNm de PCA3 y PSA analizada en sedimentos urinarios después de un DRE extendido se muestra, por lo tanto, como un parámetro para el pronóstico y para el tratamiento.

A pesar de numerosos avances en estos últimos años, la precisión con la que se puede estadificar y pronosticar a una persona que padece cáncer de próstata está lejos de ser óptima. Una de las razones es que los marcadores de la próstata PSA y PSM se expresan en células normales y cancerosas, y su expresión tiende a disminuir en los tumores mal diferenciados (que son generalmente los de tipo más agresivo). Por lo tanto, el diagnóstico y el pronóstico se vuelven cada vez menos específicos y sensibles cuando los tumores tienden a estar mal diferenciados (grado de tumor en aumento) e incluso pueden escaparse del diagnóstico.

Por otra parte, PCA3 está fuertemente hipereexpresado en el cáncer de próstata cuando se compara con células epiteliales no cancerosas de la próstata, y la expresión de PCA3 está restringida a la próstata debido a un único mecanismo de regulación de la transcripción (Vearhaegh y col., 2000, J. Biol. Chem. 275:37496-37503). Se expresa de forma diferencial en las células cancerosas y en las células normales de la próstata, y su expresión no disminuye significativamente con el incremento del grado del tumor. PCA3 podría ser por ello una herramienta útil que podría superar los inconvenientes de PSA y de PSM en el diagnóstico, la estadificación y el tratamiento de los pacientes con cáncer de próstata.

Aunque PCA3 ha mostrado ser una herramienta muy específica y sensible para el diagnóstico, su valor como herramienta para el pronóstico y el tratamiento y el diagnóstico no se había establecido nunca antes de la presente invención. La presente invención muestra que la expresión de PCA3 se correlaciona con la agresividad biológica y, por lo tanto, se puede utilizar como un marcador para el pronóstico y/o el tratamiento. Además, la presente invención establece la utilidad de la razón entre el nivel de expresión de PCA3/PSA como un factor muy eficaz para el pronóstico/tratamiento. Adicionalmente, los inventores han descubierto que el valor de la razón de la expresión de PCA3/PSA en una muestra es una herramienta para el pronóstico/tratamiento muy sensible y específica que se correlaciona con el grado del tumor, el volumen del tumor y la agresividad del cáncer. El uso de los marcadores de la próstata PCA3 y PSA, y el hecho de que los niveles de expresión de PSA tienden a disminuir con la agresividad del cáncer de próstata, (que aumentaría el valor de la razón, un hecho que todavía se discute en la técnica) contribuyen a la sensibilidad y a la especificidad de los métodos de diagnóstico y de pronóstico de la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención describe por primera vez métodos específicos y sensibles para el pronóstico del cáncer de próstata en un paciente mediante la detección del nivel de expresión (cantidad) del ARN codificado por el gen de PCA3 en relación con el nivel de expresión del ARN codificado por el gen de PSA en una muestra. El valor de la razón PCA3/PSA entre sus niveles de expresión se correlaciona con la presencia o la ausencia de cáncer de próstata y posibilita el establecimiento del estadio o de la agresividad de la enfermedad para determinar el pronóstico del cáncer. Esto es particularmente útil para determinar el grado de gravedad de la enfermedad, para predecir su evolución y, lo más importante, para elegir inmediatamente el tipo de tratamiento adecuado para el paciente para incrementar sus posibilidades de recuperación.

Generalmente, la predisposición a desarrollar cáncer de próstata, la presencia de cáncer de próstata o la agresividad del cáncer de próstata, se pueden detectar en los pacientes basándose en la presencia de una elevada cantidad de polinucleótidos de PCA3 en una muestra biológica (p. ej., una muestra de orina después de un DRE) en relación con la cantidad de polinucleótidos de PSA (razón PCA3/PSA). Los cebadores y las sondas de polinucleótidos se pueden utilizar para detectar el nivel de los ARNm que codifican PCA3 y PSA, cuya razón es indicativa de la predisposición, la presencia, la ausencia y la agresividad (estadio) del cáncer de próstata. En general, la expresión elevada de un marcador de PCA3 en relación con un marcador de PSA en una muestra biológica, cuando se compara con muestras testigos normales, indica que la muestra contiene cáncer de próstata o es susceptible de desarrollar cáncer de próstata. En el caso específico en el que la muestra es positiva para cáncer de próstata, el valor de la razón entre los niveles de expresión de PCA3 y PSA se correlaciona con un estadio particular de la progresión o de la agresividad del cáncer de próstata (p. ej., una puntuación concreta de Gleason, volumen del tumor, etc.).

En una realización, los marcadores de PCA3 y de PSA de la presente invención son ácidos nucleicos tales como el ARNm de PCA3 y de PSA o fragmentos de los mismos asociados al cáncer de próstata. El ácido nucleico de PCA3 puede tener la secuencia de nucleótidos descrita en las SEQ ID n.<sup>os</sup> 1 o 2. Sin embargo, la terminología "ácidos nucleicos de PCA3" o similares no está limitada a las secuencias de SEQ ID n.<sup>os</sup> 1 o 2, o a fragmentos o a complementos de las mismas. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de PCA3 también se encuentran en GenBank<sup>®</sup> con el número de entrada AF103907. Además, las secuencias que son muy homólogas a tales secuencias, fragmentos o complementos de las mismas, también se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. La secuencia de nucleótidos de PSA puede tener la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID n.<sup>o</sup> 38. Por supuesto, se ha de saber que porciones o fragmentos de PCA3 y de PSA (p. ej., los ácidos nucleicos de PCA3 y de PSA) se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención y, por tanto, también se consideran marcadores de PCA3 y de PSA.

Un ejemplo no limitativo de un método de diagnóstico y de pronóstico/tratanóstico para el cáncer de próstata comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos una sonda o un cebador oligonucleotídico que se hibrida con el ácido nucleico de PCA3 y detectar un nivel de oligonucleótido que se hibrida con el mismo; (b) poner en contacto la muestra biológica con al menos una sonda o un cebador oligonucleotídico que se hibrida con el ácido nucleico de PSA y detectar un nivel de oligonucleótido que se hibrida con el mismo; y (c) determinar la razón entre el nivel de oligonucleótido que se hibrida con PCA3 y el nivel de oligonucleótido que se hibrida con PSA. El valor de la razón entre PCA3 y PSA detectados se puede comparar con un valor umbral predeterminado y a partir del mismo se puede establecer la predisposición, la presencia, la ausencia y el estadio del cáncer de próstata, así como el volumen aproximado del tumor en el paciente.

En general, el pronóstico de un paciente se determina como desfavorable (es decir, un cáncer muy agresivo) cuando el valor de la razón PCA3/PSA de los ARNm es superior a  $200 \times 10^{-3}$ . Un pronóstico intermedio se refiere a una razón PCA3/PSA de los ARNm entre  $75 \times 10^{-3}$  y  $200 \times 10^{-3}$ , y un pronóstico favorable o con poco riesgo se corresponde con un valor de la razón PCA3/PSA de los ARNm entre 0 y  $75 \times 10^{-3}$ . Las puntuaciones de Gleason que están asociadas con estas razones son >7; 6-7; y 0-5, respectivamente. Por supuesto los intervalos mencionados anteriormente de los valores de la razón podían diferir dependiendo de la sensibilidad y de la especificidad deseadas del ensayo y de la elección del segundo marcador específico de próstata. Así, el experto en la técnica podrá utilizar (y adaptar) diferentes valores umbrales o de corte según de los requisitos particulares de la prueba.

En una realización particular, el nivel de polipéptido de un segundo marcador específico de próstata (p. ej., PSA) se puede utilizar para determinar una razón PCA3/segundo marcador específico de próstata. Así, un método de diagnóstico, pronóstico y tratanóstico para el cáncer de próstata también puede comprender: (a) poner en contacto una muestra biológica con al menos una sonda o un cebador oligonucleotídico que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 y detectar un nivel de oligonucleótido que se hibrida con el mismo; (b) poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo que se hibrida con el polipéptido de PSA y detectar un nivel de polipéptido que se hibrida con el mismo; y (c) determinar la razón entre el nivel de oligonucleótido que se hibrida con PCA3 y el nivel de anticuerpo que se hibrida con el polipéptido de PSA (es decir, determinar la razón entre los niveles de expresión de PCA3/PSA). El valor de la razón entre PCA3 y PSA detectado se puede comparar con un valor umbral predeterminado y, de este modo, se puede establecer la predisposición, la presencia, la ausencia y el estadio del cáncer de próstata, así como el volumen aproximado del tumor en el paciente. Por supuesto, y tal y como se ejemplifica más abajo en esta memoria, la razón PCA3/PSA se puede determinar basándose en la detección del ARNm de PCA3 y de PSA.

Los métodos como se describen en la presente memoria también se pueden utilizar para vigilar la progresión del cáncer de próstata en un paciente. En esta realización particular, los ensayos descritos anteriormente se realizan a lo largo del tiempo y se evalúa la variación de la razón entre el nivel de expresión de los ácidos nucleicos o las proteínas de PCA3 y de PSA presentes en la muestra (p. ej., muestra de orina). El cáncer de próstata se considera generalmente que está progresando cuando la razón entre los niveles de expresión detectados de PCA3 y de PSA aumenta con el tiempo. En cambio, un cáncer se considera que no está progresando cuando la razón entre los niveles de expresión de PCA3 y de PSA disminuye o permanece constante a lo largo del tiempo.

En un aspecto relacionado, es posible verificar la eficacia de la amplificación y/o de la detección del ácido nucleico solamente realizando reacción(ones) con testigos externos con ácidos nucleicos diana testigos, altamente

purificados, añadidos a la mezcla de reacción de la amplificación y/o de la detección. Alternativamente, la eficacia de la recuperación del ácido nucleico a partir de células y/o de orgánulos, el nivel de inhibición de la amplificación y/o la detección del ácido nucleico (si está presente) se pueden verificar y estimar con la adición, a cada muestra del ensayo, de células o elementos celulares de testigo (p. ej., un número definido de células procedentes de una línea celular de cáncer de próstata que expresa PCA3 y un segundo marcador), en comparación con reacción(ones) con testigo(s) externo(s). Para verificar la eficacia de ambos, la preparación y la amplificación de las muestras y/o la detección, tales reacción(ones) con testigo(s) externo(s) se pueden realizar con una muestra del ensayo de referencia o una muestra en blanco enriquecida con células, elementos celulares y/o partículas víricas portadoras de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico testigo. Por ejemplo, una señal procedente de las secuencias del testigo interno (IC) presentes en las células, los virus y/o los elementos celulares añadidos a cada muestra del ensayo, que es más baja que la señal observada con la(s) reacción(ones) con testigo externo, se puede explicar por la lisis incompleta y/o la inhibición de los procesos de amplificación y/o de detección de una muestra dada del ensayo. Por otra parte, una señal procedente de las secuencias IC que es similar a la señal observada con la(s) reacción(ones) como testigo externo, confirmaría que la preparación de la muestra que incluye la lisis celular es eficaz y que no hay una inhibición significativa de los procesos de amplificación y/o detección de una muestra dada del ensayo. Alternativamente, la verificación de la eficacia de la preparación de la muestra, sólo se puede realizar usando testigo(s) externo(s) analizado(s) por métodos distintos al ensayo de los ácidos nucleicos (p. ej., análisis con microscopía, espectrometría de masas o inmunoensayos).

Por lo tanto, en una realización particular, los métodos de la presente invención emplean ácidos nucleicos purificados, células de la próstata o partículas víricas que contienen secuencias de ácido nucleico que sirven como dianas para un testigo interno (IC) en ensayos de prueba de ácidos nucleicos para verificar la eficacia de la lisis celular y de la preparación de la muestra, así como el comportamiento de la amplificación y/o de la detección del ácido nucleico. Más ampliamente, el IC sirve para verificar cualquier etapa seleccionada del procedimiento de la presente invención.

El IC en la PCR, o en las técnicas de la amplificación relacionadas, puede ser ADN plasmídico muy purificado, superenrollado o linealizado por digestión con una endonucleasa de restricción, y purificado de nuevo. Los moldes de IC superenrollado se amplifican con mucha menos eficacia (aproximadamente 100 veces menos) y de una manera menos reproducible que los moldes de ácido nucleico de IC linealizados y purificados de nuevo. Por lo tanto, los testigos IC para la amplificación y la detección de la presente invención se preparan preferiblemente con moldes de ácido nucleico de IC linealizado y purificado de nuevo, cuando se emplean tales tipos de IC.

Los ácidos nucleicos, las células y/o los orgánulos se incorporan en cada muestra del ensayo con la concentración apropiada para obtener una amplificación/detección eficaces y reproducibles del IC, basándose en realizar el ensayo durante la optimización del ensayo. El número óptimo de células testigo añadidas, que es dependiente del ensayo, es preferentemente el número mínimo de células que permite una señal de detección de IC altamente reproducible, sin tener ningún efecto perjudicial significativo sobre la amplificación y/o la detección de otra(s) diana(s) genética(s) del ensayo basado en el ácido nucleico. Una muestra a la que se añaden los ácidos nucleicos linealizados y purificados, las células, las partículas víricas o los elementos celulares, se denomina generalmente una "muestra enriquecida".

En determinadas realizaciones, la cantidad de ARNm se puede detectar mediante un ensayo basado en la RT-PCR. En la RT-PCR, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplica junto con la transcripción inversa. En tal ensayo, se pueden utilizar por lo menos dos cebadores oligonucleotídicos para amplificar una porción del ADNc de PCA3 o de PSA obtenido a partir de una muestra biológica, en donde por lo menos un oligonucleótido es específico (es decir, se hibrida) con un polinucleótido que codifica el ARN de PCA3 o de PSA. Los ADNc amplificados se pueden separar a continuación y detectar usando métodos que son bien conocidos en la técnica, tales como la electroforesis en gel y la tinción con bromuro de etidio. La amplificación se puede realizar sobre muestras biológicas tomadas a partir de un paciente del ensayo y de una persona que no está afectada con cáncer de próstata (muestra testigo), o empleado otros tipos de muestras testigo. La reacción de amplificación se puede realizar con distintas diluciones de ADNc (o directamente con distintas diluciones de la muestra biológica) que incluyen, por ejemplo, dos órdenes de magnitud. Un valor de la razón superior a un valor umbral predeterminado es indicativo de la presencia, la predisposición a desarrollar cáncer de próstata, o de un estadio específico de progresión (agresividad) del cáncer de próstata. En general, la expresión elevada del ácido nucleico de PCA3 en relación con la expresión del ácido nucleico de PSA en una muestra biológica, en comparación con muestras testigo, indica la presencia o alternativamente, la predisposición a desarrollar cáncer de pulmón. Un valor característico de la razón también es indicativo del estadio y de la agresividad del cáncer de próstata detectado.

En otras realizaciones, los ARNm de PCA3 y de PSA se detectan en un extracto de ácido nucleico procedente de una muestra biológica mediante un método de amplificación *in vitro* del ARN denominado amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). Se han descrito numerosas técnicas de amplificación y se pueden adaptar fácilmente a las necesidades particulares de una persona con los conocimientos habituales. Ejemplos no limitativos de las técnicas de amplificación incluyen la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), la amplificación basada en la transcripción, el sistema de la replicasa de Q $\beta$  y NASBA (documento de patente US 6.124.120; Kwong 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, véase más arriba). Otros ejemplos no limitativos de los métodos de amplificación incluyen la amplificación por círculo rodante (RCA); la amplificación mediada con señal con tecnología de ARN (SMART); la reacción de amplificación con división de complejo (SCAR); la amplificación de ARN con división del promotor (SPAR).

- 5 La amplificación y/o la detección de las secuencias de ARN de PCA3 y de PSA se pueden realizar simultáneamente (p. ej., ensayos de amplificación en formato múltiple en tiempo real). Alternativamente, las sondas de oligonucleótidos que se hibridan específicamente en condiciones rigurosas con un ácido nucleico de PCA3 o de PSA, se pueden utilizar en un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos (p. ej., transferencias de tipo Southern y Northern, transferencia puntiforme, transferencia por ranuras, hibridación *in situ* y similares) para determinar la presencia y/o la cantidad de polinucleótido de PCA3 y de PSA en una muestra biológica.

Alternativamente, los oligonucleótidos y los cebadores se podían diseñar para secuenciar directamente y determinar la presencia de secuencias de PCA3 específicas del cáncer de próstata y de PSA en la muestra del paciente, después de una etapa de amplificación. Tales métodos de diagnóstico basados en la secuenciación están automatizados y se incluyen en la presente invención.

- 15 La agresividad de los carcinomas está asociada a un potencial invasivo creciente de las células cancerosas (confirmado por una disminución de la regulación del gen de E-caderina supresor de la invasión, en el cáncer de próstata con alto grado de agresividad). Es más probable que estas células invasivas se movilicen e invadan el sistema ductal. La presente invención tiene ventajas por el hecho de que la fracción de células invasivas en el sedimento urinario se incrementará después de una DRE extensa. Por lo tanto, según la presente invención, una muestra preferida que se va a someter a ensayo es la orina obtenida después de una exploración rectal digital o de cualquier otro método que permita un aumento del número de células de la próstata en la muestra. Por supuesto, otras muestras tales como semen, orina y semen mezclados y lavados vesicales se pueden utilizar según la presente invención, mientras la muestra contenga suficiente material para permitir la detección de los ácidos nucleicos de PCA3 y de PSA (o de otro segundo marcador específico de la próstata).

#### 25 **Síntesis de ácido nucleico**

El ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN) para poner en práctica la presente invención se puede obtener según métodos bien conocidos.

- 30 Las moléculas de ácido nucleico que se describen en la presente invención incluyen las obtenidas por clonación, así como las sintetizadas químicamente. De forma similar, se puede sintetizar un oligómero que se corresponde con la molécula de ácido nucleico, o con cada uno de los fragmentos divididos. Tales oligonucleótidos sintéticos se pueden preparar, por ejemplo, por el método del triéster de Matteucci y col., *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185-3191 (1981) o con un sintetizador de ADN automatizado.

- 35 Un oligonucleótido se puede obtener sintéticamente o por clonación. Si es necesario, los extremos 5' de los oligómeros se pueden fosforilar con la quinasa de polinucleótidos de T4. La fosforilación de las cadenas sencillas antes de la reasociación o para marcar se puede conseguir con un exceso de la enzima. Si la fosforilación es para marcar la sonda, el ATP puede contener radioisótopos con una actividad específica muy alta. Entonces, el oligómero de ADN se puede someter a reasociación y ligación con la ligasa de T4 o una similar. Por supuesto, la marcación de una secuencia de ácido nucleico se puede realizar mediante otros métodos conocidos en la técnica.

#### **Cebadores y sondas**

- 40 Un experto en la técnica puede seleccionar los cebadores de ácido nucleico según métodos conocidos en la técnica. Las muestras que se van a someter a ensayo incluyen, pero no deben ser limitadas a, las muestras del ARN procedentes del tejido humano.

- 45 Se describen cebadores de ácido nucleico y sondas que son complementarios a una secuencia de nucleótidos que consiste en por lo menos 10 nucleótidos consecutivos (preferiblemente, 12, 15, 18, 20, 22, 25 o 30 [por supuesto, la secuencia podría ser más larga, véase más abajo]) procedentes de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que es al menos idéntica en un 90% a una secuencia seleccionada del grupo consistente en:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm de PCA3 que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID n.º 1 o 2;
- 50 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm de PSA que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID n.º 38; y
- (c) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de (a) o (b).

Se describe un ácido nucleico para detectar y cuantificar específicamente, en una muestra, la presencia de secuencias de ácido nucleico de PCA3 que están asociadas al cáncer de próstata, que comprende las moléculas de

ácido nucleico descritas anteriormente o al menos un fragmento de las mismas, que se une en condiciones rigurosas con el ácido nucleico de PCA3. En un aspecto relacionado, se describe un ácido nucleico para la detección específica y la cuantificación, en una muestra, de la presencia de secuencias de ácido nucleico de PSA, que comprende las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente o al menos un fragmento de las mismas que se une, en condiciones rigurosas, a los ácidos nucleicos de PSA.

Se describen oligos que se dirigen específicamente hacia la diana y permiten la amplificación (es decir, por lo menos un cebador para cada diana) de las secuencias de ARN de PSA y PCA3 asociadas al cáncer de próstata.

Las sondas o los cebadores oligonucleotídicos tal y como se describen en la presente invención pueden tener cualquier longitud adecuada, dependiendo del formato particular del ensayo y de las necesidades particulares y de las secuencias diana empleadas. En una realización preferida, las sondas o los cebadores oligonucleotídicos tienen una longitud de al menos 10 nucleótidos (preferiblemente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32...) y pueden estar adaptados para ser especialmente adecuados para un sistema elegido de amplificación de ácidos nucleicos. Las sondas y los cebadores más largos también están dentro del alcance de la presente invención, y son bien conocidos en la técnica. Los cebadores que tienen más de 30, más de 40, más de 50 nucleótidos, y las sondas que tienen más de 100, más de 200, más de 300, más de 500 más de 800 y más de 1000 nucleótidos de longitud, también están incluidos en la presente descripción. Por supuesto, los cebadores más largos tienen la desventaja de ser más costosos y, por ello, los cebadores que tienen entre 12 y 30 nucleótidos de longitud se diseñan y se emplean generalmente en la técnica. Tal y como se conoce bien en la técnica, las sondas en el intervalo de 10 a más de 2000 nucleótidos de longitud, se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. En cuanto al % de identidad descrito anteriormente, los tamaños no descritos específicamente de sondas y de cebadores (p. ej., 16, 17, 31, 24, 39, 350, 450, 550, 900, 1240 nucleótidos,...) también están dentro del alcance de la presente descripción. Las sondas o cebadores oligonucleotídicos que se describen la presente invención se pueden hibridar específicamente con un ARN de PCA3 (o con su secuencia complementaria) o un ARNm de PSA. Más preferiblemente, los cebadores y las sondas de PCA3 se escogerán para detectar un ARN de PCA3 que esté asociado al cáncer de próstata. En una realización, las sondas y los cebadores utilizados en la presente invención no se hibridan con los genes de PCA3 o de PSA (es decir, permite distinguir el gen y el ácido nucleico expresado de PCA3 o de PSA). Debido a las similitudes estructurales y de la secuencia del gen de PSA con otros miembros de la familia de genes de la calicreína, la selección apropiada de secuencias de PSA para servir como sondas o cebadores específicos de PSA es importantes para los métodos de amplificación y/o de detección de los ácidos nucleicos específicos de PSA.

En otra realización, otros marcadores específicos de la próstata se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención. Ejemplos útiles de cebadores adecuados para PSA, hK2/KLK2, PSMA, la amplificación y la detección (p. ej., el documento de patente estadounidense nº 6.551.778) son bien conocidos en la técnica, así como los cebadores para la transglutaminasa 4, la fosfatasa ácida y PCGEM1. En una realización, el oligonucleótido de PSA también se puede hibridar con otros miembros de la familia de la calicreína, tales como la calicreína 2 (hK2/hKLK2). Un ejemplo de tales oligonucleótidos es la SEQ ID n.º 39. Por supuesto, también se pueden utilizar los oligonucleótidos de PSA que son específicos de PSA (es decir, diseñados para que no se hibriden con otros miembros de la familia de la calicreína). El experto en la técnica puede determinar fácilmente la especificidad de los cebadores o de las sondas seleccionados mediante alineamientos/búsquedas por ordenador con bases de datos bien conocidas (p. ej., GenBank®).

Tal y como se conoce corrientemente en la técnica, las sondas y los cebadores oligonucleotídicos se pueden diseñar teniendo en consideración el punto de fusión de la hibridación de los mismos con su secuencia diana (véase más abajo y en Sambrook y col., 1989, *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2.ª edición, CSH Laboratories; Ausubel y col., 1994, en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y.).

Para permitir que tenga lugar la hibridación en las condiciones del ensayo de la presente invención, los cebadores y las sondas oligonucleotídicos deben comprender una secuencia de oligonucleótidos que tenga por lo menos el 70% de identidad (por lo menos el 71%, 72%, 73%, 74%), preferiblemente por lo menos el 75% (75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%) y más preferiblemente por lo menos una identidad del 90% (90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97, 98%, 99%, 100%) con una porción de un polinucleótido de PCA3 o de PSA. Las sondas y los cebadores de la presente invención son los que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico (p. ej., ADNc o ARNm) de PCA3 o de PSA en condiciones de hibridación rigurosas y los que se hibridan con homólogos del gen de PCA3 y de PSA en condiciones al menos moderadamente rigurosas. En determinadas realizaciones, las sondas y los cebadores que se describen la presente invención tienen una identidad de secuencia total con las secuencias de los genes de PCA3 o de PSA (p. ej., ADNc o ARNm). Sin embargo, también se pueden utilizar en la presente invención las sondas y los cebadores que difieren de las secuencias génicas nativas de PCA3 o de PSA que conservan la capacidad de hibridarse con una secuencia nativa del gen de PCA3 o de PSA en condiciones rigurosas. Se debe saber que se podrían diseñar fácilmente otras sondas y cebadores, y se podrían utilizar en la presente invención, basándose en la secuencia de ácido nucleico de PCA3 y de PSA descrita en esta memoria (SEQ ID n.ºs 1, 2 y 36) mediante los métodos de alineamiento y de análisis de secuencia por ordenador conocidos en la técnica (véase, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, editado por Cold Spring Harbor Laboratory, 2000).

Por ejemplo, se puede diseñar un cebador para que sea complementario a un ARN pequeño de PCA3 que está asociado a un estado maligno del cáncer de próstata, mientras que un ARN largo de PCA3 está asociado a un estado no maligno (benigno) del mismo (documento PCT/CA00/01154 publicado con el número WO 01/23550). De acuerdo con la presente invención, el uso de tal cebador con los distintos reactantes necesarios, daría lugar a un producto de la amplificación solamente cuando un ARN pequeño de PCA3 asociado al cáncer de próstata está presente en la muestra. El PCA3 más largo (p. ej., que tiene una secuencia intercalada) no daría lugar a ningún amplión. Por supuesto, la amplificación se podría diseñar de modo que se amplifique un ARNm pequeño de PCA3 (que carece de todos o de la mayoría de los intrones) y uno largo (que tiene al menos un intrón o una parte del mismo). En tal formato, el ARNm largo de PCA3 se podría utilizar como el segundo marcador específico de la próstata.

En otra realización, se podrían diseñar parejas de cebadores (o sondas) específicas para PCA3 o PSA para evitar la detección de los genes de PCA3 o de PSA o de los ARN de PCA3 o de PSA sin cortar ni empalmar. Por ejemplo, las secuencias de los cebadores que se van a utilizar en la presente invención podrían abarcar dos exones contiguos, de modo que no se pudieran hibridar con una unión exón/intrón de los genes de PCA3 o de PSA. El producto de la amplificación obtenido por el uso de tal cebador será sin el intrón entre dos exones elegidos (para ejemplo de tales cebadores y sondas, véanse las Tablas 2 a 4 más abajo). Por lo tanto, no se amplificarían las variantes sin cortar ni empalmar ni el ADN genómico. Una persona experta en la técnica reconocerá que se pueden diseñar numerosas sondas y que se pueden emplear de acuerdo con muchas realizaciones de la presente invención. Esos ensayos se pueden adaptar con la secuencia de PCA3 y la del segundo marcador específico de la próstata. Por supuesto, se pueden diseñar diferentes parejas de cebadores (y de sondas) a partir de cualquier parte de las secuencias de PCA3 (SEQ ID n.ºs 1, 2; véanse las Tabla 1-3 para ejemplos no limitativos de los cebadores y de las sondas que se pueden utilizar para amplificar o detectar PCA3). Por supuesto, los cebadores y las sondas también se podían diseñar basándose en la secuencia de PSA mostrada en la SEQ ID n.º 38 (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada M27274), así como en la secuencia de otros miembros de la familia de la calicreína, que son bien conocidos en la técnica, o cualquier otro segundo marcador escogido, específico de la próstata (p. ej., KLK2 (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada NM005551), PSMA (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC025672), transglutaminasa 4 (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC007003), fosfatasa ácida (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC016344), PCGEM 1 (GenBank<sup>®</sup>, número de entrada AF223389).

Las sondas descritas en la presente invención se pueden utilizar con cadenas principales de azúcar y fosfato que aparecen en la naturaleza, así como con cadenas principales modificadas que incluyen fosforotioatos, ditionatos, fosfonatos de alquilo y  $\alpha$ -nucleótidos y similares. Las cadenas principales de azúcar y fosfato modificadas están ilustradas en general por Miller, 1988, Ann. Reports Med. Chem. 23:295 y Moran y col., 1987, Nucleic Acids Res., 14:5019. Las sondas de la invención se pueden construir a base de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN), y preferiblemente de ADN.

Aunque la presente invención no depende específicamente del uso de un marcador para detectar una secuencia de ácido nucleico concreta, dicho marcador puede ser beneficioso al incrementar la sensibilidad de la detección. Además, permite la automatización. Las sondas se pueden marcar según numerosos métodos bien conocidos (Sambrook y col., 2000, véase más arriba). Ejemplos no limitativos de marcadores detectables incluyen <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P y <sup>35</sup>S, ligandos, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos. Otros marcadores detectables para el uso con sondas, que pueden permitir un aumento de la sensibilidad del método de la invención, incluyen biotina y radionucleótidos. Para un experto en la técnica será evidente que la elección de un marcador particular dicta la manera en la cual se une a la sonda.

Tal y como se sabe en general, los nucleótidos radiactivos se pueden incorporar en las sondas de la invención por distintos métodos. Ejemplos no limitativos de los mismos incluyen la fosforilación de los extremos 5' de las sondas con <sup>32</sup>P ATP y quinasa de polinucleótidos, empleando el fragmento Klenow de la Pol I de *E. coli* en presencia de dNTP radiactivos (p. ej., una sonda de ADN marcada uniformemente con cebadores oligonucleotídicos aleatorios), con el sistema SP6/T7 para transcribir un segmento de ADN en presencia de uno o de varios NTP radiactivos, y similares.

En una realización, el marcador utilizado en un ensayo de detección homogéneo es un compuesto quimioluminiscente (p. ej., los documentos de patente de EE.UU. n.º 5.656.207; 5.658.737 y 5.639.604), más preferiblemente un compuesto de éster de acridinio ("AE"), tal como AE estándar o derivados del mismo. Los métodos para fijar los marcadores a los ácidos nucleicos y para detectar los marcadores son bien conocidos (p. ej., véase Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.ª edición, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), capítulo 10; los documentos de patente de EE.UU. n.º 5.658.737, 5.656.207, 5.547.842; 5.283.174 y 4.581.333; y el documento de solicitud de patente europea n.º 0 747 706). Los métodos preferidos para marcar una sonda con un compuesto AE fijado a través de un enlazador se han descrito previamente con detalle (p. ej., véase el documento de patente de EE.UU. n.º 5.639.604, véase el ejemplo 8, del mismo).

La amplificación de una secuencia de ácido nucleico seleccionada, o diana, se puede realizar mediante una serie de métodos adecuados. Véase en general Kwoh y col., 1990, Am. Biotechnol. Lab. 8:14 25. Numerosas técnicas de amplificación se han descrito y se pueden adaptar fácilmente a las necesidades particulares de una persona experta en la técnica. Ejemplos no limitativos de las técnicas de amplificación incluyen la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR, RT PCR, RT-PCR en tiempo real, etc.), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), la amplificación basada en la transcripción, el sistema de replicasa de Q $\beta$  y NASBA (Kwoh y col. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 173-1177; Lizardi y col., 1988, Bio Technology 6:1197-1202; Malek y col., 1994, Methods Mol. Biol., 28:253-260; y Sambrook y col., 2000, véase más arriba). Otros ejemplos no limitativos de los métodos de amplificación se han enumerado anteriormente.

Ejemplos no limitativos de métodos adecuados para detectar la presencia de los productos amplificados incluyen los siguientes: gel de agarosa o de poliacrilamida, adición de colorante para marcar ADN en la reacción de amplificación (tal como bromuro de etidio, Picogreen<sup>®</sup>, SYBER Green, etc.) y la detección con un aparato adecuado (fluorímetro en la mayoría de los casos). Otros métodos adecuados incluyen la reacción de secuenciación (manual o automatizada); análisis de restricción (se construyeron sitios de restricción estipulados en las secuencias amplificadas), o cualquier método que implique la hibridación con una sonda específica de la secuencia (transferencia de tipo Southern o Northern, sondas TaqMan, moléculas fluorescentes, y similares). Por supuesto, en la presente invención están incluidos otros métodos de amplificación. Las moléculas fluorescentes se ejemplifican en esta memoria como un método para detectar los productos amplificados según la presente invención (véase más abajo).

Por supuesto, en algunas realizaciones, la detección directa (p. ej., la secuenciación) de secuencias de PCA3 específicas del cáncer, así como de otro marcador específico de la próstata (p. ej., PSA), en una muestra se puede realizar con sondas o cebadores específicos.

En una realización, la presente invención se ha aprovechado de avances tecnológicos en los métodos para detectar e identificar ácidos nucleicos. Por lo tanto, la presente invención es adecuada para la detección a través de una de estas herramientas, llamadas moléculas fluorescentes.

Las moléculas fluorescentes son sondas/cebadores monocatenarios para la hibridación de oligonucleótidos monocatenarios que forman una estructura de horquilla. El bucle contiene una secuencia de la sonda que es complementaria a una secuencia diana, y el vástago está formado por la reasociación de las secuencias del brazo complementarias que están localizadas a cada lado de la secuencia de la sonda/del cebador. Un fluoróforo está unido covalente al extremo de un brazo y un inhibidor de la fluorescencia está unido covalente al extremo del otro brazo. Las moléculas fluorescentes no despiden luz fluorescente cuando están libres en la solución. Sin embargo, cuando se hibridan con una cadena de ácido nucleico que contiene una secuencia diana, experimentan un cambio conformacional que les permite emitir luz fluorescente brillante (véanse los documentos de patente estadounidense 5.925.517 y 6.037.130). Las moléculas fluorescentes se pueden utilizar como sondas/cebadores detectores de un amplicón en pruebas de diagnóstico. Debido a que las moléculas fluorescentes no hibridadas son oscuras, no es necesario aislar los híbridos entre sonda y diana para determinar, por ejemplo, el número de amplicones sintetizados durante un ensayo. Por lo tanto, las moléculas fluorescentes simplifican las manipulaciones que se requieren frecuentemente cuando se emplean medios de detección y de identificación tradicionales.

Con el uso de diferentes fluoróforos coloreados, las moléculas fluorescentes también se pueden utilizar en ensayos de amplificación en formato múltiple, tales como ensayos que buscan la amplificación y la detección simultáneas del ácido nucleico de PCA3 y del segundo ácido nucleico específico de la próstata (p. ej., PSA, [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada M27274, SEQ ID n.º 38], hK2/KLK2 [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada NM005551], PSMA [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC025672], transglutaminasa 4 [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC007003], fosfatasa ácida [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada BC016344], y PCGEM1 [GenBank<sup>®</sup>, número de entrada AF223389]). El diseño de las sondas/cebadores de las moléculas fluorescentes es bien conocido en la técnica y los programas de ordenador que ayudan a su diseño están disponibles comercialmente (p. ej., diseñador de moléculas fluorescentes de Premier Biosoft International). Las sondas/cebadores de las moléculas fluorescentes se pueden utilizar en diferentes ensayos de hibridación y de amplificación (p. ej., NASBA y PCR).

De acuerdo con una realización de la presente invención, el producto amplificado se puede detectar directamente con moléculas fluorescentes como cebadores para el ensayo de amplificación (p. ej., ensayos NASBA o PCR en formato múltiple en tiempo real), o indirectamente con una sonda de molécula fluorescente que está entre los sitios de unión de la pareja de cebadores, con una longitud de 18 a 25 nucleótidos (p. ej., 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) que se hibrida específicamente con el producto de la amplificación. Se prefieren las sondas o los cebadores de las moléculas fluorescentes que tienen una longitud comprendida entre 18 y 25 nucleótidos cuando se utilizan según la presente invención (Tyagi y col., 1996, Nature Biotechnol. 14:303-308). Los fragmentos más pequeños podrían dar como resultado una señal menos fluorescente, mientras que los fragmentos más largos frecuentemente no incrementan significativamente la señal. Por supuesto, se podrían emplear también sondas y cebadores más cortos o más largos.

Más abajo, en las Tablas 2-4, se muestran ejemplos de cebadores del ácido nucleico que se pueden obtener a partir de las secuencias de ARN de PCA3.

A continuación se muestran ejemplos de cebadores del ácido nucleico que se pueden obtener a partir de las secuencias de ARN de PSA (p. ej., SEQ ID NO:11). Otros cebadores de la presente invención se pueden obtener a partir de PSA. Por supuesto, también se pueden utilizar otras variantes bien conocidas en la técnica (documentos de

patente estadounidense n.º 6.479.263 y 5.674.682) como segundo marcador específico de la próstata. Debido a las similitudes estructurales y de la secuencia del gen de PSA con otros miembros de la familia del gen de la calicreína, la selección apropiada de secuencias de PSA que pueden servir como sondas o cebadores específicos de PSA es importante para los métodos de amplificación y/o de detección de ácidos nucleicos específicos de PSA. Ejemplos de cebadores adecuados para la amplificación y la detección de PSA, hK2/KLK2, PSMA (p. ej., documento de patente estadounidense 6.551.778) son bien conocidos en la técnica, así como de la transglutaminasa 4, de la fosfatasa ácida y de PCGEM1. En una realización, el oligonucleótido de PSA también se puede hibridar con otros miembros de la familia de la calicreína, tales como la calicreína 2 (hK2/hKLK2). Un ejemplo de un oligonucleótido tal es la SEQ ID n.º 12.

Se debe saber que las secuencias y los tamaños de los cebadores descritos en las Tablas 2-4 son arbitrarios y que se pueden diseñar muchas secuencias distintas y emplearlas de acuerdo con la presente invención.

Aunque la presente invención se puede realizar sin el uso de una sonda que se dirija a las dianas de las secuencias de PCA3, tales como las uniones entre exones de PCA3, de acuerdo con la presente invención, tales sondas pueden añadir una especificidad adicional a los métodos y a los kits de la presente invención. Ejemplos no limitativos de sondas de ácido nucleico específicas que se pueden utilizar en la presente invención (y diseñar basándose en las secuencias de exones mostradas en la Tabla 2), se exponen en la Tabla 3, más abajo.

Generalmente, un cebador en la reacción de amplificación se hibrida específicamente con una secuencia en un primer exón (o un exón secuencia arriba) y el otro cebador utilizado en la reacción de amplificación se hibrida específicamente con una secuencia en un segundo exón (o un exón secuencia abajo), y la sonda se hibrida con una secuencia que abarca la región 3' del primer exón y la región 5' del segundo exón. Es decir, la sonda es específica de una unión exón-exón elegida en una secuencia amplificada que se prepara a partir de un ARN empalmado y cortado de PCA3 que carece por lo menos de un intrón entre las secuencias por delante y por detrás del exón, con las que se hibridan los cebadores. Los cebadores empleados en la amplificación de las secuencias del ARN empalmado y cortado que contienen una unión exón-exón escogida se pueden determinar fácilmente con los métodos convencionales, siempre y cuando la región amplificada con la pareja de cebadores contenga la secuencia de la unión exón-exón o su secuencia complementaria. Cualquier método para la amplificación de ácidos nucleicos se puede utilizar para amplificar la secuencia que contiene la unión exón-exón elegida y los expertos en la materia pueden determinar fácilmente los procedimientos para usar cualquiera entre los muchos métodos de amplificación bien conocidos.

Las sondas que detectan una unión exón-exón elegida pueden estar marcadas con cualquiera de los muchos marcadores que pueden dar como resultado, de forma directa o indirecta, una señal cuando la sonda se hibrida con la secuencia amplificada que contiene la unión exón-exón. Por ejemplo, un marcador puede ser cualquier resto que produzca una señal colorimétrica, luminiscente, fluorescente, radiactiva o enzimática que se pueda detectar con los métodos bien conocidos en la técnica. Una sonda no se tiene que marcar con un resto de marcador si la unión específica de la sonda con el ácido nucleico amplificado que contiene la unión exón-exón da como resultado una señal detectable, tal como, por ejemplo, un impulso eléctrico detectable.

En la Tabla 4 se muestran ejemplos de combinaciones de parejas de cebadores para la amplificación que amplifican la secuencia de ácido nucleico que incluye una unión exón-exón y las realizaciones de algunas secuencias de la sonda para la unión exón-exón. Los expertos en la técnica han de saber que las secuencias de las sondas mostradas más abajo también incluyen las secuencias complementarias de las secuencias mostradas y las secuencias que incluyen cambios insignificantes en las secuencias específicas mostradas (es decir, cambios que no afectan a la capacidad de una sonda para hibridarse específicamente con la secuencia de la unión exón-exón elegida, en las condiciones de hibridación convencionales). Además, aunque las secuencias de la sonda se muestran como secuencias de ADN, los expertos en la técnica habrán de saber que se pueden utilizar como sondas las secuencias de ARN correspondientes o sus secuencias complementarias. De igual forma, los enlaces de la cadena principal de las secuencias de bases de la sonda pueden incluir uno o varios enlaces de ARN, enlaces de ADN, enlaces mixtos de ARN-ADN convencionales, u otros enlaces tales como los enlaces 2'-O-metil o enlaces peptidonucleicos, todos ellos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Tal y como se muestra en la Tabla 4 (primera columna), la unión exón-exón elegida que se va a detectar, puede unir los exones 1 y 2 (exón 1/exón 2), los exones 1 y 3 (exón 1/exón 3), los exones 2 y 3 (exón 2/exón 3) o los exones 3 y 4 (exón 3/exón 4). Las parejas de cebadores son secuencias situadas en dos exones diferentes que flanquean directa o indirectamente la unión exón-exón elegida (Tabla 4, segunda columna). Así, para una unión exón 1/exón 2, las parejas de cebadores son un cebador específico para una secuencia contenida en el exón 1 y otro cebador específico para una secuencia contenida en el exón 2. Pero para detectar una unión exón 2/exón 3 o una unión exón 3/exón 4, las parejas de cebadores se pueden seleccionar entre más de dos exones diferentes (véase más abajo en la columna 2) siempre y cuando la secuencia amplificada contenga la región de la unión exón-exón elegida. Los cebadores del "exón 4" incluyen cebadores específicos para una secuencia contenida en cualquier secuencia de los exones 4a, 4b, 4c o 4d.

Por supuesto, un experto en la técnica habrá de saber que se puede diseñar una variedad de sondas adicionales a partir de la misma región u otras regiones de SEQ ID n.º 1, así como de SEQ ID n.ºs 2 y 38, y otras secuencias de la

presente invención, tanto si se dirijan a la diana de las uniones entre exones como si no. Se habrá de saber que los tamaños de las sondas mostradas en las Tablas 2 y 3 son arbitrarios y que se puede diseñar una variedad de secuencias distintas y emplearlas de acuerdo con la presente invención.

5 Una persona experta en la técnica reconocerá fácilmente que las secuencias de ácido nucleico de la presente invención (p. ej., las sondas y los cebadores) se pueden incorporar en cualquiera de los numerosos formatos establecidos de kits que son bien conocidos en la técnica.

10 En una realización del método descrito anteriormente, una sonda de ácido nucleico se inmoviliza sobre un soporte sólido. Ejemplos de tales soportes sólidos incluyen, pero no están limitados a los mismos, plásticos tales como policarbonato, carbohidratos complejos tales como agarosa y sefarosa, y resinas acrílicas tales como perlas de poliacrilamida y de látex. Las técnicas para acoplar sondas de ácido nucleico a soportes sólidos son bien conocidas en la técnica.

15 Las muestras para ensayo adecuadas para los métodos que escrutan los ácidos nucleicos de la presente invención incluyen, por ejemplo, células o extractos de ácido nucleico de células, o líquidos biológicos (p. ej., orina). La muestra usada en los métodos descritos anteriormente variará basándose en el formato del ensayo, el método de detección y la naturaleza de los tejidos, las células o los extractos que se van a someter a ensayo. Los métodos para preparar extractos de ácido nucleico a partir de células son bien conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para obtener una muestra que sea compatible con el método utilizado. Preferiblemente, la muestra es una muestra de orina. Cuando se emplea una muestra de orina, esta debe contener por lo menos una célula de la próstata para permitir la identificación de los marcadores específicos de la próstata (p. ej., PCA3 y PSA) de la presente invención. De hecho, asumiendo 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, tanto si es orina u otra, debe contener, antes de un tratamiento de la misma, por lo menos una célula de la próstata. Se reconocerá que el número de células en la muestra tendrá impacto sobre la validación del ensayo y sobre el nivel relativo de PCA3 medido (o de PSA o de otro marcador específico de la próstata).

#### 25 ***Kits para la detección del ARNm de PCA3 y de PSA***

También se describe un kit para diagnosticar el cáncer de próstata de una forma que es sensible y específica (es decir, que disminuye el número de falsos positivos). Tal kit comprende generalmente un primer medio de recipiente que tiene dispuesto dentro del mismo por lo menos una sonda o un cebador oligonucleotídico que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica del cáncer de próstata.

30 Se describe que un kit comprende adicionalmente en un segundo medio de recipiente, sondas o cebadores oligonucleotídicos que son específicos de otro marcador específico de la próstata (p. ej., PSA), de tal modo que permite la determinación de una razón, así como la validación de un resultado negativo con PCA3.

35 Se describe que un kit comprende adicionalmente en un segundo medio de recipiente, anticuerpos que son específicos de otro marcador específico de la próstata, con lo que se valida de este modo la presencia de células de la próstata en una muestra.

40 También se describe que este kit comprende una pareja de cebadores que permite la amplificación de PCA3 y por lo menos un marcador específico de la próstata seleccionado entre PSA, hK2/KLK2, PSMA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida y PCGEM1. También se describe que el marcador específico de la próstata es ácido nucleico de PSA o proteína de PSA. Por supuesto, la presente invención también incluye el uso de un tercer marcador específico de la próstata.

Los oligonucleótidos (sondas o cebadores) del kit se pueden utilizar, por ejemplo, en un ensayo de tipo NASBA, PCR o de hibridación. Los ensayos de amplificación se pueden adaptar a la detección en tiempo real de los productos múltiples de la amplificación (es decir, ensayos de amplificación en tiempo real en formato múltiple).

45 También se describe que el kit incluye adicionalmente otros recipientes que comprenden componentes adicionales, tales como un oligonucleótido o cebador adicional y/o uno o varios de los siguientes: tampones, reactantes que se van a utilizar en el ensayo (p. ej., reactantes de lavado, polimerasas, o ácido nucleico o células testigo internos u otros) y reactivos capaces de detectar la presencia de una sonda o de cebadores de ácido nucleico unida. Ejemplos de reactivos de detección incluyen, sin estar limitados a los mismos, sondas radiomarcadas, sondas marcadas enzimáticamente (peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina), y sondas de afinidad marcadas (biotina, avidina o estreptavidina). Por supuesto, la separación o la reunión de los reactantes en el mismo medio de recipiente o en diferentes medios está dictada según los tipos de métodos de extracción, amplificación o hibridación, y los métodos de detección utilizados, así como otros parámetros que incluyen la estabilidad, la necesidad de conservación, etc. Se ha de saber que diferentes permutaciones de los recipientes y de los reactantes anteriores y siguientes también están incluidas en esta memoria. El kit también puede incluir instrucciones en relación con cada uno de los posibles diagnósticos, pronósticos, tratanósticos o uso, correlacionando una razón correspondiente entre el nivel de ARNm de PCA3 y el nivel de ARNm de PSA con un diagnóstico, un pronóstico, un tratanóstico o un uso concretos, así como la información sobre el protocolo experimental que se va a utilizar.

También se describe que los reactivos de detección son sondas de moléculas fluorescentes que se hibridan específicamente con los productos de la amplificación. También se describe que los reactivos de detección son compuestos quimioluminiscentes tales como éster de acridinio (AE).

5 Por ejemplo, un kit dividido en compartimentos de acuerdo con la presente descripción incluye cualquier kit en el que los reactivos están contenidos en recipientes separados. Tales recipientes incluyen recipientes pequeños de vidrio,  
 10 tiras de plástico o de papel. Tales recipientes permiten la transferencia eficaz de los reactivos desde un compartimento hasta otro compartimento, de tal modo que las muestras y los reactivos no se contaminan entre sí y los agentes o las soluciones de cada recipiente se pueden añadir de forma cuantitativa desde un compartimento a otro. Tales recipientes incluirán un recipiente que aceptará la muestra problema (p. ej., un extracto de ARN  
 15 procedente de una muestra biológica o de células), un recipiente que contiene los cebadores utilizados en el ensayo, recipientes que contienen enzimas, recipientes que contienen reactivos de lavado y recipientes que contienen los reactivos utilizados para detectar los productos de la extensión. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la separación o la combinación de los reactivos puede estar adaptada por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención, según el tipo de kit que se prefiera (p. ej., un kit para diagnóstico basado en métodos de  
 20 amplificación o de hibridación, o en ambos), los tipos de reactivos utilizados y su estabilidad, u otras propiedades intrínsecas. Un recipiente puede contener los reactivos para amplificación y un recipiente separado contiene el reactivo para detección. En otra realización, los reactivos para amplificación y para detección están contenidos en el mismo recipiente.

20 Los kits también contienen oligonucleótidos que sirven como oligómeros de captura para purificar los ácidos nucleicos diana desde una muestra. Los ejemplos de oligómeros de captura tienen secuencias de por lo menos 15 nucleótidos complementarios a una porción del ácido nucleico diana de PCA3. Los oligómeros de captura pueden tener bases adicionales fijadas en un extremo 3' o 5' de la secuencia que es complementaria a la secuencia diana de PCA3, que puede actuar funcionalmente en una etapa de la hibridación para capturar el ácido nucleico diana. Tales  
 25 secuencias adicionales son preferentemente una secuencia de cola homopolimérica, tal como una secuencia poli-A o poli-T, aunque otras realizaciones de secuencias de cola están incluidas en los oligómeros de captura de la presente invención. La proteína de unión al casquete (p. ej., eIF4G-4E) o una parte de la misma, se puede utilizar para capturar los ARNm que contienen la estructura de casquete (Eder y col., 1987, Gene 74(2):517-525). También se puede emplear un reactivo de captura inespecífico (p. ej., perlas de sílice).

30 Los kits útiles para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención pueden incluir los que incluyan cualquiera de los oligonucleótidos de la amplificación y/o de la sonda de detección descritos en esta memoria, que se envasan de forma combinada entre sí. Los kits también pueden incluir oligómeros de captura para purificar el ácido nucleico diana de PCA3 procedente de una muestra, cuyos oligómeros de captura pueden estar envasados junto con los oligonucleótidos de la amplificación y/o las sondas de detección. Finalmente, los kits pueden incluir  
 35 adicionalmente instrucciones para la puesta en práctica de los métodos de la presente invención para diagnóstico, tratamiento y/o pronóstico. Tales instrucciones se pueden referir a detalles relacionados con el protocolo experimental, así como con los valores umbrales que se pueden utilizar.

40 En otra realización, las células contenidas en muestras de orina de micción obtenidas después de una exploración rectal digital cuidadosa se recogieron y se lisaron en un tampón de lisis. Se extrajeron los ácidos nucleicos (p. ej., a partir del material lisado mediante extracción en fase sólida sobre lechos de sílice, por ejemplo). La detección de la presencia de ARN codificado por el gen de PCA3 en el extracto de ácido nucleico se realiza mediante una amplificación específica *in vitro* del ARN, acoplada con una detección en tiempo real de productos amplificados mediante las sondas específicas fluorescentes. En este método, simultáneamente a la amplificación del ARN de PCA3 específico del cáncer de próstata, tiene lugar la amplificación del segundo marcador específico de la próstata (tal como el ARN de PSA) como testigo para estudiar la presencia de orina de células de la próstata en la muestra.

45 Los métodos de detección y de diagnóstico de la invención no requieren que se detecte la secuencia completa del ARN de PCA3. Solamente es necesario detectar un fragmento o una longitud de ácido nucleico que sea suficiente para detectar la presencia del ácido nucleico de PCA3 procedente de una persona normal o afectada, la ausencia de tal ácido nucleico o una estructura alterada de tal ácido nucleico (tal como un patrón de corte y empalme aberrante). Para este fin, se emplea cualquiera de las sondas o los cebadores que se han descrito anteriormente, y se pueden  
 50 diseñar muchos más tal y como se conoce convencionalmente en la técnica, basándose en las secuencias descritas en esta memoria y en otras conocidas en la técnica.

Se ha de saber que aunque la discusión que viene a continuación se dirige específicamente a los pacientes humanos, las enseñanzas también se pueden aplicar a cualquier animal que exprese PCA3.

55 El método de la presente invención también se puede utilizar para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en los pacientes, tal y como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se ilustra con mayor detalle con los siguientes ejemplos no limitativos. Los ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración y no se deben interpretar como una limitación del alcance de la invención.

**Ejemplo 1****LAS RAZONES ENTRE LOS ARNm DE PCA3 Y PSA SE CORRELACIONAN CON EL GRADO HISTOLÓGICO EN LA BIOPSIA**

5 Para determinar si la razón entre el nivel de expresión de PCA y PSA sería una buena herramienta para el pronóstico y el tratamiento, se realizó un estudio en ~150 pacientes que presentaban niveles elevados de PSA en suero (>3 ng/ml), como una indicación para la biopsia guiada con ultrasonidos y la determinación histológica de la presencia/ausencia de cáncer. Los pacientes recibieron la información del estudio y se requirió su consentimiento por escrito para entrar a formar parte del estudio. El cáncer se identificó y se confirmó en 49 pacientes mediante biopsia guiada y análisis del grado histológico. El número de eventos, con histología en el área de GS (del inglés, "Gleason score"), se considera ahora la más difícil para determinar la agresividad biológica (38 casos con una GS de la biopsia de 6 y 7).

15 En los sedimentos urinarios, después de una DRE extensa, la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA fue evaluada para determinar si esta razón se podía correlacionar con la agresividad biológica. Los niveles del ARNm de PSA eran utilizados para normalizar el ensayo, para corregir el número total de células nuevas de la próstata en la muestra.

20 En la Figura 3, la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA se compara con el grado histológico. Hay una correlación clara entre la puntuación de Gleason y el nivel de las razones entre los ARNm de PCA3 y PSA entre GS 5 y 8. El valor medio de la razón PCA3/PSA en caso de Gleason IV y V es 41, en caso de Gleason VI es 163, en caso de Gleason VII es 193 y en caso de Gleason VIII es 577 (Figura 3). Obsérvese que en los tres casos de GS 9, parece que hay una disminución.

25 La "distribución" de los grados de Gleason en los casos en los que el ensayo era positivo ("verdadero positivo") y en los que el ensayo era negativo ("falso negativo") se analizó a continuación (Figura 4). Los resultados muestran que el ensayo de la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA con el uso de los sedimentos urinarios después de una DRE extensa es significativamente más positivo en los cánceres de grado alto. Este estudio corrobora la hipótesis de que las razones entre el ARNm de PCA3 y PSA sirven como un factor pronóstico.

**Ejemplo 2****EI ANÁLISIS BASADO EN EL GEN DE PCA3 DE SEDIMENTOS URINARIOS TIENE VALOR PRONÓSTICO**

30 Una cohorte nueva de aproximadamente 300 pacientes con niveles séricos elevados (>3 ng/ml) fueron sometidos a ensayo tal y como en el ejemplo 1. Los pacientes recibieron la información del estudio y se requirió su consentimiento informado firmado para poder entrar a formar parte del estudio. Para la determinación histológica, se realizó una biopsia guiada por ultrasonidos para estudiar la presencia o la ausencia de cáncer. El cáncer se identificó en 108 pacientes mediante la evaluación histopatológica de las biopsias. Comparamos la histología con la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA obtenida inmediatamente antes de las biopsias.

35 Tal y como se observa en las Figuras 5 y 6, se observó una correlación clara entre la puntuación de Gleason (suma) y el valor de las razones entre el ARNm de PCA3 y PSA. Posteriormente, se analizó la distribución de los grados de Gleason en los casos en los que el ensayo era positivo/verdadero positivo y en los que el ensayo era negativo. La sensibilidad por grado se proporciona con un umbral de  $132 \times 10^{-3}$ . La sensibilidad para detectar cánceres de grado alto (agresivos) es mayor. Es decir, los falsos negativos tenían un grado significativamente menor que los verdaderos positivos (Figuras 7 y 8).

40 En vista de lo anterior, se puede concluir que la razón PCA3/PSA de sus ARNm, analizada en los sedimentos urinarios después de una DRE extensa, constituye una herramienta poderosa para el tratamiento, el diagnóstico y el pronóstico.

**Ejemplo 3****ANÁLISIS DETALLADO DE LOS PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS Y DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE PCA3**

45 La expresión del gen de PCA3 es específica de la próstata y está fuertemente incrementada en las células del cáncer de próstata en comparación con las células no cancerosas de la próstata. Se ha demostrado con éxito que con el análisis basado en el gen de PCA3 se pueden detectar células del cáncer de próstata en sedimentos urinarios después de una DRE extensa, véase 1 y 2 más arriba. Por lo tanto, PCA3 ha mostrado tener un potencial tremendo para el diagnóstico del cáncer de próstata. Habiéndose demostrado ahora que los tumores más agresivos podrían crecer de una forma más invasiva y difundir más células cancerosas a los conductos prostáticos, también se mostró que el análisis basado en el gen de PCA3 se correlaciona con un aumento de la puntuación de Gleason en las biopsias y, por lo tanto, tiene potencial como parámetro pronóstico (véanse los ejemplos 1 y 2, más arriba). En este análisis del subgrupo, los parámetros histopatológicos de las muestras de la prostatectomía radical estaban correlacionados con los resultados del análisis basado en el gen de PCA3.

55

En un centro clínico, una cohorte de pacientes con cáncer de próstata recibió información y firmó su consentimiento para entrar a formar parte del estudio. 48 de estos pacientes fueron tratados mediante prostatectomía radical. Los parámetros histopatológicos de las muestras de la prostatectomía radical se compararon con la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA en los sedimentos urinarios obtenidos antes de la cirugía. Se compararon todos los parámetros pronósticos.

Ta y como se observa en la Figura 9, se observó una correlación entre el volumen tumoral total en las muestras de la prostatectomía radical y el nivel de la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA.

Por tanto, la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA tiene un valor pronóstico con respecto al volumen tumoral total en los pacientes con cáncer de próstata y, por lo tanto, con el estadio/grado y la agresividad del cáncer de próstata. Al emplear la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA, es también posible no sólo determinar el grado del tumor, sino también evaluar el tamaño del tumor. Como resultado del análisis de la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA, se puede establecer un régimen de tratamiento apropiado adaptado para cada paciente. Además, el uso de la razón entre los ARNm de PCA3 y PSA permite pronosticar más exactamente las consecuencias de la enfermedad.

#### Ejemplo 4

### ENSAYO CUANTITATIVO POR RT-PCR DE LOS ARNm DE PCA3 Y DE PSA

#### *Materiales y Métodos*

#### *Muestras de tejido*

Se obtuvieron muestras procedentes de prostatectomía radical en el hospital Canisius Wilhelmina de Nijmegen y del hospital del Centro Médico Universitario de Nijmegen. Las muestras de próstata normal, de BPH y de tumor de próstata se obtuvieron recién recogidas, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se procesaron en cortes seriados. A intervalos regulares, se realizó una tinción con hematoxilina y eosina para determinar el porcentaje de células normales, de BPH y de células tumorales en los cortes del tejido. Las puntuaciones de Gleason y la clasificación de TNM de estos tumores se determinaron en el departamento de anatomopatología de ambos hospitales. El ARN total se extrajo a partir de estas muestras de tejido con el método de LiCl-urea (22).

#### *Producción del ARN de PCA3 y de IS-PCA3*

El patrón interno (IS-PCA3) se construyó con el sistema de mutagénesis específica de sitio *in vitro* "GeneEditor" (Promega). Tres sustituciones (TCC a CGT) de las posiciones 416 a 418 del ADNc de PCA3 (GenBank® AF103907) se introdujeron en la construcción de ADNc de PCA3 (pMB45). Las mutaciones fueron confirmadas mediante un análisis de la secuencia del ADN.

El ADN plasmídico linealizado de pMB45 y del mutante de pMB45 servían como molde para las reacciones de transcripción *in vitro*, con la polimerasa de ARN de T3 (Roche Diagnostics). Los ARN producidos *in vitro* se trataron con ADNasa-I, se purificaron mediante extracción con fenol, se precipitaron y se disolvieron en agua tratada con pirocarbonato de dietilo. La concentración y la integridad de los ARN se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa con patrones de ARN. Los ARN se almacenaron en partes alícuotas a -70°C.

#### *Reacción de la transcriptasa inversa*

El ARN de PCA3 y el ARN de IS-PCA3 producidos *in vitro*, así como el ARN del tejido, se emplearon como moldes para la síntesis del ADNc con el kit para la síntesis de la primera cadena del ADNc (Amersham Biosciences). Los ARN de PCA3 y de IS-PCA3 se diluyeron en 0,2 mg/ml de ARNt de *E. coli* (Roche Diagnostics) que se había utilizado como solución de arrastre del ARN. Para la preparación de una curva de calibración extensa, se mezclaron  $5 \times 10^3$  copias de ARN de IS-PCA3 con una cantidad variable ( $50$  a  $1 \times 10^7$  copias) del ARN de PCA3. Para la determinación de PCA3 en una muestra de tejido, el ARN total se mezcló con  $5 \times 10^3$  copias del ARN de IS-PCA3. Las mezclas de ARN se calentaron durante 10 minutos a 65°C, seguido de enfriamiento rápido sobre hielo. Al ARN se le añadieron 0,2 µg de cebador universal oligo-d(T)<sub>18</sub>, DTT a 2 mM y 5 µl de una mezcla de reacción a granel de la primera hebra (Amersham Biosciences) con un volumen final de la reacción de 15 µl. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37°C y las muestras de ADNc obtenidas se calentaron durante 5 minutos a 95°C.

#### *Amplificación por PCR*

Para las amplificaciones por PCR se emplearon los cebadores siguientes, específicos de PCA3: directo 5'-TGGAAGGACCTGATGATACA-3' (SEQ ID n.º 40, nucleótidos 97-108 del exón 1 del ADNc de PCA3, GenBank® n.º AF103907) e inverso 5'-CCCAGGGATCTCTGTGCTT-3' (SEQ ID n.º 41, nucleótidos 459-477, que abarca los exones 3 y 4 del ADNc de PCA3). El cebador inverso estaba biotinilado. Se amplificaron 5 µl de la muestra de ADNc en una reacción de PCR de 100 µl que contenía: cebador inverso a 0,133 µM, cebador inverso biotinilado a 0,065 µM, cebador directo a 0,2 µM, trifosfato de desoxinucleótidos a 250 mM (Roche Diagnostics), 2 unidades de polimerasa Super Taq® (HT Biotechnology LTD) en tampón que contenía cloruro de magnesio a 1,5 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3), cloruro potásico a 50 mM y 0,1% de Triton X-100. Sobre las mezclas de reacción se puso una capa

de aceite mineral y se realizó el termociclado en un Thermal Cycler® (PerkinElmer Lifesciences Inc.) del modo siguiente: 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto; seguido por una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

### **Ensayo de hibridación**

5 Los productos de la PCR obtenidos se purificaron con eliminación del aceite mineral. A un pocillo de una placa de microtitulación revestida con estreptavidina (InnoTrac Diagnostics) se añadieron por triplicado 10 µl de cada uno de los productos de la PCR. Se añadieron a cada pocillo 50 µl del tampón de ensayo DELFIA® que contenía NaCl a 1,5 M,. Los productos biotinilados de la PCR fueron capturados en el pocillo revestido con estreptavidina durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación lenta. Las muestras se lavaron tres veces con la solución de lavado de DELFIA®. Los productos bicitenarios de la PCR fueron desnaturalizados con 100 µl de una solución de NaOH a 50 mM durante 5 minutos a temperatura ambiente, con agitación lenta. Las muestras se lavaron tres veces con la solución de lavado de DELFIA® para eliminar las hebras de ADN desnaturalizadas que no estaban unidas. La sonda de detección de PCA3 (30 pg/µl) marcada con Eu<sup>3+</sup> (SEQ ID n.º 42 5'(modC) <sub>20</sub>CACATTTCCAGCCCCT-3') y la sonda de detección de IS-PCA3 (30 pg/µl) marcada con Tb<sup>3+</sup> (SEQ ID n.º 43 5'(modC)<sub>20</sub>CACATTCGTAGCCCCT-3') se añadieron a cada pocillo en solución de tampón de ensayo de DELFIA® que contenía NaCl a 1,5 M y 5 g/l de leche en polvo desnatada. Las sondas de detección se hibridaron con las hebras de ADN capturadas de PCA3 y de IS-PCA3 durante 2,5 horas a 37°C. Las muestras se lavaron seis veces con la solución de lavado de DELFIA® a temperatura ambiente. A continuación, se le añadieron a cada pocillo 200 µl de solución de potenciación de DELFIA®. El Eu<sup>3+</sup> libre forma rápidamente un quelato altamente fluorescente y estable con los componentes de la solución de potenciación de DELFIA® (Eu<sup>3+</sup>). Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación lenta, se hizo un recuento de la señal fluorescente obtenida a partir de los quelatos de Eu<sup>3+</sup> con un contador 1420 Victor® Multilabel. A continuación, se le añadieron 50 µl de una solución de potenciador de DELFIA® (Tb<sup>3+</sup>) a cada pocillo para formar un quelato altamente fluorescente con Tb<sup>3+</sup>. Después de incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, con agitación lenta, se midió la señal fluorescente obtenida a partir de los quelatos de Tb<sup>3+</sup>. Todos los reactantes de DELFIA® y el recuento con el contador 1420 Victor® Multilabel, se obtuvieron de PerkinElmer Life Sciences.

### **Análisis estadístico**

Con el "Paquete estadístico para ciencias sociales" (SPSS), los datos se resumieron en una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) para visualizar la eficacia de PCA3 como marcador. En esta curva la sensibilidad (verdaderos positivos) se representó en el eje Y, frente a 1 – especificidad (falsos positivos) en el eje X. En esta curva, todos los valores observados fueron considerados valores umbrales arbitrarios. El área bajo la curva (AUC) y su intervalo de confianza del 95% (CI) se calcularon como una medida de la eficacia discriminatoria del marcador sometido a ensayo. Si el marcador no tiene un valor discriminatorio, el valor de AUC está próximo a 0,5. En este caso, el AUC estará próximo a la diagonal en la curva. Si un marcador tiene un fuerte poder discriminatorio, la curva ROC estará próxima a la esquina superior izquierda (AUC está próxima a 1).

Las Figuras 2A y B muestran que la razón PCA3/PSA es un marcador potente y validado para el diagnóstico del cáncer de próstata.

### **Ejemplo 5**

#### **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA BASADA EN LA FLUORESCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL DEL ARNm DE PCA3: UNA HERRAMIENTA SENSIBLE PARA EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Para los materiales y los métodos, véase el ejemplo 4.

### **Optimización del ensayo de hibridación**

Los productos biotinilados de la PCR de PCA3 o de IS-PCA3 se utilizaron para optimizar las condiciones de reacción del ensayo de hibridación. Para ambas dianas y sus sondas de hibridación, las mejores señales fluorescentes, con razones elevadas entre la señal y el ruido de fondo, se obtuvieron después de 150 minutos de incubación a 37°C en presencia de NaCl a 1,5 M y 5 g/l leche en polvo desnatada. El cloruro sódico se utilizó para mejorar la hibridación y la función de la leche en polvo desnatada era bloquear la señal de fondo inespecífica. En estas condiciones rigurosas, la mejor eficacia del ensayo de hibridación fue obtenida con 30 pg/µl de cada sonda.

Para verificar la posibilidad de hibridación cruzada entre las dianas y las sondas, se emplearon de  $1 \times 10^2$  hasta  $1 \times 10^7$  moléculas de ARN de PCA3 o de IS-PCA3 como moldes en la RT-PCR. Los productos biotinilados de la PCR se hibridaron a continuación con ambas sondas. Solamente después de la amplificación de  $1 \times 10^6$  moléculas de ARN de IS-PCA3, la sonda de PCA3 mostraba una ligera reactividad cruzada (0,1%) con la diana de IS-PCA3. Bajo estas condiciones optimizadas, la sonda de IS-PCA3 no mostraba una reactividad cruzada detectable con la diana de PCA3. La ligera reactividad cruzada de la sonda de PCA3 es debida a la estabilidad de las bases mal emparejadas. La unión de la sonda de PCA3 a la diana de IS-PCA3 es más estable que la unión de la sonda de IS-PCA3 con la diana de PCA3.

### Amplificación por PCR

La mejor eficacia de la amplificación por PCR se obtuvo con 0,2  $\mu\text{M}$  de cada cebador. Ylikoski (1999) ha mostrado que un gran exceso de cebador inverso biotinilado competía con el producto biotinilado de la PCR por los sitios de unión a la estreptavidina (23). Por lo tanto, se utilizó poca cantidad de cebador inverso biotinilado para evitar una etapa de dilución de los productos de la amplificación antes del ensayo de hibridación y para obtener una detección fiable de los productos de la amplificación. Para una amplificación óptima por PCR, se empleó un cebador inverso sin marcar a 0,133  $\mu\text{M}$ , un cebador inverso biotinilado a 0,065  $\mu\text{M}$ , y un cebador directo a 0,2  $\mu\text{M}$ .

Para determinar la eficacia de la amplificación de las dianas de PCA3 y de IS-PCA3, se amplificaron  $5 \times 10^3$  moléculas del ARN de PCA3 o del ARN de IS-PCA3 mediante RT-PCR con diferente número de ciclos de amplificación. Raeymaekers (1993) mostraba que la eficacia de la PCR se basaba en la ecuación para el crecimiento exponencial:  $\log N_c = \log N_i + c[\log(1 + f)]$ , en donde  $N_c$  es la cantidad de producto generado después de  $c$  ciclos de amplificación,  $N_i$  es la cantidad inicial de diana,  $c$  es el número de ciclos de amplificación y  $f$  es la eficacia de la amplificación (24). Cuando el  $\log N_c$  se representa gráficamente frente al número de ciclos de amplificación, entonces la pendiente de la curva iguala el  $\log(1 + f)$ . Si la eficacia de la amplificación es la misma para las dianas de PCA3 y de IS-PCA3, entonces la pendiente de ambas curvas es la misma. Tanto PCA3 ( $f = 0,63$ ) como IS-PCA3 ( $f = 0,64$ ) se retrotranscribieron y se amplificaron con eficacias idénticas (datos no mostrados). Esto se confirmó cuando se representó gráficamente el logaritmo de la razón PCA3/IS-PCA3 frente al número de ciclos de amplificación. Se generó una línea horizontal que indicaba que la eficacia de la amplificación es la misma para ambas dianas (datos no mostrados).

La sensibilidad y el intervalo analítico del ensayo basado en PCA3 pueden estar afectados por la cantidad de ARN de IS-PCA3 que se añade a cada muestra. Por ejemplo, si la cantidad de patrón interno amplificado con cantidades variables de PCA3 es demasiado alta, no se pueden ampliar lo suficiente cantidades pequeñas de ARN de PCA3 por RT-PCR para generar una señal detectable. Por lo tanto, la sensibilidad de la técnica se vuelve limitada. Lo mismo es válido para la amplificación mediante RT-PCR también de una cantidad demasiado pequeña de ARN de IS-PCA3 en presencia de una concentración elevada de ARN de PCA3. Por lo tanto, la interferencia entre la amplificación de las dianas de PCA3 y de IS-PCA3 se estudió mediante la amplificación con RT-PCR de cantidades variables del ARN de PCA3 con una cantidad constante del ARN de IS-PCA3. Las señales fluorescentes obtenidas para  $5 \times 10^3$  o  $5 \times 10^4$  moléculas de IS-PCA3 seguían siendo constantes después de la coamplificación con  $1 \times 10^2$  hasta  $5 \times 10^5$  moléculas de PCA3. Solamente después de la coamplificación con más de  $1 \times 10^6$  moléculas de PCA3 se redujeron ligeramente las señales fluorescentes de IS-PCA3 y de PCA3 (datos no mostrados). Este fenómeno es debido a la competición de ambas moléculas diana durante la PCR, así como a la fase de saturación de la reacción PCR. Estos datos indican que se pueden emplear ambas concentraciones de IS-PCA3 para la coamplificación de PCA3, para obtener un intervalo lineal amplio para la cuantificación de PCA3. Cuando se coamplificaron cantidades variables de IS-PCA3 con una cantidad constante de PCA3, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados).

### Límite de detección y capacidad de reproducción

Para determinar la sensibilidad y la linealidad de la técnica cuantitativa propuesta por RT-PCR para la detección y la cuantificación del ARN de PCA3, se generó una curva de calibración. Se mezclaron cantidades variables de moléculas de ARN de PCA3 (en el intervalo de 50 hasta  $1 \times 10^7$  moléculas de ARN de PCA3) con  $5 \times 10^3$  copias de ARN de IS-PCA3. Tal y como se ha mostrado antes, ésta era la cantidad menor de IS-PCA3 que permitía un intervalo amplio lineal para la cuantificación de PCA3. Además, se podía evitar la ligera reactividad cruzada (0,1%) de la sonda de PCA3 con más de  $5 \times 10^5$  copias de IS-PCA3 con el uso de esta cantidad de IS-PCA3. La señal de fondo se definió como la señal obtenida cuando no estaba presente el ARN de PCA3 o el ARN de IS-PCA3. El límite de detección de este ensayo cuantitativo por RT-PCR se determinó como dos veces la media de la señal de fondo. En este ensayo cuantitativo por RT-PCR, el límite de detección se correspondía con 50 copias de ARN de PCA3 con 35 ciclos de amplificación por PCR. Puesto que la fase de saturación tenía el mismo efecto sobre ambas dianas (tal y como se ha expuesto anteriormente), se obtuvo una curva de calibración con un intervalo lineal amplio, que se extendía desde 50 hasta  $1 \times 10^7$  moléculas de ARN de PCA3 (datos no mostrados).

La capacidad de reproducción del ensayo por RT-PCR basado en PCA3 se estableció comparando cuatro curvas de calibración independientes. Se prepararon la serie de diluciones de las dianas de PCA3 y de IS-PCA3, la transcripción inversa, los ensayos con PCR y de hibridación de estas cuatro curvas de calibración, y se analizaron con cuatro ensayos independientes. Tal y como se puede concluir por la curva de calibración combinada (datos no mostrados), la capacidad de reproducción global dentro del ensayo es buena con una media de los coeficientes de variación (CV) del 6% (intervalo: 2-25 %).

### Cuantificación de la expresión del ARNm de PCA3 en muestras de tejido

El ensayo descrito de RT-PCR basado en PCA3 se utilizó para evaluar la utilidad potencial de PCA3 como marcador diagnóstico para el cáncer de próstata. La especificidad de PCA3 para la próstata se determinó al medir el número de copias del ARN de PCA3 en el ADNc obtenido a partir de diferentes tejidos normales de mama, vejiga, duodeno, corazón, hígado, pulmón, riñón, próstata, vesícula seminal, piel, estómago, testículos y leucocitos de sangre

periférica. Todas las muestras, excepto la de la próstata, eran negativas para PCA3 (datos no mostrados), lo que concordaba con los datos publicados anteriormente (20;21).

A continuación, se determinó la expresión del ARN de PCA3 en las siguientes muestras de tejido; BPH (n = 8), próstata normal (n = 4), tumor de próstata que contiene un número igual o menor que el 10% de células de cáncer de próstata (n = 13) y tumor de próstata que contiene más del 10% de células de cáncer de próstata (n = 27), para evaluar la utilidad de PCA3 como un marcador tumoral de la próstata. No había diferencia en la expresión del ARN de PCA3 entre el tejido no canceroso de la próstata y el tejido de BPH y, por lo tanto, ambos se incluyeron en el grupo de testigos sin cáncer. En los tumores de próstata que contenían más del 10% de células de cáncer de próstata, la mediana del aumento de la expresión de PCA3 era de 66 veces más (mediana,  $158,4 \times 10^5$ ; intervalo,  $7,0 \times 10^5$  a  $994,0 \times 10^5$ ) comparado con la expresión de PCA3 en testigos sin cáncer (mediana,  $2,4 \times 10^5$ ; intervalo  $0,2 \times 10^5$  a  $10,1 \times 10^5$ ) (Tabla 4). Incluso en los tumores de próstata que contenían menos del 10% de células de cáncer de próstata, el aumento de la expresión de PCA3 era de once veces (mediana,  $25,3 \times 10^5$ ; intervalo  $6,6 \times 10^5$  a  $166,0 \times 10^5$ ), comparado con la expresión en testigos sin cáncer. En 7 muestras humanas de prostatectomía radical, la expresión de PCA3 en las áreas del tumor se comparó con la expresión de PCA3 en tejido de la próstata no neoplásico adyacente, de los mismos pacientes. Con el ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en PCA3, se observó en estos tumores de próstata un aumento de la expresión de PCA3 desde 6 hasta 1500 veces más, comparada con la del tejido no neoplásico adyacente de la próstata (Tabla 6).

Para la determinación de la posible eficacia para el diagnóstico del ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en PCA3, se realizó una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) (datos no mostrados). El área bajo la curva (AUC) era 0,98 (95% de intervalo de confianza, 0,94-1,01), lo que indica que el ensayo basado en PCA3 es muy específico y tiene un fuerte valor de diagnóstico.

### **Discusión**

La RT-PCR es actualmente el método utilizado más ampliamente para la detección de una pequeña cantidad de células neoplásicas en un fondo amplio de células normales. En estos últimos años, los ensayos de RT-PCR se han desarrollado para identificar células del cáncer de próstata a partir del ARNm de PSA y el ARNm de PSMA como las dianas empleadas de forma más habitual en esta técnica (25;26;26-29). Muchos de estos ensayos por RT-PCR eran cualitativos, lo que significa que proporcionaban una información con respecto a la presencia o la ausencia de estas dianas en los productos de la reacción con PCR. Como todos los ensayos por PCR, la RT-PCR es un ensayo extremadamente sensible. Sin embargo, después de la introducción del método de la RT-PCR anidada, los transcritos de PSA y de PSMA también fueron detectados en leucocitos de sangre periférica obtenida de donantes sanos (30; 31). Esto indica que los transcritos basales de los genes específicos de la próstata que podían estar presentes con niveles de fondo bajos, en células que no eran de la próstata, podrían dar como resultado una señal falsa positiva si la sensibilidad de la técnica de RT-PCR llegara a ser demasiado alta. La expresión de fondo de numerosos genes que antes se consideraban específicos del tejido o del tumor ha contribuido al amplio intervalo de sensibilidad y especificidad entre los resultados de los estudios por RT-PCR. Estos resultados contradictorios se pueden atribuir a la falta de uniformidad entre los protocolos utilizados para la RT-PCR. La expresión de fondo de los genes específicos de tejido no invalida su uso clínico. Sin embargo, implica que es necesario el desarrollo de técnicas más cuantitativas de RT-PCR para obtener resultados más reproducibles y fiables.

En la detección y el análisis de los productos de la RT-PCR, la transferencia de tipo Southern seguida de hibridación con sondas de oligonucleótidos radiactivos específicos dominaba el campo de los ensayos de hibridación hace dos décadas. Aunque es sensible, esta técnica es cualitativa y requiere mucho tiempo. En la última década, ha habido una transición hacia alternativas no radiactivas debido a los peligros para la salud y a los problemas asociados con el uso y la eliminación de radioisótopos.

Una de las nuevas tecnologías en el campo de la RT-PCR es la detección en tiempo real por PCR de ácidos nucleicos en un tubo cerrado (32;33). Esta técnica disminuye el riesgo de contaminación y también simplifica el análisis, ya que no se requieren las etapas de hibridación después de la PCR. Por otra parte, se puede analizar simultáneamente una gran cantidad de muestras. El método utilizado de forma más extendida es la generación de una curva de calibración a partir de una serie de diluciones de plásmidos linealizados que contienen el inserto de ADNc de interés. Esta serie de diluciones se amplifica en la misma serie que las muestras. Aunque su uso es muy generalizado, esta estrategia puede tener un impacto sobre la precisión del ensayo. Las muestras de ARN pueden ser más propensas a variaciones en la eficacia de la amplificación, que son debidas a los inhibidores presentes en la muestra retrotranscrita en comparación con la amplificación del ADN plasmídico (34). Debido a la introducción de variaciones principales en la etapa de transcripción inversa, el número de copias obtenidas después de una RT-PCR en tiempo real puede que no refleje el número de copias en la muestra antes de la síntesis del ADNc. El uso de un patrón interno exógeno en la curva de calibración y en las muestras corregirá cualquier diferencia que pueda tener lugar durante la síntesis del ADNc y podría superar este problema. Sin embargo, en los ensayos por PCR en tiempo real no se puede emplear un tal patrón interno competitivo. La diana y el patrón interno competirán por los reactantes de la PCR. Si existe una diferencia superior a diez veces entre la diana y el patrón interno, entonces la especie menos abundante no se amplificará suficientemente para la detección. Esto es debido a que la diana más abundante consumirá la mayoría de los reactantes de la PCR, especialmente los cebadores (34;35). Para corregir estas variaciones de muestra-a-muestra en la PCR en tiempo real, se amplifica tras RT un ARN celular a la vez que

el ARN diana. Los denominados genes de mantenimiento se emplean como patrones internos endógenos y la expresión de estos genes no debe variar en los tejidos o en las células durante la investigación o debido a un tratamiento experimental. Estos ARN se tienen que expresar también casi al mismo nivel que el ARN diana. El número de copias de ARN diana se normaliza a continuación con la expresión del ARN del gen de mantenimiento abundante. Los rARN pueden ser útiles como patrones internos puesto que están generados por una polimerasa distinta (36). Por lo tanto, sus niveles de expresión probablemente no variarán bajo condiciones que afecten a la expresión de los ARN (37). Sin embargo, los rARN se expresan a niveles muy superiores que el ARN diana. Por lo tanto, la normalización del ARN diana poco abundante por el gen de mantenimiento abundante (p. ej., rARN de 18 unidades Svedberg (S)) puede ser difícil. Este rARN 18S es muy abundante comparado con los transcritos del ARNm diana. Esto dificulta la sustracción exacta del valor basal en el análisis de los datos de la RT-PCR en tiempo real (38). Para superar estos problemas, Nurmi desarrolló un patrón interno similar a la diana, no competitivo y exógeno, para un ensayo cuantitativo en tiempo real de PSA (34). Omitiendo el IS del análisis del ARNm de PSA por PCR en tiempo real, se obtuvo como resultado una subestimación de 172 veces la cantidad de ARN de PSA en una muestra. Además, al usar sondas marcadas con lantánido en lugar de las sondas convencionales con TaqMan<sup>®</sup>, eran capaces de detectar dos dianas distintas, incluso cuando la diferencia en sus cantidades de partida es de cien veces. Debido a la razón superior entre señal e interferencia, el límite de detección se pudo incrementar diez veces. Con las sondas y los marcadores normales de TaqMan<sup>®</sup> con caída rápida o abrupta de la fluorescencia, el límite de detección era 1000 copias de ARNm diana, mientras que la detección basada en lantánidos era capaz de detectar 100 copias del ARNm de PSA. Aunque este desarrollo sigue estando en fase de investigación y todavía no hay un instrumental disponible para la PCR en tiempo real para la detección de la fluorescencia resuelta en el tiempo, esta estrategia es una gran mejora de la PCR en tiempo real para cuantificaciones verdaderas de ARNm expresados en poca cantidad.

En una realización, se decidió no emplear la PCR en tiempo real para la cuantificación debido a los problemas descritos anteriormente respecto a la corrección para la preparación de muestra-a-muestra y la cuantificación exacta. Por lo tanto, se desarrolló un ensayo con RT-PCR cuantitativo, basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo para PCA3. Actualmente, la fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) se considera una de las técnicas no radiactivas más sensibles que permiten para distinguir entre la señal fluorescente rápida de corta duración obtenida a partir del fondo de muestras biológicas y el tiempo de extinción de la fluorescencia de larga duración de las sondas de lantánidos. La medición de la señal fluorescente del lantánido no tiene lugar hasta que transcurre un tiempo determinado desde el momento de la excitación. Durante este retardo, la señal fluorescente rápida de breve duración desaparece, lo que explica la alta sensibilidad de esta técnica (39). Ylikoski combinó ambas técnicas en su ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo para PSA (23;40). Esto proporcionó una detección sensible, cuantitativa y lineal del ARNm de PSA en las muestras biológicas. El ensayo cuantitativo descrito por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo para PCA3 se basa en el principio que han utilizado.

Tal y como se ha expuesto anteriormente, el problema más desafiante asociado a la RT-PCR es la determinación de la cantidad de partida del ARN diana. Para la cuantificación de PCA3, una cantidad constante de patrón interno de ARN exógeno se añadió a cada muestra y a cada uno de los calibradores que cubrían el amplio intervalo lineal desde 50 hasta  $1 \times 10^7$  copias del ARN de PCA3. Este IS-PCA3 solamente contenía una diferencia de 3 pb respecto al ARNm de PCA3. El patrón interno se añadió a la muestra antes de la síntesis del ADNc. Por lo tanto, puede corregir variaciones durante el procedimiento completo del ensayo, desde la transcripción inversa hasta la detección de los productos de la amplificación mediante el ensayo de hibridación. Hemos mostrado que ambas dianas se coamplificaron igualmente debido a su semejanza de tamaño y de secuencia. La pequeña diferencia en la secuencia permitió la construcción de dos sondas específicas para la hibridación con la que detectar PCA3 e IS-PCA3. Las condiciones de la hibridación se han optimizado para evitar hibridaciones cruzadas entre las sondas y sus dianas. Hemos mostrado que las dos dianas se detectaron selectivamente con las sondas en el ensayo de hibridación. Las sondas estaban marcadas con dos lantánidos diferentes, europio y terbio. Los picos abruptos de la emisión y los diferentes tiempos de extinción del  $\text{Eu}^{3+}$  y  $\text{Tb}^{3+}$  permiten la detección simultánea de ambos analitos en un pocillo de microtitulación. Para determinar la cantidad de partida del ARNm de PCA3 en una muestra, la razón entre la fluorescencia de PCA3/IS-PCA3 obtenida a partir de la muestra fue comparada con las razones obtenidas a partir de los calibradores. Este ensayo de hibridación basado en TRF con marcador doble, en placas de microtitulación, permite la cuantificación del ARNm de PCA3 en un gran número de muestras, solamente con un conjunto aislado de doce calibradores. Por otra parte, la capacidad de reproducción del ensayo es buena, con una mediana de los coeficientes de variación (CV) del 6% (intervalo 2-25%). Con este método, se pueden detectar hasta 50 copias de PCA3 cuando se coamplifican con cien veces más (5000 copias) de patrón interno. Esto no habría sido posible con la técnica convencional de la PCR en tiempo real, puesto que una diferencia de más de diez veces entre la diana y el patrón interno conduciría a una amplificación insuficiente de las especies menos abundantes. La sensibilidad de esta técnica gana importancia en la determinación del diagnóstico, cuando se tienen que detectar pequeñas cantidades de la secuencia de interés. El método cuantitativo descrito por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo es cuantitativo, más sensible, más rápido y más sencillo que el análisis convencional basado en la transferencia de tipo Southern y la hibridación de la membrana.

El ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo descrito en esta memoria para PCA3 mostraba que PCA3 se expresaba exclusivamente en la próstata. Esto concordaba con los datos publicados

anteriormente (20; 21). Este ensayo cuantitativo por RT-PCR obtuvo valores de AUC-ROC de 0,98 para PCA3. Esto muestra la gran capacidad de discriminación de este transcrito para diferenciar entre tejidos de la próstata cancerosos y no cancerosos. Bussemakers y sus colaboradores encontraron una hiperexpresión de 10-100 veces más de PCA3 en áreas del tumor, comparadas con el tejido de la próstata no neoplásico adyacente, basándose en el análisis de transferencia de tipo Northern. Con este ensayo cuantitativo basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo mostramos que la expresión de PCA3 en áreas tumorales de las muestras de prostatectomía radical de 7 pacientes se incrementaba de 6 a 1500 veces más, comparada con el tejido no neoplásico adyacente de la próstata. En el grupo no compatible de muestras del tejido se observó un aumento de la expresión de PCA3 con una mediana de 66 veces más en los tumores de la próstata que contenían más del 10% de células tumorales. La mediana del incremento de la expresión de PCA3 de 11 veces más en las muestras de tejido de la próstata que contienen menos del 10% de células tumorales indica que el ensayo de PCA3 es capaz de detectar unas pocas células cancerosas en un fondo en el que predominan las células no cancerosas. Estos datos estaban en concordancia con los datos obtenidos a partir del ensayo por PCR en tiempo real desarrollado recientemente (21).

Los datos combinados y el hecho de que PCA3 no se expresa en los leucocitos (presentes frecuentemente en los líquidos corporales) indican que el ensayo cuantitativo por RT-PCR para PCA3 es una gran promesa como herramienta de diagnóstico. Como tal, se podría aplicar en la detección de células cancerosas de la próstata en la sangre, orina o semen obtenidos de pacientes de los que se sospecha que tienen cáncer de próstata. Recientemente, esta hipótesis fue sometida a ensayo por Hessels (Eur. Urol. 2003, véase más arriba) mediante el ensayo molecular descrito en esta memoria para analizar los sedimentos urinarios después de una exploración rectal digital a fondo de la próstata. Los datos combinados mostraban que la determinación cuantitativa de los transcritos de PCA3 en sedimentos urinarios obtenidos después de un masaje exhaustivo de la próstata tiene una especificidad elevada (el 83%) comparada con el PSA del suero (el 20%) para la detección del cáncer de próstata. Por otra parte, el valor predictivo negativo de este ensayo era del 90%. Por lo tanto, tiene un gran potencial en la reducción del número de biopsias.

En esta memoria se ha desarrollado un ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en la fluorescencia, resuelta en el tiempo, muy sensible, con un amplio intervalo de detección lineal desde 50 a  $1 \times 10^7$  copias de PCA3. En este ensayo, el patrón interno exógeno, similar a la diana, controla las variaciones entre muestras procedentes de la síntesis del ADNc para el ensayo de hibridación. Este ensayo ha mostrado que PCA3 puede discriminar enormemente entre los tejidos cancerosos y los no cancerosos de la próstata. Recientemente mostramos que este ensayo cuantitativo por RT-PCR es aplicable a la detección de células de cáncer de próstata en los sedimentos de la orina. Así, los estudios multicéntricos que emplean ensayos con PCA3 validados pueden proporcionar la primera base de la utilidad de los diagnósticos moleculares en la práctica clínica urológica.

La eficacia potencial para el diagnóstico del ensayo basado en PCA3 se determinó midiendo cuantitativamente los transcritos de PCA3 en las muestras de próstata no cancerosas y cancerosas. Antes de la reacción de transcripción inversa, el ARN total obtenido a partir de muestras de tejido de la próstata normal y con cáncer se mezclaron con un patrón interno de ARN exógeno, similar a PCA3. Este patrón interno corrige las variaciones durante todo el procedimiento del ensayo. Después de la coamplificación por RT-PCR de PCA3 y del patrón interno, las muestras se inmovilizaron en pocillos de microtitulación revestidos con estreptavidina. Cada diana se hibridó con una sonda específica, marcada con europio o terbio. La fluorimetría resuelta en el tiempo se utilizó para la medición de estos quelatos de lantánido altamente fluorescentes. La cuantificación de las copias del ARNm de PCA3 en una muestra se determinó a partir de una curva de calibración que cubría el amplio intervalo lineal desde 50 hasta  $1 \times 10^7$  copias de PCA3.

Los tumores de la próstata mostraban un incremento de 66 veces en la expresión de PCA3 (mediana  $158,4 \times 10^5$  copias/ $\mu$ g de ARN del tejido) cuando se comparaban con el tejido benigno de la próstata (mediana  $2,4 \times 10^5$  copias/ $\mu$ g de ARN del tejido). Este aumento de la expresión se encontró en más del 95% de las muestras de cáncer de próstata estudiadas. Los datos presentados en esta memoria revelaban que las muestras de tejido que contenían menos del 10% de células cancerosas se podían discriminar exactamente de las muestras no cancerosas. Por lo tanto, parece factible la detección de una pequeña fracción de células de cáncer de próstata en un fondo de células normales. La eficacia del diagnóstico del ensayo basado en PCA3 se visualizó en una curva de rendimiento diagnóstico. El área bajo la curva de 0,98 (95% de CI: 0,94-1,01) confirmaba el gran poder discriminatorio de este ensayo. El ensayo cuantitativo por RT-PCR para PCA3 descrito es una gran promesa como herramienta para ser utilizada en el pronóstico del cáncer de próstata (y en el diagnóstico).

Recientemente, se ha identificado una variedad de genes específicos de la próstata, tales como el antígeno de la membrana específico de la próstata (PSMA) (12), *NKX3.1* (13), el antígeno de células madre de la próstata (PSCA) (14), el gen 1 inductor del tumor de la próstata (*PTI-1*) (15), *PCGEM-1* (16), *PDEF* (17), *TMPRSS2* (18) y *prostata* (19). Sin embargo, los diagnósticos basados en la expresión de estos genes específicos de la próstata no han sido descritos. Además, el candidato más prometedor para un ensayo de detección para diagnóstico sigue siendo el gen de PCA3 específico de la próstata, puesto que su expresión está restringida a la próstata y la expresión está muy incrementada en más del 95% de los cánceres de próstata primarios (20;21). Para demostrar adicionalmente la utilidad potencial de PCA3 como marcador de diagnóstico para el cáncer de próstata, se desarrolló un ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo (con un patrón interno exógeno y una

curva de calibración externa). La sensibilidad y la especificidad de este ensayo cuantitativo por RT-PCR basado en la fluorescencia resuelta en el tiempo para PCA3 se validaron usando un panel amplio de muestras de próstata normales y cancerosas bien caracterizadas.

- 5 Aunque la presente invención se ha descrito en los párrafos anteriores mediante las realizaciones preferidas de la misma, se puede modificar sin apartarse del espíritu y la naturaleza del sujeto de la invención, tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

**TABLA 2: CEBADORES DEL ÁCIDO NUCLEICO DE PCA3**

| Región del ácido nucleico                                       | Tamaño | Nucleótidos                          | Tamaño | Nucleótidos                             |
|---|--------|--------------------------------------|--------|---|
| <i>Secuencia del exón para la que se obtienen los cebadores</i> |        |                                      |        |   |
| Exón 1  | 98     | 1-98 de SEQ ID NO:1                  | 120    | 1-120 de SEQ ID NO:2                    |
| Exón 2  | 165    | 99-263 de SEQ ID NO:1                | 165    | 121-285 de SEQ ID NO:2                  |
| Exón 3  | 183    | 264-446 de SEQ ID NO:1               | 183    | 286-468 de SEQ ID NO:2                  |
| Exón 4a   | 539    | 447-985 de SEQ ID NO:1               | 539    | 469-1007 de SEQ ID NO:2                 |
| Exón 4b   | 1052   | 986-2037 de SEQ ID NO:1              | 1059   | 1008-2066 de SEQ ID NO:2                |
| Exón 4c   | -      | -                                    | 556    | 2067-2622 de SEQ ID NO:2                |
| Exón 4d   | -      | -                                    | 960    | 2623-3582 de SEQ ID NO:2                |
| <i>Cebadores específicos de la zona de unión del exón</i>       |        |                                      |        |   |
| Unión del exón 1  | 20     | 89-108 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:5)  | 20     | 109-128 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:6)    |
| Unión del exón 2  | 20     | 252-271 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:7) | 20     | 274-293 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:7)    |
| Unión del exón 3  | 20     | 435-454 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:8) | 20     | 457-476 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:8)    |
| Unión del exón 4  | 20     | 974-993 de SEQ ID NO:1 (SEQ ID NO:9) | 20     | 996-1015 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:9)   |
| Unión del exón 5  | -      | -                                    | 20     | 2055-2074 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:10) |
| Unión del exón 6  | -      | -                                    | 20     | 2611-2630 de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:11) |

**TABLA 3: SONDAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE PCA3**

| Tamaño | Nucleótidos         | Secuencia                                | SEQ ID NO: |
|--------|---------------------|--|------------|
| 20     | 1-20 de SEQ ID NO:1 | AGAAGCTGGCATCAGAAAAA                     | 12         |
| 30     | 1-30 de SEQ ID NO:1 | AGAAGCTGGCATCAGAAAAACAGAGGGGAG           | 13         |
| 40     | 1-40 de             | AGAAGCTGGCATCAGAAAAACAGAGGGGAGATTTGTGTGG | 14         |

ES 2 546 193 T3

| Tamaño | Nucleótidos               | Secuencia                                | SEQ ID NO: |
|--------|---------------------------|--|------------|
|        | SEQ ID NO:1               |  |            |
| 20     | 89-108 de<br>SEQ ID NO:1  | TGATACAGAGGAATTACAAC                     | 5          |
| 30     | 257-286 de<br>SEQ ID NO:1 | GGCAGGGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTG           | 15         |
| 20     | 274-293 de<br>SEQ ID NO:1 | AGAAAGGCTGCTGACTTTAC                     | 16         |
| 20     | 1-20 de<br>SEQ ID NO:2    | ACAGAAGAAATAGCAAGTGC                     | 17         |
| 30     | 1-30 de<br>SEQ ID NO:2    | ACAGAAGAAATAGCAAGTGCCGAGAAGCTG           | 18         |
| 40     | 1-40 de<br>SEQ ID NO:2    | ACAGAAGAAATAGCAAGTGCCGAGAAGCTGGCATCAGAAA | 19         |
| 30     | 114-143 de<br>SEQ ID NO:2 | TACAGAGGAATTACAACACATATACTTAGT           | 20         |
| 20     | 284-303 de<br>SEQ ID NO:2 | GGGTGAGAAATAAGAAAGGC                     | 21         |

TABLA 4:

| Zona de unión entre exones detectada | Parejas de cebadores para exones de PCA3 | Sondas de la zona de unión del exón    | SEQ ID NO: |
|--------------------------------------|--|--|------------|
| exón 1/exón 2                        | exón 1 y exón 2                          | GGACCTGATGATACAGAGGAATTAC              | 22         |
| exón 1/exón 2                        | exón 1 y exón 2                          | GAGGAATTACAACAC                        | 23         |
| exón 1/exón 2                        | exón 1 y exón 2                          | GATGATACAGAGGAATTACAACAC               | 24         |
| exón 1/exón 3                        | exón 1 y exón 3                          | GATGATACAGAGGTGAGAAATAAG               | 25         |
| exón 1/exón 3                        | exón 1 y exón 3                          | CAGAGGTGAGAAATAAGAAAGGC                | 26         |
| exón 1/exón 3                        | exón 1 y exón 3                          | GATACAGAGGTGAGAAATAAG                  | 27         |
| exón 1/exón 3                        | exón 1 y exón 3                          | GATACAGAGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGAC     | 28         |
| exón 2/exón 3                        | exón 2 y exón 3 o exón 1 y exón 3        | GGCAGGGGTGAGAAATAAG                    | 29         |
| exón 2/exón 3                        | exón 2 y exón 3 o exón 1 y exón 3        | CTCAATGGCAGGGGTGAG                     | 30         |
| exón 2/exón 3                        | exón 2 y exón 3 o exón 1 y exón 3        | CTCAATGGCAGGGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGAC | 31         |
| exón 3/exón 4                        | exón 3 y exón 4 o exón 1 y exón 4 o      | GGAAGCACAGAGATCCCTGG                   | 8          |

| Zona de unión entre exones detectada | Parejas de cebadores para exones de PCA3            | Sondas de la zona de unión del exón | SEQ ID NO: |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|------------|
|                                      | exón 2 y exón 4                                     |                                     |            |
| exón 3/exón 4                        | exón 3 y exón 4 o exón 1 y exón 4 o exón 2 y exón 4 | GCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGGAG     | 32         |
| exón 3/exón 4                        | exón 3 y exón 4 o exón 1 y exón 4 o exón 2 y exón 4 | GCACAGAGATCCCTGGGAG                 | 33         |
| exón 3/exón 4                        | exón 3 y exón 4 o exón 1 y exón 4 o exón 2 y exón 4 | GCACAGAGGACCCTTCGTG                 | 34         |
| exón 3/exón 4                        | exón 3 y exón 4 o exón 1 y exón 4 o exón 2 y exón 4 | GGAAGCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGG   | 35         |

**TABLA 5. Expresión del ARNm de PCA3 en muestras de próstata normal, de BPH y de tumor de próstata**

| Muestra                       | Patología | % de PCa | Puntuación de Gleason | Copias de ARNm de PCA3/ $\mu$ g de ARN tisular ( $\times 10^5$ ) |
|-------------------------------|-----------|----------|-----------------------|--|
| <i>testigos no cancerosos</i> |           |          |                       |  |
| 198                           | BPH       |          |                       | 0,15   |
| 162                           | BPH       |          |                       | 0,20   |
| 124                           | BPH       |          |                       | 0,34   |
| 153                           | BPH       |          |                       | 0,39   |
| 127                           | BPH       |          |                       | 0,72   |
| 120                           | NPr       |          |                       | 1,79   |
| 669                           | BPH       |          |                       | 3,03   |
| 663                           | NPr       |          |                       | 3,14   |
| 327                           | BPH       |          |                       | 7,12   |
| 234                           | BPH/NPr   |          |                       | 7,39   |
| 674                           | NPr       |          |                       | 7,56   |
| 128                           | Npr       |          |                       | 10,06  |
|                               |           |          | <i>mediana</i>        | 2,41   |
| <hr/>                         |           |          |                       |  |
| <i>≤10% de PCa</i>            |           |          |                       |  |
| 193                           | Tumor     | 5        | 6                     | 6,55   |
| 676                           | Tumor     | 6        | 6                     | 7,23   |
| 328                           | Tumor     | focal    | 6                     | 12,68  |
| 665                           | Tumor     | focal    | 6                     | 14,05  |

ES 2 546 193 T3

| Muestra               | Patología | % de PCa | Puntuación Gleason | Copias de ARNm de PCA3/ $\mu$ g de ARN tisular ( $\times 10^5$ ) |
|-----------------------|-----------|----------|--------------------|--|
| 161                   | Tumor     | focal    | 6                  | 14,07  |
| 238                   | Tumor     | 5        | 7                  | 19,87  |
| 122                   | Tumor     | 1        | 6                  | 25,32  |
| 158                   | Tumor     | 10       | 6                  | 32,01  |
| 668                   | Tumor     | 5        | 6                  | 55,95  |
| 203                   | Tumor     | 5        | 7                  | 60,56  |
| 195                   | Tumor     | focal    | 6                  | 85,88  |
| 661                   | Tumor     | 5        | 6                  | 114,19   |
| 675                   | Tumor     | 10       | 6                  | 165,95   |
| <i>mediana</i>        |           |          |                    | 25,32  |
| <b>&gt;10% de PCa</b> |           |          |                    |  |
| 715                   | Tumor     | 20       | 7                  | 7,02   |
| 126                   | Tumor     | 40       | 6                  | 11,32  |
| 143                   | Tumor     | >10%     | 7                  | 16,30  |
| 707                   | Tumor     | 80       | 5                  | 19,17  |
| 744                   | Tumor     | 30       | 7                  | 34,16  |
| 129                   | Tumor     | 80       | 8                  | 59,12  |
| 121                   | Tumor     | 90       | 8                  | 61,55  |
| 673                   | Tumor     | 90       | 5                  | 62,94  |
| 713                   | Tumor     | 70       | 3                  | 75,62  |
| 29                    | Tumor     | 80       | 5                  | 77,89  |
| 704                   | Tumor     | 85       | 6                  | 89,20  |
| 237                   | Tumor     | 80       | 5                  | 115,58   |
| 667                   | Tumor     | 65       | 6                  | 138,50   |
| 717                   | Tumor     | 40       | 7                  | 158,43   |
| 710                   | Tumor     | 20       | 7                  | 215,89   |
| 48                    | Tumor     | 95       | 10                 | 217,12   |
| 194                   | Tumor     | 80       | 6                  | 221,17   |
| 147                   | Tumor     | >10%     | 6                  | 249,99   |
| 118                   | Tumor     | 67       | 8                  | 264,77   |
| 709                   | Tumor     | 30       | 6                  | 270,77   |
| 664                   | Tumor     | 60       | 8                  | 296,48   |
| 163                   | Tumor     | 90       | 6                  | 297,25   |

| Muestra        | Patología | % de PCa | Puntuación Gleason | Copias de ARNm de PCA3/ $\mu$ g de ARN tisular ( $\times 10^5$ ) |
|----------------|-----------|----------|--------------------|--|
| 145            | Tumor     | >10%     | 7                  | 305,98   |
| 662            | Tumor     | 70       | 6                  | 487,88   |
| 666            | Tumor     | 60       | 5                  | 536,21   |
| 141            | Tumor     | >10%     | 7                  | 663,86   |
| 235            | Tumor     | 80       | 7                  | 993,99   |
| <i>mediana</i> |           |          |                    | 158,43   |

BPH: Hiperplasia prostática benigna

PCa: cáncer de próstata

NPr: próstata normal

**TABLA 6. Comparación de la expresión del ARNm de PCA3 entre la próstata no cancerosa y el tejido tumoral de próstata del mismo paciente**

| Código de la muestra |     |     | Copias de ARNm de PCA3/ $\mu$ g de ARN de tejido ( $\times 10^4$ ) |      | Razón T/N |
|----------------------|-----|-----|--|------|-----------|
| Paciente             | NPr | Pca | NPr  | PCa  |           |
| 1                    | 128 | 129 | 100  | 590  | 6         |
| 2                    | 674 | 673 | 76   | 630  | 8         |
| 3                    | 127 | 126 | 7  | 113  | 16        |
| 4                    | 663 | 664 | 31   | 2965 | 96        |
| 5                    | 234 | 235 | 74   | 9940 | 134       |
| 6                    | 120 | 118 | 18   | 2648 | 147       |
| 7                    | 162 | 163 | 2  | 2973 | 1487      |

*NPr: tejido de próstata normal*  
*PCa: tejido de tumor de próstata*

5 **TABLA 7**

| Paciente | PSA  | ARN  | PCA3 | PSA   | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico        | PA RRP | RRP conclusión |
|----------|------|------|------|-------|-------|---------------|--------------------|--------|----------------|
| 1        | 4,23 | 946  | 974  | 12054 | 81    | T03-11049     | ausencia de cáncer |        |                |
| 87       | 6,68 | 1076 | 118  | 33359 | 4     | T04-00507     | ausencia de cáncer |        |                |
| 137      |      | 1166 | 211  | 5272  | 40    | T03-05862     | ausencia de cáncer |        |                |
| 164      | 4,6  | 1216 | 0    | 23003 | 0     | T04-04972     | ausencia de cáncer |        |                |

ES 2 546 193 T3

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3  | PSA   | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico        | PA RRP | RRP conclusión |
|----------|-------|------|-------|-------|-------|---------------|--------------------|--------|----------------|
| 92       | 4,41  | 1081 | 82    | 936   | 87    | T04-00521     | ausencia de cáncer |        |                |
| 150      | 4,83  | 1184 | 68    | 151   | 451   | T04-04416     | ausencia de cáncer |        |                |
| 178      | 3,52  | 1242 | 0     | 9387  | 0     | T04-05581     | ausencia de cáncer |        |                |
| 118      | 6,07  | 1119 | 0     | 884   | 0     | T04-01860     | ausencia de cáncer |        |                |
| 196      | 7,91  | 1272 | 166   | 986   | 168   | T04-07086     | ausencia de cáncer |        |                |
| 11       |       | 923  | 168   | 1408  | 119   | T03-09658     | ausencia de cáncer |        |                |
| 11       |       | 926  | 166   | 16799 | 10    | T03-09658     | ausencia de cáncer |        |                |
| 12       | 23,28 | 1105 | 177   | 10414 | 17    | T04-00849     | ausencia de cáncer |        |                |
| 13       | 4,7   | 988  | 0     | 2926  | 0     | T03-12238     | ausencia de cáncer |        |                |
| 77       | 6,9   | 1050 | 133   | 3696  | 36    | T03-14332     | ausencia de cáncer |        |                |
| 113      |       | 1114 | 122   | 277   | 441   | T03-03241     | ausencia de cáncer |        |                |
| 14       | 5,9   | 997  | 23729 | 21318 | 1113  | T03-12798     | ausencia de cáncer |        |                |
| 127      | 4,92  | 1153 | 58    | 6128  | 9     | T04-04409     | ausencia de cáncer |        |                |
| 15       | 6,9   | 935  | 1239  | 13184 | 94    | T03-09653     | ausencia de cáncer |        |                |
| 151      | 5,1   | 1188 | 988   | 1580  | 625   | T04-05305     | ausencia de cáncer |        |                |
| 16       | 4,44  | 919  | 557   | 1888  | 295   | T03-09660     | ausencia de cáncer |        |                |
| 16       | 2,2   | 1276 | 128   | 635   | 202   | T03-09660     | ausencia de cáncer |        |                |
| 17       | 7,6   | 925  | 143   | 1333  | 107   | T03-09656     | ausencia de cáncer |        |                |
| 139      | 9,55  | 1169 | 98    | 1930  | 51    | T03-08073     | ausencia de cáncer |        |                |
| 18       | 26,8  | 985  | 177   | 2632  | 67    | T03-12252     | ausencia de cáncer |        |                |
| 68       | 17,9  | 1018 | 185   | 3008  | 62    | T03-14038     | ausencia de cáncer |        |                |
| 68       | 13,82 | 1044 | 267   | 5614  | 48    | T03-14038     | ausencia de cáncer |        |                |

ES 2 546 193 T3

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3 | PSA   | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico        | PA RRP | RRP conclusión |
|----------|-------|------|------|-------|-------|---------------|--------------------|--------|----------------|
| 112      | 7,17  | 1113 | 2145 | 10119 | 212   | T04-00842     | ausencia de cáncer |        |                |
| 111      | 9,46  | 1112 | 0    | 712   | 0     | T04-01175     | ausencia de cáncer |        |                |
| 200      | 17,7  | 1256 | 0    | 1318  | 0     | T04-06474     | ausencia de cáncer |        |                |
| 129      | 1,08  | 1158 | 0    | 1396  | 0     | T04-02170     | ausencia de cáncer |        |                |
| 149      | 8,1   | 1195 | 295  | 4992  | 59    | T04-03473     | ausencia de cáncer |        |                |
| 130      | 32    | 1159 | 78   | 1536  | 51    | T04-04418     | ausencia de cáncer |        |                |
| 97       | 7,86  | 1068 | 901  | 7204  | 125   | T03-12795     | ausencia de cáncer |        |                |
| 62       | 8,55  | 1010 | 0    | 1840  | 0     | T03-13081     | ausencia de cáncer |        |                |
| 20       | 0,93  | 942  | 1008 | 1960  | 518   | T03-10730     | ausencia de cáncer |        |                |
| 21       | 10    | 991  | 223  | 17451 | 13    | T03-04605     | ausencia de cáncer |        |                |
| 140      | 49,57 | 1170 | 283  | 5439  | 52    | T03-03313     | ausencia de cáncer |        |                |
| 23       | 5,68  | 992  | 0    | 3631  | 0     | T03-12531     | ausencia de cáncer |        |                |
| 26       | 1,19  | 989  | 922  | 19742 | 47    | T03-11915     | ausencia de cáncer |        |                |
| 27       | 5,4   | 960  | 222  | 1531  | 145   | T03-11915     | ausencia de cáncer |        |                |
| 29       | 5,41  | 993  | 102  | 11858 | 9     | T03-12533     | ausencia de cáncer |        |                |
| 31       | 6,71  | 940  | 4703 | 39511 | 120   | T03-10448     | ausencia de cáncer |        |                |
| 73       | 7,5   | 1024 | 372  | 20984 | 18    | T03-14028     | ausencia de cáncer |        |                |
| 76       | 8,35  | 1043 | 62   | 369   | 168   | T03-14034     | ausencia de cáncer |        |                |
| 198      | 6,74  | 1274 | 234  | 3066  | 76    | T04-06256     | ausencia de cáncer |        |                |
| 132      | 10,35 | 1161 | 121  | 1360  | 89    | T04-02172     | ausencia de cáncer |        |                |
| 64       | 14,14 | 1014 | 204  | 706   | 289   | T04-04966     | ausencia de cáncer |        |                |
| 64       | 14,14 | 1217 | 552  | 24878 | 22    | T04-04966     | ausencia de cáncer |        |                |

ES 2 546 193 T3

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3 | PSA   | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico        | PA RRP | RRP conclusión |
|----------|-------|------|------|-------|-------|---------------|--------------------|--------|----------------|
| 64       | 14,14 | 1244 | 1011 | 18431 | 55    | T04-05575     | ausencia de cáncer |        |                |
| 133      | 10,85 | 1162 | 7392 | 56456 | 131   | T04-02178     | ausencia de cáncer |        |                |
| 133      | 22,6  | 1167 | 2580 | 12569 | 205   | T04-02178     | ausencia de cáncer |        |                |
| 104      | 6,41  | 1104 | 780  | 1884  | 414   | T04-00851     | ausencia de cáncer |        |                |
| 33       | 11,3  | 938  | 0    | 1413  | 0     | T03-10446     | ausencia de cáncer |        |                |
| 93       | 7,18  | 1082 | 1824 | 6645  | 274   | T04-00518     | ausencia de cáncer |        |                |
| 110      | 8,12  | 1111 | 0    | 1686  | 0     | T04-01183     | ausencia de cáncer |        |                |
| 157      | 3,36  | 1209 | 0    | 23685 | 0     | T04-04650     | ausencia de cáncer |        |                |
| 119      | 11,74 | 1120 | 253  | 3352  | 75    | T04-01539     | ausencia de cáncer |        |                |
| 134      | 13,02 | 1163 | 1042 | 23137 | 45    | T04-02176     | ausencia de cáncer |        |                |
| 170      | 5,04  | 1225 | 107  | 5682  | 19    | T04-04646     | ausencia de cáncer |        |                |
| 82       | 5,07  | 1046 | 1048 | 1719  | 610   | T03-14338     | ausencia de cáncer |        |                |
| 59       | 4,79  | 1006 | 6989 | 37995 | 184   | T03-13078     | ausencia de cáncer |        |                |
| 182      | 6,8   | 1238 | 477  | 34720 | 14    | T04-05369     | ausencia de cáncer |        |                |
| 96       | 5,3   | 1071 | 4336 | 66786 | 65    | T03-13415     | ausencia de cáncer |        |                |
| 181      | 4,95  | 1239 | 0    | 10403 | 0     | T4-05302      | ausencia de cáncer |        |                |
| 98       | 5,57  | 1098 | 58   | 1293  | 44    | T04-00820     | ausencia de cáncer |        |                |
| 194      | 4,18  | 1270 | 120  | 14280 | 8     | T04-6754      | ausencia de cáncer |        |                |
| 201      | 4,8   | 1257 | 639  | 25343 | 25    | T03-14641     | ausencia de cáncer |        |                |
| 103      | 7,73  | 1103 | 0    | 550   | 0     | T04-00846     | ausencia de cáncer |        |                |
| 101      |       | 1277 | 0    | 505   | 0     | T03-14040     | ausencia de cáncer |        |                |
| 126      | 10,76 | 1152 | 0    | 11523 | 0     | T04-01855     | ausencia de cáncer |        |                |

ES 2 546 193 T3

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3  | PSA   | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico        | PA RRP        | RRP conclusión |
|----------|-------|------|-------|-------|-------|---------------|--------------------|---------------|----------------|
| 46       | 12,91 | 983  | 235   | 14462 | 16    | T03-14639     | ausencia de cáncer |               |                |
| 47       | 13,9  | 944  | 7509  | 32691 | 230   | T03-13435     | ausencia de cáncer |               |                |
| 163      | 5,99  | 1215 | 0     | 41990 | 0     | T04-04968     | ausencia de cáncer |               |                |
| 147      | 16    | 1181 | 487   | 14526 | 34    | T04-04422     | ausencia de cáncer |               |                |
| 191      | 6,6   | 1267 | 511   | 2740  | 186   | T04-00267     | ausencia de cáncer |               |                |
| 171      | 6,82  | 1226 | 512   | 2647  | 193   | T04-04643     | ausencia de cáncer |               |                |
| 123      | 24    | 1138 | 0     | 8052  | 0     | T04-03121     | ausencia de cáncer |               |                |
| 50       | 5,17  | 941  | 780   | 7358  | 107   | T03-10732     | ausencia de cáncer |               |                |
| 52       |       | 996  | 609   | 17412 | 35    | T03-12800     | ausencia de cáncer |               |                |
| 80       | 3,53  | 1048 | 352   | 8416  | 42    | T03-14330     | ausencia de cáncer |               |                |
| 55       |       | 984  | 73    | 3419  | 21    | T03-13126     | ausencia de cáncer |               |                |
| 174      | 10,38 | 1230 | 960   | 22230 | 43    | T04-04407     | ausencia de cáncer |               |                |
| 70       |       | 1021 | 93    | 98251 | 1     | T03-13720     | ausencia de cáncer |               |                |
| 56       | 29    | 982  | 0     | 940   | 0     | T03-14334     | ausencia de cáncer |               |                |
| 56       | 29,08 | 1005 | 82    | 471   | 174   | T04-04413     | ausencia de cáncer |               |                |
| 75       | 8,68  | 1026 | 115   | 3118  | 37    | T03-14030     | ausencia de cáncer |               |                |
| 136      | 4,8   | 1165 | 0     | 22843 | 0     | T04-02788     | ausencia de cáncer |               |                |
| 193      | 4,21  | 1269 | 284   | 15158 | 19    | T04-06729     | Gleason 6          |               |                |
| 4        | 5     | 998  | 13549 | 37999 | 357   | T04-06172     | Gleason 7          | Gleason 4+3=7 | pT2AN0R1       |
| 190      | 12,02 | 1265 | 55    | 845   | 65    | T04-06728     | Gleason 7          |               |                |
| 186      | 4,94  | 1261 | 48    | 129   | 372   | T04-06470     | Gleason 6          |               |                |
| 8        |       | 947  | 252   | 635   | 397   |               | Gleason 5          |               |                |
| 122      | 6,24  | 1123 | 366   | 430   | 852   | T04-01537     | Gleason 6          | Gleason 3+3=6 | pT2BN0R1       |

ES 2 546 193 T3

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3   | PSA    | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico | PA RRP        | RRP conclusión |
|----------|-------|------|--------|--------|-------|---------------|-------------|---------------|----------------|
| 9        | 6,25  | 932  |        |        | 136   | T03-10189     | Gleason 6   |               |                |
| 9        | 6,25  | 932  | 2141   | 8222   | 260   | T03-10189     | Gleason 6   |               |                |
| 91       | 4,49  | 1078 | 401    | 1689   | 237   | T04-00510     | Gleason 6   |               |                |
| 66       | 5,3   | 1016 | 534    | 6623   | 81    | T03-13432     | Gleason 6   | Gleason 3+3=6 | pT2AN0R0       |
| 63       | 30,4  | 1012 | 1640   | 3781   | 434   | T03-13436     | Gleason 7   |               |                |
| 166      | 6,42  | 1221 | 116    | 6178   | 19    | T04-04967     | Gleason 6   |               |                |
| 19       | 62    | 933  |        |        | 222   | T03-09755     | Gleason 8   | Gleason 4+4=8 | pT4N1          |
| 19       | 62    | 933  | 392329 | 704960 | 577   | T03-09755     | Gleason 8   | Gleason 4+4=8 | pT4N1          |
| 65       | 4,23  | 1015 | 103    | 1180   | 87    | T04-02391     | Gleason 6   | Gleason 2+4=6 | pT2CN0R1       |
| 195      | 17,62 | 1271 | 137    | 402    | 340   | T04-06731     | Gleason 7   |               |                |
| 25       | 7,1   | 963  | 1031   | 1038   | 1012  | T04-01468     | Gleason 7   | Gleason 3+4=7 | pT2AN0R1       |
| 192      | 8,93  | 1268 | 5610   | 37695  | 149   | T04-06730     | Gleason 7   |               |                |
| 120      | 9,77  | 1121 | 775    | 10035  | 77    | T04-01533     | Gleason 7   |               |                |
| 30       | 7,49  | 965  | 291    | 6414   | 46    | T03-11922     | Gleason 6   |               |                |
| 167      | 24    | 1222 | 395    | 2254   | 175   | T04-06472     | Gleason 7   |               |                |
| 32       |       | 928  | 102    | 429    | 243   | T03-11626     | Gleason 6   |               |                |
| 32       |       | 928  | 594    | 518    | 1147  | T03-11626     | Gleason 6   |               |                |
| 79       | 85,63 | 1049 | 122    | 223    | 547   | T03-14340     | Gleason 9   |               |                |
| 143      | 5,1   | 1219 | 0      | 7351   | 0     | T04-06258     | Gleason 6   |               |                |
| 109      | 30    | 1110 | 1072   | 6302   | 170   | T04-06287     | Gleason 9   | Gleason 4+5=9 | pT3AN0R1       |
| 34       | 9,56  | 990  | 1375   | 12730  | 108   | T03-12527     | Gleason 6   |               |                |
| 169      | 3,52  | 1224 | 15610  | 23584  | 662   | T04-04644     | Gleason 6   |               |                |
| 172      | 11,53 | 1227 | 3409   | 7448   | 458   | T04-04652     | Gleason 6   |               |                |
| 142      | 9,06  | 1218 | 163    | 3924   | 41    | T04-06400     | Gleason 5   | Gleason 2+3=5 | pT2CN0R0       |
| 57       | 7,55  | 1003 | 251    | 7094   | 35    | T03-13075     | Gleason 6   |               |                |
| 162      | 1     | 1214 | 109    | 578    | 189   | T04-04964     | Gleason 6   |               |                |
| 125      | 11,61 | 1151 | 228    | 564    | 404   | T04-00822     | Gleason 7   | Gleason 4+3=7 | pT3AN0R1       |
| 154      | 6,9   | 1199 | 80     | 379    | 211   | T04-04180     | Gleason 6   |               |                |
| 154      | 6,9   | 1229 | 224    | 711    | 315   | T04-04180     | Gleason 6   |               |                |

| Paciente | PSA   | ARN  | PCA3  | PSA    | Razón | Biopsia de PA | Diagnóstico | PA RRP        | RRP conclusión |
|----------|-------|------|-------|--------|-------|---------------|-------------|---------------|----------------|
| 155      | 5,38  | 1207 | 0     | 3913   | 0     | T04-04877     | Gleason 5   |               |                |
| 90       | 9,45  | 1077 | 3511  | 16621  | 211   | T04-00516     | Gleason 7   |               |                |
| 100      | 7,18  | 1100 | 404   | 9690   | 42    | T04-01181     | Gleason 6   |               |                |
| 156      | 5,52  | 1208 | 431   | 43117  | 10    | T04-06076     | Gleason 5   | Gleason 2+3=5 | pT2AN0R0       |
| 153      | 10,33 | 1189 | 355   | 1549   | 229   | T04-03468     | Gleason 6   |               |                |
| 121      | 5,98  | 1122 | 424   | 3787   | 112   | T04-01531     | Gleason 4   |               |                |
| 121      | 5,98  | 1122 | 773   | 5508   | 140   | T04-01531     | Gleason 7   | Gleason 4+3=7 | pT3BN0R0       |
| 173      | 6,66  | 1228 | 189   | 1684   | 112   | T04-04183     | Gleason 6   |               |                |
| 72       | 15,7  | 1023 | 209   | 1345   | 155   | T04-03591     | Gleason 7   | Gleason 4+3=7 | pT3AN0R0       |
| 117      | 9,38  | 1118 | 6056  | 12872  | 470   | T04-06788     | Gleason 7   | Gleason 3+4=7 | pT3AN0R1       |
| 183      | 21,24 | 1236 | 10259 | 121054 | 85    | T04-05303     | Gleason 6   |               |                |
| 94       | 12,28 | 1080 | 789   | 9888   | 80    | T04-00527     | Gleason 9   |               |                |
| 184      | 3,9   | 1259 | 57    | 57     | 1000  | T04-07087     | Gleason 8   |               |                |
| 61       | 25,27 | 1013 | 587   | 4354   | 135   | T03-13417     | Gleason 7   |               |                |

### Referencias

- Jensen O M, Esteve J, Moller H, Renard H. Cancer in the European Community and its member states. Eur J Cancer 1990; 26:1167-256.
- Beduschi M C, Oesterling J E. Percent free prostate-specific antigen: the next frontier in prostate-specific antigen testing. Urology 1998; 51:98-109.
- Brawer M K, Chemer M P, Beatie J, Buchner D M, Vessella R L, Lange P H. Screening for prostatic carcinoma with prostate specific antigen. J Urol 1992; 147:841-5.
- Catalona W J, Smith D S, Ratliff T L, Dodds K M, Coplen D E, Yuan J J y col. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. N Engl J Med 1991; 324:1156-61.
- Brawer M K. Prostate-specific antigen. Semin Surg Oncol 2000; 18:3-9.
- Nixon R G, Brawer M K. Enhancing the specificity of prostate-specific antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. Br J Urol 1997; 79 Suppl 1:61-7:61-7.
- Polascik T J, Oesterling J E, Partin A W. Prostate specific antigen: a decade of discovery-what we have learned and where we are going. J Urol 1999; 162:293-306.
- Kamoi K, Babaian R J. Advances in the application of prostate-specific antigen in the detection of early-stage prostate cancer. Semin Oncol 1999; 26:140-9.
- Nixon R G, Brawer M K. Enhancing the specificity of prostate-specific antigen (PSA): an overview of PSA density, velocity and age-specific reference ranges. Br J Urol 1997; 79 Suppl 1:61-7:61-7.
- Ukimura O, Durrani O, Babaian R J. Role of PSA and its indices in determining the need for repeat prostate biopsies. Urology 1997; 50:66-72.
- Mettlin C J, Murphy G P, Ho R, Menck H R. The National Cancer Data Base report on longitudinal observations on prostate cancer. Cancer 1996; 77:2162-6.

12. Murphy G P, Barren R J, Erickson S J, Bowes V A, Wolfert R L, Bartsch G y col. Evaluation and comparison of two new prostate carcinoma markers. Free-prostate specific antigen and prostate specific membrane antigen. *Cancer* 1996; 78:809-18.
- 5 13. Xu L L, Srikantan V, Sesterhenn I A, Augustus M, Dean R, Moul J W y col. Expression profile of an androgen regulated prostate specific homeobox gene NKX3.1 in primary prostate cancer. *J Urol* 2000; 163:972-9.
14. Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku I P, Dorey F, Raitano A y col. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene* 2000; 19:1288-96.
- 10 15. Sun Y, Lin J, Katz A E, Fisher PB. Human prostatic carcinoma oncogene PTI-1 is expressed in human tumor cell lines and prostate carcinoma patient blood samples. *Cancer Res* 1997; 57:18-23.
16. Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, Xu L, Augustus M, Davis L y col. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Oct. 24; 97(22):12216-21 2001; 97:12216-21.
- 15 17. Oettgen P, Finger E, Sun Z, Akbarali Y, Thamrongsak U, Boltax J y col. PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275:1216-25.
18. Lin B, Ferguson C, White J T, Wang S, Vessella R, True L D y col. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res* 1999; 59:4180-4.
19. Nelson P S, Gan L, Ferguson C, Moss P, Gelinas R, Hood L, Wang K. Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:3114-9.
- 20 20. Bussemakers M J, van Bokhoven A, Verhaegh G W, Smit F P, Karthaus H F, Schalken J A y col. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59:5975-9.
21. de Kok J B, Verhaegh G W, Roelofs R W, Hessels D, Kiemeny L A, Aalders T W y col. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002; 62:2695-8.
- 25 22. Auffray C, Rougeon F. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem* 1980; 107:303-14.
23. Ylikoski A, Sjooros M, Lundwall A, Karp M, Lovgren T, Lilja H, Iitia A. Quantitative reverse transcription-PCR assay with an internal standard for the detection of prostate-specific antigen mRNA. *Clin Chem* 1999; 45:1397-407.
- 30 24. Raeymaekers L. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Anal Biochem* 1993; 214:582-5.
25. Grasso Y Z, Gupta M K, Levin H S, Zippe C D, Klein E A. Combined nested RT-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients: correlation with pathological stage. *Cancer Res* 1998; 58:1456-9.
- 35 26. Ferrari A C, Stone N N, Eyer J N, Gao M, Mandeli J, Unger P y col. Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1498-504.
27. Goldman H B, Israeli R S, Lu Y, Lerner J L, Hollabaugh R S, Steiner M S. Can prostate-specific antigen reverse transcriptase-polymerase chain reaction be used as a prospective test to diagnose prostate cancer? *World J Urol* 1997; 15:257-61.
- 40 28. Katz A E, de Vries G M, Begg M D, Raffo A J, Cama C, O'Toole K y col. Enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate specific antigen as an indicator of true pathologic stage in patients with prostate cancer. *Cancer* 1995; 75:1642-8.
29. Katz A E, Olsson C A, Raffo A J, Cama C, Perlman H, Seaman E y col. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* 1994; 43:765-75.
- 45 30. Smith M R, Biggar S, Hussain M. Prostate-specific antigen messenger ARN is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. *Cancer Res* 1995; 55:2640-4.
31. Lintula S, Stenman U H. The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. *J Urol* 1997; 157:1969-72.
32. Bustin S A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-93.

33. Bernard P S, Wittwer C T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem 2002; 48:1178-85.
34. Nurmi J, Wikman T, Karp M, Lovgren T. High-performance real-time quantitative RT-PCR using lanthanide probes and a dual-temperature hybridization assay. Anal Chem 2002; 74:3525-32.
- 5 35. Gibson U E, Heid C A, Williams P M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6:995-1001.
36. Paule M R, White R J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Res 2000; 28:1283-98.
37. Barbu V, Dautry F. Northern blot normalization with a 28S rRNA oligonucleotide probe. Nucleic Acids Res 1989; 17:7115.
- 10 38. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002; 3:RESEARCH0034.
39. Soini E, Lovgren T. Time-resolved fluorescence of lanthanide probes and applications in biotechnology. CRC Crit Rev Anal Chem 1987; 18:105-54.
- 15 40. Ylikoski A, Karp M, Lilja H, Lovgren T. Dual-label detection of amplified products in quantitative RT-PCR assay using lanthanide-labeled probes. Biotechniques 2001; 30:832-6, 838, 840.

Además, la solicitud hace referencia a los siguientes puntos:

1. Un procedimiento para diagnosticar cáncer de próstata en una muestra biológica de un paciente, que comprende:
  - 20 a) valorar la cantidad de un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en dicha muestra biológica;
  - b) determinar una razón de dicha cantidad de dicho ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de la cantidad de PSA; y
  - c) comparar el valor de dicha razón con al menos un valor umbral predeterminado,
- 25 en donde un valor de la razón por encima de dicho valor umbral predeterminado es indicador de un mayor riesgo de mortalidad del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón por debajo de dicho valor umbral predeterminado.
2. El procedimiento de acuerdo con el punto 1, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: orina, resección de tejido prostático, biopsia de tejido prostático, semen y lavado vesical.
- 30 3. El procedimiento de acuerdo con el punto 2, en donde dicha muestra biológica es una muestra de orina obtenida tras una exploración rectal digital.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde dicha cantidad de PSA es la cantidad de ARNm de PSA.
5. Un procedimiento para pronosticar el cáncer de próstata en una muestra biológica, que comprende:
  - 35 a) poner en contacto una muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida a un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata;
  - b) poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida a un ARNm de PSA;
  - c) determinar la cantidad de ARNm de PCA3 y la cantidad de ARNm de PSA presentes in dicha muestra biológica;
  - d) determinar una razón de dicha cantidad de ARNm de PCA3 en función de dicha cantidad de ARNm de PSA;
  - 40 e) comparar el valor de dicha razón de ARNm de PCA3 en función de dicha cantidad de ARNm de PSA con al menos un valor umbral predeterminado,
- en donde un valor de la razón por encima de dicho valor umbral predeterminado es indicativo de la presencia de un cáncer más agresivo, en comparación con un valor de la razón por debajo de dicho valor umbral predeterminado que es indicativo de la presencia de un cáncer menos agresivo.
- 45 6. Un procedimiento para valorar el volumen tumoral del cáncer de próstata en una muestra biológica, que comprende:

- a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en una muestra;
- b) determinar la razón de dicha cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de PSA;
- 5 c) comparar el valor de dicha razón con al menos un valor umbral predeterminado,
- en donde un valor de la razón por encima de dicho valor umbral predeterminado es indicativo de un mayor volumen tumoral del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón por debajo de dicho valor umbral predeterminado.
7. Un procedimiento para monitorizar el crecimiento tumoral del cáncer de próstata en una muestra biológica de un paciente, que comprende:
- 10 a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en dicha muestra biológica en un primer punto de tiempo;
- b) determinar la razón de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de PSA;
- 15 c) repetir las etapas a) y b) con una muestra biológica de dicho paciente en un punto de tiempo posterior; y
- d) comparar el valor de la razón obtenido en la etapa b) con el valor de la razón obtenida en la etapa c)
- en donde un valor de la razón más alto en la etapa b) que el valor de la razón obtenida en la etapa c) es indicativo de la progresión del cáncer de próstata y de un mayor volumen tumoral.
8. Un procedimiento para monitorizar la progresión del cáncer de próstata en una muestra biológica, que comprende:
- 20 a) poner en contacto una muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PSA;
- 25 c) determinar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 y la cantidad de ácido nucleico de PSA presentes en dicha muestra biológica;
- d) determinar la razón de dicha cantidad de ácido nucleico de PCA3 en función de dicha cantidad de ácido nucleico de PSA; y
- e) repetir las etapas a) a d) en un punto de tiempo posterior; y
- 30 f) comparar el valor de la razón obtenida en la etapa d) con el valor de la razón obtenida en la etapa e)
- en donde un valor de la razón más alto en la etapa e) en comparación con el valor de la razón obtenido en la etapa d) es indicativo de la progresión del cáncer de próstata.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8, en donde una reacción de amplificación se usa para determinar la cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con el punto 9, en donde dicha reacción de amplificación se selecciona del grupo que consiste en:
- a) reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- b) ensayo de amplificación basado en secuencia de ácido nucleico (NASBA);
- c) amplificación mediada por transcripción (TMA);
- 40 d) reacción en cadena de la ligasa (LCR); y
- e) amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA).
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 5 a 8, en donde la cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y de dicho ácido nucleico de PSA se determina con un ensayo de hibridación.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, en donde la cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata se valora con el uso de al menos un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de PCA3 seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 a) una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 1;  
b) una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 2; y  
c) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas a una secuencia de ácido nucleico de a) o de b).
13. El procedimiento de acuerdo con el punto 12, en el que la cantidad de dicho PSA se valora con el uso de al menos un oligonucleótido que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia de ácido nucleico de PSA seleccionada del grupo que consiste en:
- 10 a) una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 38; y  
b) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia de ácido nucleico de a).
14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1, 2, 3, 6, 7 y 12, en donde se valora la cantidad de proteína de PSA que contiene dicha muestra biológica.
- 15 15. El procedimiento de acuerdo con el punto 14, en donde se usa un anticuerpo para valorar dicha cantidad de proteína de PSA.
16. Un kit de diagnóstico y pronóstico para el cáncer de próstata, que comprende al menos un medio de recipiente que tiene dispensado en él
- 20 a) al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata seleccionado del grupo que consiste en:  
i. una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 1;  
ii. una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 2;  
iii. una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a i o ii; y  
iv. una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas a la secuencia de ácido nucleico de i, ii o iii;
- 25 b) al menos un oligonucleótido que se hibrida con el ácido nucleico de PSA seleccionado del grupo que consiste en:  
i. una secuencia de ácido nucleico presentada en la SEQ ID n.º 1;  
ii. una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a i;  
iii. una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas con la secuencia de ácido nucleico de i o ii; y
- 30 c) instrucciones para determinar el diagnóstico y pronóstico de cáncer de próstata basándose en la detección de una razón concreta del nivel del ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función del nivel del ácido nucleico de PSA.
- 35 17. Un procedimiento para determinar el riesgo de progresión del cáncer de próstata tras el tratamiento, que comprende:
- a) valorar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en una muestra antes del tratamiento;
- 40 b) determinar una razón de dicha cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de PSA;
- c) repetir las etapas a) y b) con una muestra biológica de dicho paciente después de dicho tratamiento; y  
d) comparar el valor de la razón obtenida después del tratamiento con el valor de la razón obtenida antes del tratamiento,
- 45 en donde un valor elevado de la razón en dicha muestra después del tratamiento en comparación con el valor de la

razón obtenido antes de dicho tratamiento es indicativo de la progresión del cáncer de próstata.

- 5 18. Los procedimientos de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15 y 17, que además comprenden la determinación de la puntuación de Gleason de una muestra de próstata de dicho paciente y la correlación de dicho valor de la razón PCA3/PSA y dicha puntuación de Gleason con un riesgo de mortalidad asociado a dicha enfermedad.
19. El procedimiento del punto 18, en donde dicho valor de la razón PCA3/PSA y dicha puntuación de Gleason están correlacionados con una predicción de eficacia del fármaco, respuesta del paciente y/o una previsión del riesgo de enfermedad.
- 10 20. Un procedimiento para estadificar el cáncer de próstata en una muestra biológica de un paciente, que comprende:
- a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de PSA en dicha muestra biológica;
  - b) determinar la razón de dicha cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de PSA;
  - 15 c) comparar el valor de dicha razón con al menos un valor umbral predeterminado; y
  - d) correlacionar un valor de la razón con un estadio concreto del cáncer de próstata,
- en donde un valor de la razón por encima de un valor umbral predeterminado indica un estadio más avanzado del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón por debajo de dicho valor umbral predeterminado, con lo que se estadifica el cáncer de próstata.
- 20 21. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 7 y 8, en donde dicha muestra biológica se obtiene de un paciente en tratamiento contra el cáncer de próstata entre dicho primer y dicho posterior punto temporal, con lo que se monitoriza un efecto de dicho tratamiento sobre el crecimiento tumoral del cáncer o la progresión del cáncer.
22. Un procedimiento para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente humano, que comprende:
- 25 a) realizar un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro* en una muestra biológica de dicho paciente o extracto de la misma mediante el uso de una primera pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específica de cáncer de próstata y una segunda pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico de PSA;
  - b) cuantificar dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 y dicha secuencia de ácido nucleico de PSA; y
  - 30 c) calcular una razón normalizada de PCA3 en función de PSA, en donde dicha razón se puede correlacionar con un nivel de ARNm de PCA3 y un nivel de ARNm de PSA en dicho paciente,
- en donde dicha razón normalizada de PCA3 en función de PSA está correlacionada positivamente con un grado o estadio del cáncer de próstata.
- 35 23. El procedimiento de acuerdo con uno del punto 21, en donde dicha razón es superior a aproximadamente  $200 \times 10^{-3}$ , entre aproximadamente  $75 \times 10^{-3}$  y aproximadamente  $200 \times 10^{-3}$  o entre aproximadamente 0 y aproximadamente  $75 \times 10^{-3}$ .
24. Un kit para pronosticar el cáncer de próstata en un paciente, que comprende:
- a) una primera pareja de cebadores específica para la amplificación del ácido nucleico de PCA3 asociado al cáncer de próstata presente en una muestra de paciente;
  - 40 b) una segunda pareja de cebadores específica para la amplificación de un ácido nucleico de PSA;
  - c) reactantes que hacen posible una detección cuantitativa de los productos de amplificación del ácido nucleico de PCA3 y de PSA cuando están presentes dicha secuencia de ácido nucleico específica de próstata de PCA3 y segunda; y
  - 45 d) instrucciones para determinar el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de próstata basándose en la detección de una razón concreta del nivel del ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función del nivel del ácido nucleico de PSA.
25. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde dicho valor umbral se selecciona de  $132 \times 10^{-3}$  y  $200 \times 10^{-3}$ .

26. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15, 17 a 20, 22 y 23, que además comprende el uso de un valor umbral de 3 ng/ml de la proteína de PSA en el suero.

**Listado de secuencias**

<110> Stichting Katholieke Universiteit, The University Medical Centre Nijmegen

<120> Razones de ARNm en sedimentos urinarios y/u orina como marcador para el pronóstico y/o tratamiento del cáncer de próstata

<130> L 3369 EP/1 S3

<150> CA 2.491.067

<151> 2004-09-23

<150> US 60/719.557

<151> 2005-09-23

<160> 43

<170> PatentIn, versión 3.2

<210> 1

<211> 2037

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1472)..(1472)

<223> n = a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1517)..(1517)

<223> n = a, c, g o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1563)..(1563)

<223> n = a, c, g o t

<400> 1

```

agaagctggc atcagaaaaa cagaggggag atttgtgtgg ctgcagccga gggagaccag      60
gaagatctgc atggtgggaa ggacctgatg atacagagga attacaacac atatacttag      120
tgtttcaatg aacaccaaga taaataagtg aagagctagt ccgctgtgag tctcctcagt      180
gacacagggc tggatcacca tcgacggcac tttctgagta ctcagtgcag caaagaaaga      240
ctacagacat ctcaatggca ggggtgagaa ataagaaagg ctgctgactt taccatctga      300
ggccacacat ctgctgaaat ggagataatt aacatcacta gaaacagcaa gatgacaata      360
taatgtctaa gtagtgacat gtttttgcaac atttccagcc cctttaata tccacacaca      420
caggaagcac aaaaggaagc acagagatcc ctgggagaaa tgcccggccg ccatcttggg      480

```

ES 2 546 193 T3

tcatcgatga gcctogccct gtgcctggtc cgccttgtga ggaaggaca ttagaaaatg 540  
 aattgatgtg ttccttaaag gatgggcagg aaaacagatc ctggttgga tatttatttg 600  
 aacgggatta cagatttgaa atgaagtcac aaagtgagca ttaccaatga gaggaaaaca 660  
 gacgagaaaa tcttgatggc ttcacaagac atgcaacaaa caaatggaa tactgtgatg 720  
 acatgaggca gccaaactgg ggaggagata accaoggggc agagggtcag gattctggcc 780  
 ctgctgccta aactgtgcgt tcataacca atcatttcat atttctaacc ctcaaaacaa 840  
 agctgttgta atatctgatc tctacggtc cttctgggccc caacattctc catatatcca 900  
 gccacactca tttttaatat ttagttccca gatctgtact gtgaccttc taaactgtag 960  
 aataacatta ctcaatttgt tcaaagacc ttcgtgttgc tgcctaatat gtagctgact 1020  
 gtttttccca aggagtgttc tggcccagg gatctgtgaa caggctggga agcatctcaa 1080  
 gatctttcca gggttatact tactagcaca cagcatgatc attacggagt gaattatcta 1140  
 atcaacatca tctcagtggt ctttgcccat actgaaattc atttcccact tttgtgcccc 1200  
 ttctcaagac ctcaaatgt cattcoatta atatcacagg attaaacttt ttttttaacc 1260  
 tggaagaatt caatgttaca tgcagctatg ggaatttaac tacatatttt gttttccagt 1320  
 gcaaagatga ctaagtcctt tatccctccc ctttgtttga tttttttcc agtataaagt 1380  
 taaaatgctt agccttgtac tgaggctgta tacagcacag cctctcccca tccctccagc 1440  
 cttatctgtc atcaccatca acccctccca tnysacctaa acaaatcta acttgtaatt 1500  
 ccttgaacat gtcaggncat acattttcc ttctgcctga gaagctcttc cttgtctctt 1560  
 aantctagaa tgatgtaaag ttttgaataa gttgactatc ttacttcatg caaagaagg 1620  
 acacatatga gattcatcat cacatgagac agcaaatact aaaagtgtaa tttgattata 1680  
 agagtttaga taaatatatg aatgcaaga kccacagagg gaatgtttat ggggcacgtt 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 gttgtcctt gtagttaatt gaaagaaata 1980  
 gggcactctt gtgagccact ttagggttca ctctggcaa taaagaattt acaaga 2037

<210> 2  
 <211> 3582  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

acagaagaaa tagcaagtgc cgagaagctg gcatcagaaa aacagagggg agatttgtgt 60

ES 2 546 193 T3

ggctgcagcc gagggagacc aggaagatct gcatgggtggg 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  
 aatgcccggc cgccatcttg ggtcatcgat gagcctcgcc ctgtgcctgg tcccgcttgt 540  
 gagggaagga cattagaaaa tgaattgatg tgttccttaa 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 aggattctgg ccctgctgcc taaactgtgc gttcataacc aaatcatttc 840  
 atatttctaa ccctcaaaac aaagctgttg taatatctga tctctacggg tccttctggg 900  
 cccaacattc tccatataac cagccacact catttttaat atttagttcc cagatctgta 960  
 ctgtgacctt tctacactgt agaataacat tactcatttt gttcaaagac ccttctgttt 1020  
 gctgcctaata atgtagctga ctgtttttcc taaggagtgt tctggcccag gggatctgtg 1080  
 aacaggctgg gaagcatctc aagatcttc caggggtata cttactagca cacagcatga 1140  
 tcattacgga gtgaattatc taatcaacat catcctcagt gtctttgccc atactgaaat 1200  
 tcatttccca cttttgtgcc cattctcaag acctcaaaat gtcattccat taatatcaca 1260  
 ggattaactt ttttttttaa cctggaagaa ttcaatgta catgcagcta tgggaattta 1320  
 attacatatt ttgtttcca gtgcaaagat gactaagtcc tttatccctc ccctttgttt 1380  
 gatttttttt ccagtataaa gttaaaatgc ttagccttgt actgaggctg tatacagcac 1440  
 agcctctccc catccctcca gccttatctg tcatcacat caaccctcc cataccacct 1500  
 aaacaaaatc taacttgtaa ttccttgaac atgtcaggac atacattatt ccttctgcct 1560  
 gagaagctct tccttgtctc ttaaacttag aatgatgtaa agttttgaat aagttgacta 1620  
 tcttacttca tgcaaagaag ggacacatat gagattcatc atcacatgag acagcaaata 1680  
 ctaaaagtgt aatttgatta taagagtta gataaatata tgaaatgcaa gagccacaga 1740  
 gggaatgttt atggggcacg tttgtaagcc tgggatgtga agcaaaggca gggaacctca 1800  
 tagtatotta tataatatac ttcatttctc tatctctatc acaatatcca acaagctttt 1860

ES 2 546 193 T3

cacagaatc atgcagtgea aatccccaaa ggtaaccttt atccatttca tggtgagtgc 1920  
gctttagaat tttggcaaat catactgggc 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  
ttaaacaag catgttttca aatggcacta tgagctgcca atgatgtatc accaccatat 2220  
ctcattattc 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 catogtcccc atctctgtga 2760  
gccacaacca acagcaggac ccaacgcatg tctgagatcc ttaaatacaag gaaaccagtg 2820  
tcatgagttg aattctccta ttatggatgc tagcttctgg ccatctctgg ctctcctctt 2880  
gacacatatt agcttctagc ctttgcttcc acgactttta tcttttctcc aacacatogc 2940  
ttaccaatcc tctctctgct ctggtgcttt ggacttcccc acaagaattt caacgactct 3000  
caagtctttt ctccatccc caccactaac ctgaattgcc tagaccotta tttttattaa 3060  
tttccaatag atgctgccta tgggctaata ttgctttaga tgaacattag atatttaaag 3120  
tctaagaggt tcaaaatcca actcattatc ttctctttct ttcacctccc ctgctcctct 3180  
ccctatatta ctgattgact gaacaggatg gtccccaaga tgocagtcaa atgagaaacc 3240  
cagtggctcc ttgtggatca tgcattgcaag actgctgaag ccagaggatg actgattacg 3300  
cctcatgggt ggaggggacc actcctgggc cttcgtgatt gtcaggagca agacctgaga 3360  
tgetccctgc cttcagtgtc ctctgcatct cccctttcta atgaagatcc atagaatttg 3420  
ctacatttga gaattccaat taggaactca catgttttat ctgccotatc aattttttaa 3480  
acttgctgaa aattaagttt tttcaaaatc tgtccttgta aattactttt tcttacagtg 3540  
tcttggcata ctatatcaac tttgattctt tgttacaact tt 3582

<210> 3  
<211> 20

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 3

**caggaagcac aaaaggaagc** 20

<210> 4  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 4

**tctgcccac ccttaagg** 19

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 5

**tgatacagag gaattacaac** 20

<210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 6

**gatgatacag aggaattaca** 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 7

**tcaatggcag gggtagaaaa** 20

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 8

**ggaagcacag agatccctgg 20**

<210> 9  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 9

**attttgttca aagacccttc 20**

<210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 10

**aaagagctac tcaggaccaq 20**

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 11

**tctttgaact gatgctcata 20**

<210> 12  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 12

**agaagctggc atcagaaaaa 20**

<210> 13

<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 13

agaagctggc atcagaaaaa cagaggggag 30

<210> 14  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 14

agaagctggc atcagaaaaa cagaggggag atttgtgtgg 40

<210> 15  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 15

ggcaggggtg agaaataaga aaggctgctg 30

<210> 16  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 16

agaaaggctg ctgactttac 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 17

acagaagaaa tagcaagtgc 20

<210> 18  
<211> 30

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 18

**acagaagaaa tagcaagtgc cgagaagctg 30**

<210> 19  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 19

**acagaagaaa tagcaagtgc cgagaagctg gcatcagaaa 40**

<210> 20  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 20

**tacagaggaa ttacaacaca tatacttagt 30**

<210> 21  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 21

**gggtgagaaa taagaaaggc 20**

<210> 22  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 22

**ggacctgatg atacagagga attac 25**

<210> 23  
<211> 15  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 23

**gaggaattac aacac 15**

<210> 24

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 24

**gatgatacag aggaattaca acac 24**

<210> 25

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 25

**gatgatacag aggtgagaaa taag 24**

<210> 26

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 26

**cagaggtgag aaataagaaa ggc 23**

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 27

**gatacagagg tgagaaataa g 21**

<210> 28

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 28

**gatacagagg tgagaaataa gaaaggctgc tgac 34**

<210> 29  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 29

**ggcaggggtg agaaataag 19**

<210> 30  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 30

**ctcaatggca ggggtgag 18**

<210> 31  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 31

**ctcaatggca ggggtgagaa ataagaaagg ctgctgac 38**

<210> 32  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 32

**gcacaaaagg aagcacagag atccctggga g 31**

<210> 33  
<211> 19  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 33

**gcacagagat ccctgggag 19**

<210> 34

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 34

**gcacagagga ccctcgtg 19**

<210> 35

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 35

**ggaagcaca aaggaagcac agagatccct ggg 33**

<210> 36

<211> 47

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética (PSA)"

<400> 36

**aattctaata cgactcacta tagggaggat gaaacaggct gtgccga 47**

<210> 37

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética (PSA)"

<400> 37

**agcattccca accctggcag 20**

<210> 38

<211> 7130

<212> ADN

ES 2 546 193 T3

<213> Homo sapiens (PSA)

<400> 38

gaattccaca ttgtttgctg cacgttggat tttgaaatgc tagggaactt tgggagactc 60  
atatttctgg gctagaggat ctgtggacca caagatcttt ttatgatgac agtagcaatg 120  
tatctgtgga gctggattct gggttgggag tgcaaggaaa agaattgtact aaatgccaag 180  
acatctatctt caggagcatg aggaataaaa gttctagttt ctggctctcag agtgggtgcag 240  
ggatcagggg gtctcacaat ctctgagtg ctgggtgtctt agggcacact gggctcttggg 300  
gtgcaaagga tctagggcag tgaggctttg tatgaagaat cggggatcgt acccaccctc 360  
tgtttctggt tcatcctggg catgtctcct ctgcctttgt cccctagatg aagtctccat 420  
gagctacaag ggcttgggtg atccaggggtg atctagtaat tgcagaacag caagtgtctag 480  
ctctccctcc ccttccacag ctctgggtgt gggagggggg tgtccagcct ccagcagcat 540  
ggggaggggc ttggtcagcc tctgggtgcc agcagggcag gggcggagtc ctggggaatg 600  
aaggttttat agggctcctg ggggaggctc cccagcccca agcttaccac ctgcaccctg 660  
agagctgtgt caccatgtgg gtcccgggtg tcttctctac cctgtccgtg acgtggattg 720  
gtgagagggg ccatggttgg ggggatgcag gagagggagc cagccctgac tgtcaagctg 780  
aggtcttttc ccccccaacc cagcaccoca gccagacag ggagctgggc tcttttctgt 840  
ctctcccage cccacttcaa gcccataccc ccagcccctc catattgcaa cagtctctac 900  
tcccacacca ggtcccogct cctcccact taccocagaa ctttctcccc attgcccage 960  
cagctccctg ctcccagctg ctttactaaa ggggaagttc ctgggcatct cctgttttct 1020  
ctttgtgggg ctcaaacct ccaaggacct ctctcaatgc cattgggtcc ttggaccgta 1080  
tcaactgttc atctctgag cccctcaatc ctatcacagt ctactgactt ttcccattca 1140  
gctgtgagtg tccaacccta tcccagagac cttgatgctt ggctcccaa tcttgcccta 1200  
ggatacccag atgccaacca gacacctctt ttttctagc caggctatct ggctgagac 1260  
aaciaatggg tccctcagtc tggcaatggg actctgagaa ctctcattc cctgactctt 1320  
agccccagac ttttattca gtggcccaca ttttcttag gaaaaacatg agcatcccca 1380  
gccacaactg ccagctctct gattccocaa atctgcatcc ttttcaaac ctaaaaaca 1440  
aaagaaaaac aaataaaaca aaaccaactc agaccagaac tgttttctca acctgggact 1500  
tcctaaactt tcaaaaacct tctcttcca gcaactgaac ctggccataa ggcacttctc 1560  
cctgggtcct agcaccctt atcccctcag aatccacaac ttgtaccaag tttcccttct 1620

ES 2 546 193 T3

cccagtccaa gaccccaaat caccacaaag gacccaatcc ccagactcaa gatatggtct 1680  
 gggcgctgtc ttgtgtotcc taccctgata cctgggttca actctgctcc cagagcatga 1740  
 agcctctcca ccagcaccag ccaccaacct gcaaacctag ggaagattga cagaattccc 1800  
 agcctttccc agtccccct gcccatgtcc caggactccc agccttggtt ctctgcccc 1860  
 gtgtcttttc aaaccacat cctaaatcca tctcctatcc gagtccccca gttccccctg 1920  
 tcaaccctga tccccctgat ctagcacccc ctctgcaggc gctgcgcccc tcatcctgtc 1980  
 tcggattgtg ggaggctggg agtgcgagaa gcattcccaa ccctggcagg tgcttgtggc 2040  
 ctctogtggc agggcagtct gcggcggtgt tctgggtcac cccagtggg tcctcacage 2100  
 tgcccactgc atcaggaagt gagtaggggc ctggggtctg gggagcagggt gtctgtgtcc 2160  
 cagaggaata acagctgggc attttcccca ggataacctc taaggccagc cttgggactg 2220  
 ggggagagag ggaagttct ggttcaggtc acatggggag gcagggttg ggctggacca 2280  
 ccctccccat ggctgcctgg gtctccatct gtgtccctct atgtctottt gtgtcgcttt 2340  
 cattatgtct cttggtaact ggcttcggtt gtgtctctcc gtgtgactat tttgttctct 2400  
 ctctccctct cttctctgtc ttcagtctcc atatctcccc ctctctctgt ccttctctgg 2460  
 tcctctctta gccagtgtgt ctcaacctgt atctctctgc caggctctgt ctctcggtct 2520  
 ctgtctcacc tgtgccttct ccctactgaa cacacgcacg ggatgggcct ggggggaccc 2580  
 tgagaaaagg aagggtttg gctgggcgog gtggctcaca cctgtaatcc cagcactttg 2640  
 ggaggccaag gcaggtagat cacctgaggt caggagttcg agaccagcct ggccaactgg 2700  
 tgaaccccca totctactaa aaatacaaaa aattagccag gcgtggtggc gcatgcctgt 2760  
 agtcccagct actcaggagg ctgagggagg agaattgctt gaacctggga ggttgaggtt 2820  
 gcagtgagcc gagaccgtgc cactgcactc cagcctgggt gacagagtga gactccgcct 2880  
 caaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa agaaaagaaa agaaaagaaa aggaatcttt 2940  
 tatccctgat gtgtgtgggt atgagggtat gagagggccc ctctcactcc attccttctc 3000  
 caggacatcc ctccaactctt gggagacaca gagaagggtt ggttccagct ggagctggga 3060  
 ggggcaattg agggaggagg aaggagaagg ggaaggaaa acagggtatg ggggaaagga 3120  
 ccctggggag cgaagtggag gatacaacct tgggcctgca ggccaggcta cctaccact 3180  
 tggaaacca cgcaaagcc gcatctacag ctgagccact ctgaggcctc ccctccccg 3240  
 oggtccccac tcagctccaa agtctctctc cttttctct cccacacttt atcatcccc 3300  
 ggattcctct ctacttgggt ctcatctctc ctttgacttc ctgcttccct ttctcattca 3360  
 tctgtttctc actttctgcc tggttttgtt cttctctctc tctttctctg gcccatgtct 3420

ES 2 546 193 T3

gtttctctat gtttctgtct tttctttctc atcctgtgta ttttcggctc accttgtttg 3480  
 tcaactgttct cccctctgcc ctttcattct ctctgtcctt ttaccctctt cctttttccc 3540  
 ttggtttctc tcagtttctg tatctgccct tcaccctctc acaactgctgt ttcccaacte 3600  
 gttgtctgta tttttggcct gaactgtgtc ttccccaace ctgtgttttt ctcaactgttt 3660  
 ctttttctct tttggagcct cctccttgot cctctgtccc ttctctcttt ctttatcctc 3720  
 ctogctcctc attcctgcgt ctgcttcctc cccagcaaaa gcgtgatctt gctgggtcgg 3780  
 cacagcctgt ttcctcctga agacacaggc cagggtatttc aggtcagcca cagcttccca 3840  
 caccogctct acgatatgag cctcctgaag aatcgattcc tcaggccagg tgatgactcc 3900  
 agccacgacc tcatgctgct ccgcctgtca gagcctgccg agctcaogga tgctgtgaag 3960  
 gtcattggacc tgcccaccca ggagccagca ctggggacca cctgctacgc ctcaaggctgg 4020  
 ggcagcattg aaccagagga gtgtaogcct gggccagatg gtgcagccgg gagccagat 4080  
 gcctgggtct gagggaggag gggacaggac tcctgggtct gagggaggag ggccaaggaa 4140  
 ccaggtgggg tccagcccac aacagtgttt ttgcctggcc cgtagtcttg accccaaaga 4200  
 aacttcagtg tgtggacctc catgttattt ccaatgacgt gtgtgogcaa gttcaacctc 4260  
 agaaggtgac caagttcatg ctgtgtgctg gacgctggac agggggcaaa agcaoctgct 4320  
 cggtgagtca tcctactcc caagatcttg aggggaaagg tgagtgggga cottaattct 4380  
 gggctggggg ctagaagcca acaaggogtc tgccctcccct gctcccagc tgtagccatg 4440  
 ccacctcccc gtgtctcctc tcattccctc cttccctctt ctttgactcc ctcaaggcaa 4500  
 taggttattc ttacagcaca actcatctgt tcctgcgttc agcacacggt tactaggcac 4560  
 ctgctatgca cccagcactg ccctagagcc tgggacatag cagtgaacag acagagagca 4620  
 gcccctccct tctgtagccc ccaagccagt gaggggcaca ggcaggaaca gggaccacaa 4680  
 cacagaaaag ctggaggggtg tcaggaggtg atcaggctct cggggaggga gaaggggtgg 4740  
 ggagtgtgac tgggaggaga catcctgcag aaggtgggag tgagcaaaca cctgccgcag 4800  
 gggagggggg ggcctgcgg cacctggggg agcagagggg acagcatctg gccaggcctg 4860  
 ggaggagggg cctagagggc gtcaggagca gagaggaggt tgccctggctg gagtgaagga 4920  
 tgggggcagg gtgcgagagg gaagaaagga cccctcctgc agggcctcac ctggggcaca 4980  
 ggaggacact gcttttctc tgaggagtca ggaactgtgg atggtgctgg acagaagcag 5040  
 gacagggcct ggctcaggtg tccagaggct gccgctggcc tcctatggg atcagactgc 5100  
 agggaggggag ggcagcaggg atgtggaggg agtgatgatg gggctgacct gggggtggct 5160  
 ccaggcattg tccccacctg ggccttacc cagcctccct cacaggetcc tggccctcag 5220

ES 2 546 193 T3

totctcccct ccactccatt ctccacctac ccacagtggg tcattctgat caccgaactg 5280  
 accatgccag ccctgccgat ggtcctccat ggctccctag tgccctggag aggaggtgtc 5340  
 tagtcagaga gtagtcctgg aaggtggcct ctgtgaggag ccacggggac agcatcctgc 5400  
 agatggctct ggcccttgtc ccaccgacct gtctacaagg actgtctctg tggaccctcc 5460  
 cctctgcaca ggagctggac cctgaagtcc cttccctacc ggccaggact ggagccccta 5520  
 cccctctggt ggaatccctg cccaccttct totggaagtc ggctctggag acatttctct 5580  
 cttcttcaa agctgggaac tgctatctgt tatctgcctg tccaggtctg aaagatagga 5640  
 ttgcccaggc agaaactggg actgacctat ctcaactctc ccctgctttt acccttaggg 5700  
 tgattctggg ggccacttg tctgtaatgg tgtgottcaa ggtatcaogt catggggcag 5760  
 tgaacatgt gccctgccg aaaggccttc cctgtacacc aaggtggtgc attacggaa 5820  
 gtggatcaag gacaccatcg tggccaacct ctgagcacc ctatcaactc cctattgtag 5880  
 taaacttggg accttggaaa tgaccaggcc aagactcaag cctcccagct totactgacc 5940  
 tttgtcotta ggtgtgaggt ccagggttgc taggaaaaga aatcagcaga cacaggtgta 6000  
 gaccagagtg tttcttaaat ggtgtaattt tgtcctctct gtgtcctggg gaatactggc 6060  
 catgcctgga gacatatcac tcaatttctc tgaggacaca gataggatgg ggtgtctgtg 6120  
 ttatttgtgg gatacagaga tgaaagaggg gtgggatcca cactgagaga gtggagagtg 6180  
 acatgtgctg gacactgtcc atgaagcact gagcagaagc tggaggcaca acgcaccaga 6240  
 caotcacagc aaggatggag ctgaaaacat aaccactct gtctggagg cactgggaag 6300  
 cctagagaag gctgtgagcc aaggagggag ggtcttctt tggcatggga tggggatgaa 6360  
 gtaaggagag ggactggacc ccctggaagc tgattcacta tggggggagg tgtattgaag 6420  
 tctccagac aacctcaga tttgatgatt tctagtaga actcacagaa ataaagagct 6480  
 cttatactgt ggtttattct ggtttgttac attgacagga gacacactga aatcagcaaa 6540  
 ggaaacaggc atctaagtgg ggatgtgaag aaaacagggg aaatctttca gttgttttct 6600  
 cccagtgggg tgttgtggac agcacttaaa tcacacagaa gtgatgtgtg accttgtgta 6660  
 tgaagtattt ccaactaagg aagctcacct gagccttagt gtccagagtt cttattgggg 6720  
 gtctgtagga taggcatggg gtactggaat agctgacctt aacttctcag acctgaggtt 6780  
 cccaagagtt caagcagata cagcatggcc tagagcctca gatgtacaaa aacaggcatt 6840  
 catcatgaat cgcactgtta gcatgaatca tctggcacgg cccaaggccc caggtatacc 6900  
 aaggcacttg ggccgaatgt tocaagggat taaatgtcat ctcccaggag ttattcaagg 6960  
 gtgagccctg tacttgaac gttcaggctt tgagcagtgc agggctgctg agtcaacctt 7020

ES 2 546 193 T3

ttactgtaca ggggggtgag ggaaaggag aagatgagga aaccgcctag ggatctggtt 7080

ctgtcttggtg gccgagtgga ccatggggct atcccaagaa ggaggaattc 7130

<210> 39  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 39  
agcattccca accctggcag 20

<210> 40  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 40  
tggaaggac ctgatgatac a 21

<210> 41  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 41  
cccagggatc tctgtgctt 19

<210> 42  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(1)  
<223> n = (modC)20

<220>  
<221> origen  
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 42  
ncacattcc agcccct 17

<210> 43  
<211> 17  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n = (modC)20

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Construcción sintética"

<400> 43

ncacattcgtagcccct

17

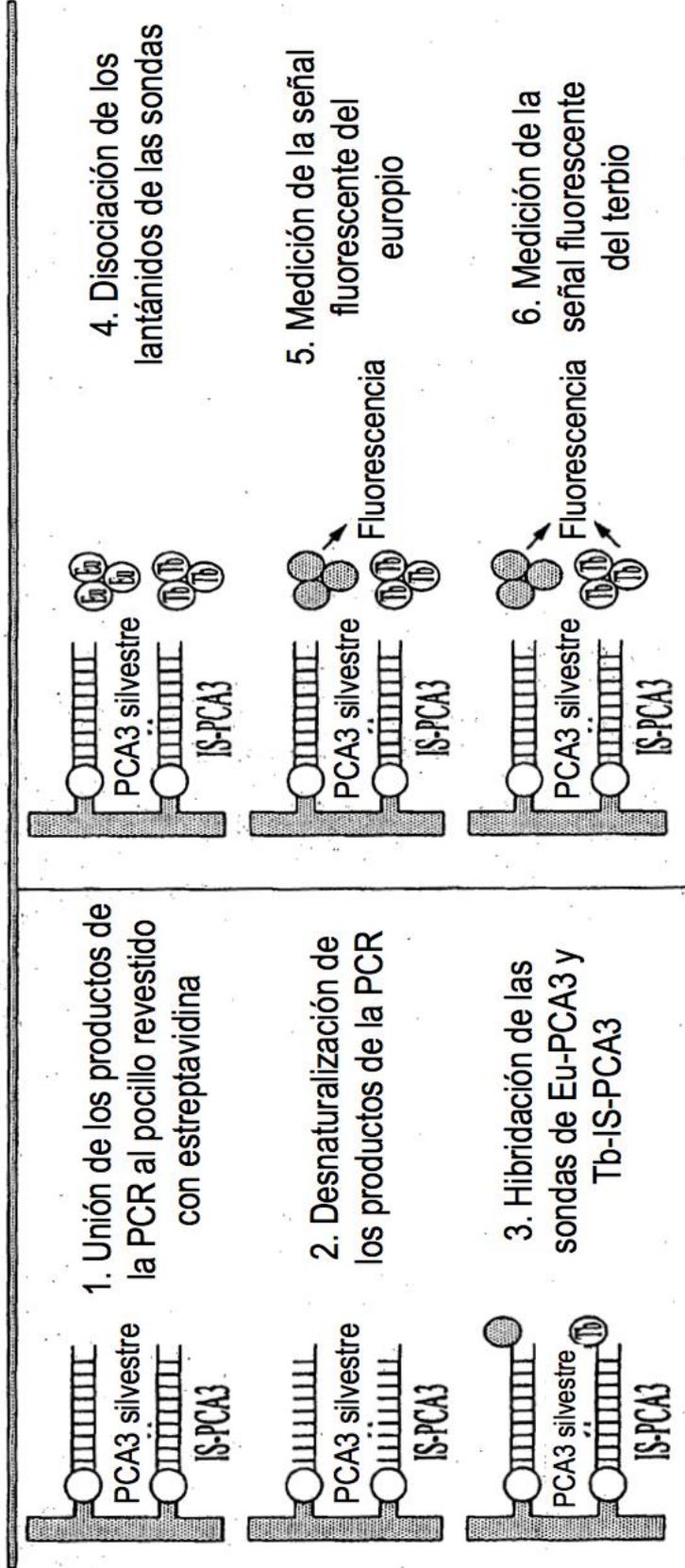
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para pronosticar el cáncer de próstata en una muestra de orina de un paciente, que comprende:
- 5 (a) valorar la cantidad de ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de un marcador específico de próstata en dicha muestra de orina;
- (b) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de dicho ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de marcador específico de próstata; y
- (c) comparar dicho valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado,
- 10 en donde un valor de la razón superior a dicho valor umbral predeterminado es indicativo de un cáncer de próstata más agresivo en comparación con un valor de la razón inferior a dicho valor umbral predeterminado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde dicho valor umbral predeterminado se define a partir de una población de pacientes que tienen cáncer de próstata en diferentes estadios o con diferente agresividad, preferiblemente de acuerdo con la puntuación de Gleason.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha muestra de orina se obtiene después de una exploración rectal digital.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cantidad de marcador específico de próstata es la cantidad de ARNm del marcador específico de próstata.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
- 20 (a) poner en contacto dicha muestra de orina con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata;
- (b) poner en contacto dicha muestra de orina con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ARNm del marcador específico de próstata;
- (c) determinar la cantidad de ARNm de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de ARNm del marcador específico de próstata presentes en dicha muestra de orina;
- 25 (d) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de ARNm de PCA3 en función de dicha cantidad de ARNm del marcador específico de próstata;
- (e) comparar dicho valor de la razón de dicha cantidad de ARNm de PCA3 en función de dicha cantidad de ARNm del marcador específico de próstata con al menos un valor umbral predeterminado,
- 30 en donde un valor de la razón superior a dicho valor umbral predeterminado es indicativo de la presencia de un cáncer de próstata más agresivo en comparación con un valor de la razón inferior a dicho valor umbral predeterminado, que es indicativo de la presencia de un cáncer de próstata menos agresivo.
6. Procedimiento para valorar el volumen tumoral de un cáncer de próstata en una muestra de orina, que comprende:
- 35 (a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de marcador específico de próstata en dicha muestra;
- (b) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función dicha cantidad del marcador específico de próstata;
- (c) comparar dicho valor de la razón con al menos un valor umbral predeterminado,
- 40 en donde un valor de la razón superior a dicho valor umbral predeterminado es indicativo de un mayor volumen tumoral del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón inferior a dicho valor umbral predeterminado.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende:
- (a) valorar la cantidad de un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de marcador específico de próstata en dicha muestra de orina en un primer punto temporal;
- 45 (b) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata en función de dicha cantidad de marcador específico de próstata;

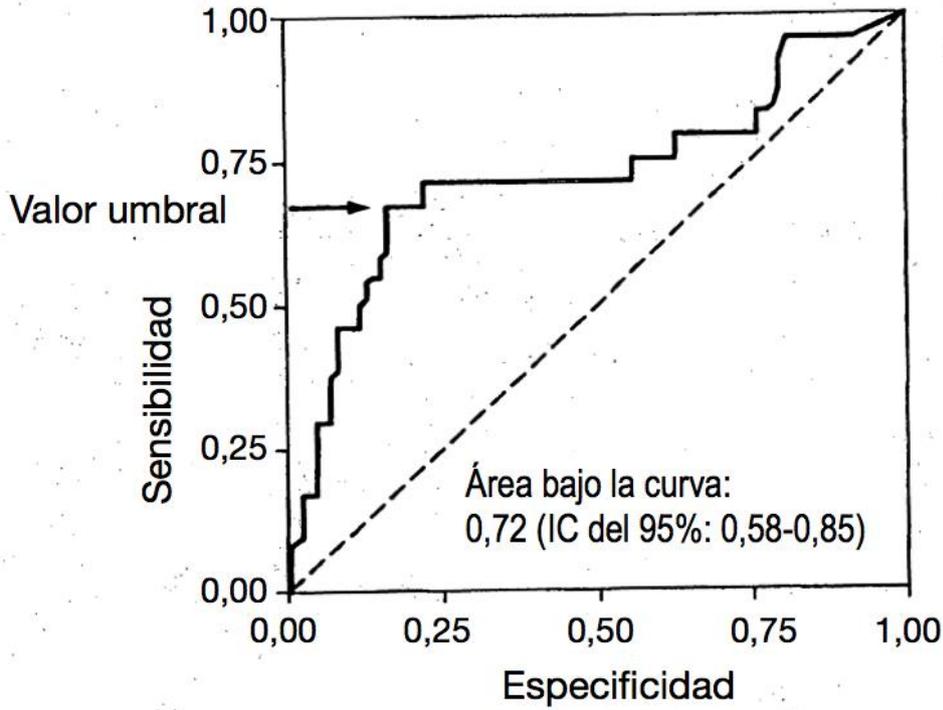
- (c) repetir las etapas (a) y (b) con una muestra de orina procedente de dicho paciente en un punto temporal posterior; y
- (d) comparar el valor de la razón obtenido en la etapa (b) con el valor de la razón obtenido en la etapa (c),  
 en donde un valor superior de la razón en la etapa (c) comparado con el valor de la razón obtenido en la etapa (b) es  
 5 indicativo de la progresión del cáncer de próstata y de un mayor volumen tumoral a lo largo del tiempo.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
- (a) poner en contacto dicha muestra de orina con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata;
- 10 (b) poner en contacto dicha muestra de orina con al menos un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico del marcador específico de próstata;
- (c) determinar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y la cantidad de ácido nucleico del marcador específico de próstata presentes en dicha muestra de orina;
- (d) determinar un valor de la razón de dicha cantidad de ácido nucleico de PCA3 en función de dicha cantidad de ácido nucleico del marcador específico de próstata;
- 15 (e) repetir las etapas (a) hasta (d) en un punto temporal posterior; y
- (f) comparar el valor de la razón obtenido en la etapa (d) con el valor de la razón obtenido en la etapa (e),  
 en donde un valor de la razón superior en la etapa (e) comparado con el valor de la razón obtenido en la etapa (d) es  
 indicativo de la progresión del cáncer de próstata a lo largo del tiempo.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se utiliza una reacción de  
 20 amplificación para determinar la cantidad de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en donde dicha reacción de amplificación se selecciona del grupo consistente en:
- (a) reacción en cadena de la polimerasa (PCR);
- (b) ensayo de amplificación basada en ácidos nucleicos (NASBA);
- 25 (c) amplificación mediada por la transcripción (TMA);
- (d) reacción en cadena de la ligasa (LCR); y
- (e) amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA).
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde la cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y de dicho ácido nucleico del marcador específico de próstata se  
 30 determina con un ensayo de hibridación.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la cantidad de dicho ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata se valora con al menos un oligonucleótido que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico de PCA3 seleccionada del grupo consistente en:
- (a) una secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID NO:1;
- 35 (b) una secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID NO:2; y
- (c) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia de ácido nucleico de (a) o de (b).
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6, 7 y 12, en donde se valora la cantidad de proteína del marcador específico de próstata contenida en dicha muestra biológica.
- 40 14. Procedimiento según la reivindicación 13, en donde se emplea un anticuerpo para valorar dicha cantidad de proteína del marcador específico de próstata.
15. Procedimiento según la reivindicación 1 para la estadificación del cáncer de próstata, en donde dicho procedimiento comprende además:
- (d) correlacionar dicho valor de la razón con un estadio concreto del cáncer de próstata,

en donde un valor de la razón superior a dicho valor umbral predeterminado indica un estadio más avanzado del cáncer de próstata en comparación con un valor de la razón inferior a dicho valor umbral predeterminado, con lo que se estadifica el cáncer de próstata.

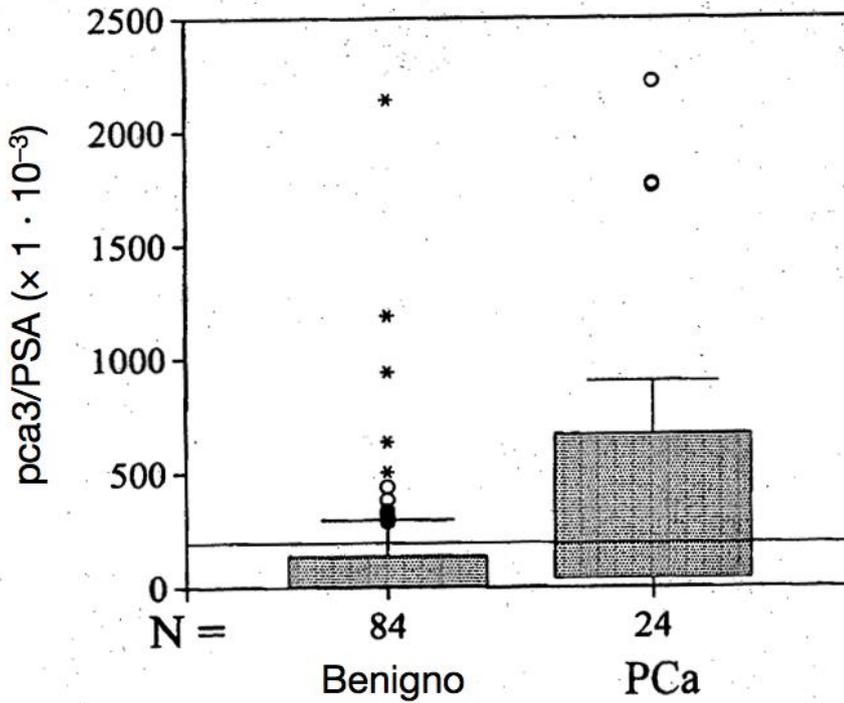
- 5 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende adicionalmente determinar la puntuación de Gleason de una muestra de próstata procedente de dicho paciente y correlacionar dicho valor de la razón PCA3/marcador específico de próstata y dicha puntuación de Gleason con un riesgo de mortalidad asociado a dicha enfermedad.
- 10 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en donde dicho valor de la razón PCA3/marcador específico de próstata y dicha puntuación de Gleason se correlacionan con una predicción de la respuesta del paciente y/o una previsión del riesgo de enfermedad.
18. Procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, en donde dicha muestra de orina se obtiene a partir de un paciente que está en tratamiento contra el cáncer de próstata entre dicho primer punto temporal y dicho punto temporal posterior, con lo que se monitoriza un efecto de dicho tratamiento sobre el crecimiento tumoral del cáncer o la progresión del cáncer de próstata.
- 15 19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y 15 a 18, que comprende:
- (a) realizar un ensayo *in vitro* de amplificación de ácidos nucleicos en dicha muestra de orina de dicho paciente o extracto de la misma con una primera pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico de PCA3 específico de cáncer de próstata y una segunda pareja de cebadores que es específica de una secuencia de ácido nucleico del marcador específico de próstata;
- 20 (b) cuantificar dicha secuencia de ácido nucleico de PCA3 y dicha secuencia de ácido nucleico del marcador específico de próstata; y
- (c) calcular una razón normalizada de PCA3 en función del marcador específico de próstata, en donde dicha razón se puede correlacionar con un nivel de ARNm de PCA3 y un nivel de ARNm del marcador específico de próstata en dicho paciente,
- 25 en donde dicha razón normalizada de PCA3 en función del marcador específico de próstata se correlaciona positivamente con un grado o un estadio del cáncer de próstata.
- 30 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde dicho marcador específico de próstata se selecciona del grupo que consiste en: PSA, hK2/KLK2, PMSA, transglutaminasa 4, fosfatasa ácida, PCGEM1, NKX3.1, antígeno de células madre prostáticas (PSCA), gen 1 inductor de tumor de próstata (PTI-1), PCGEM-1, PDEF, TMPRSS2 y prostasa.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2A**



**FIGURA 2B**

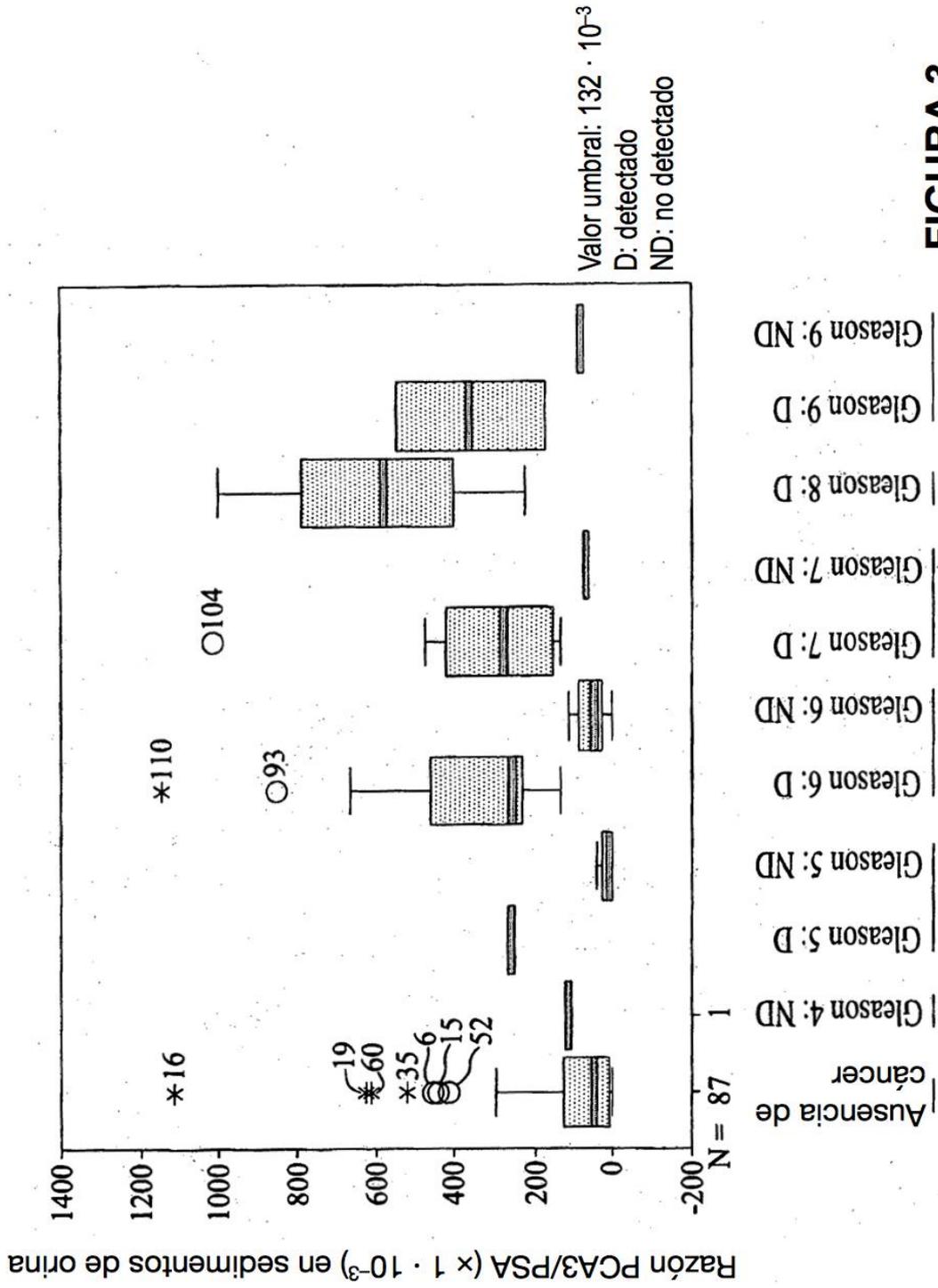


FIGURA 3

PCA3 y puntuación de Gleason: UMCN

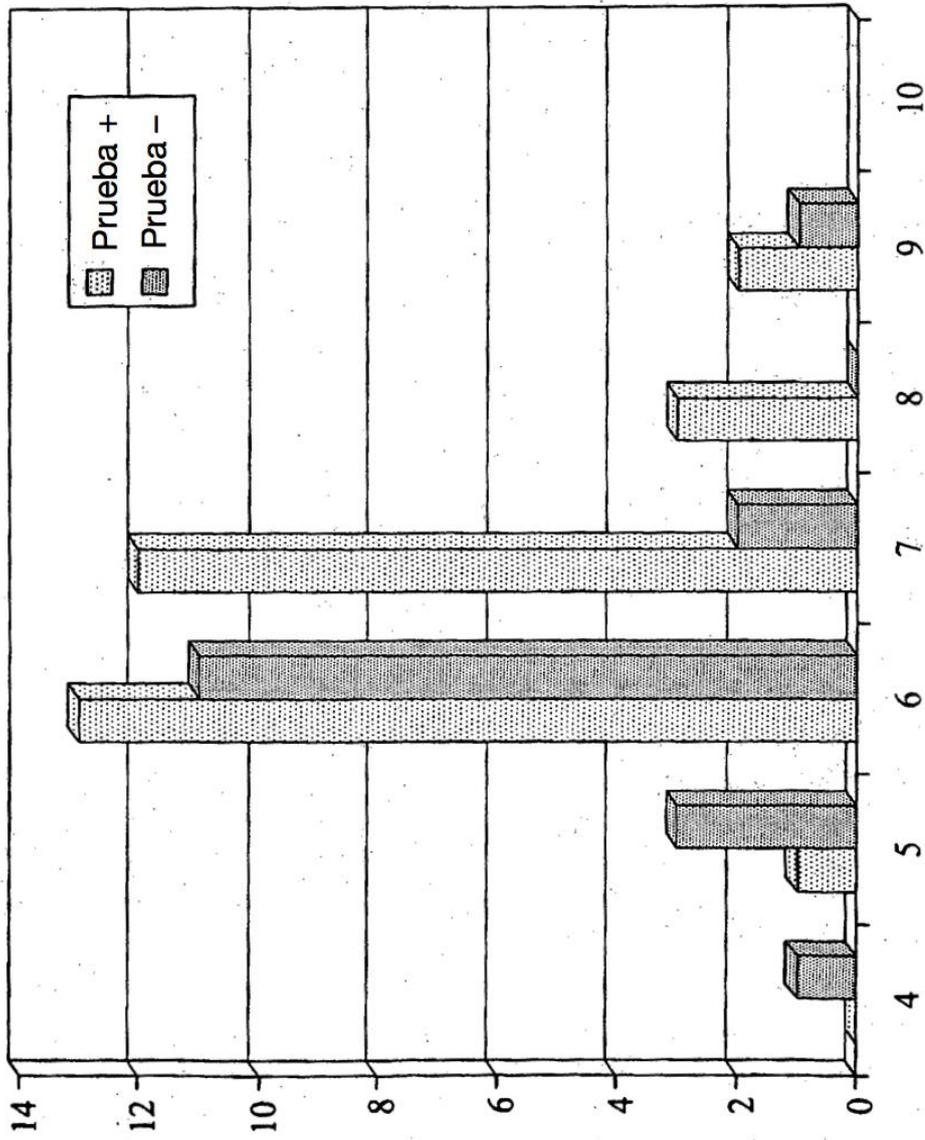


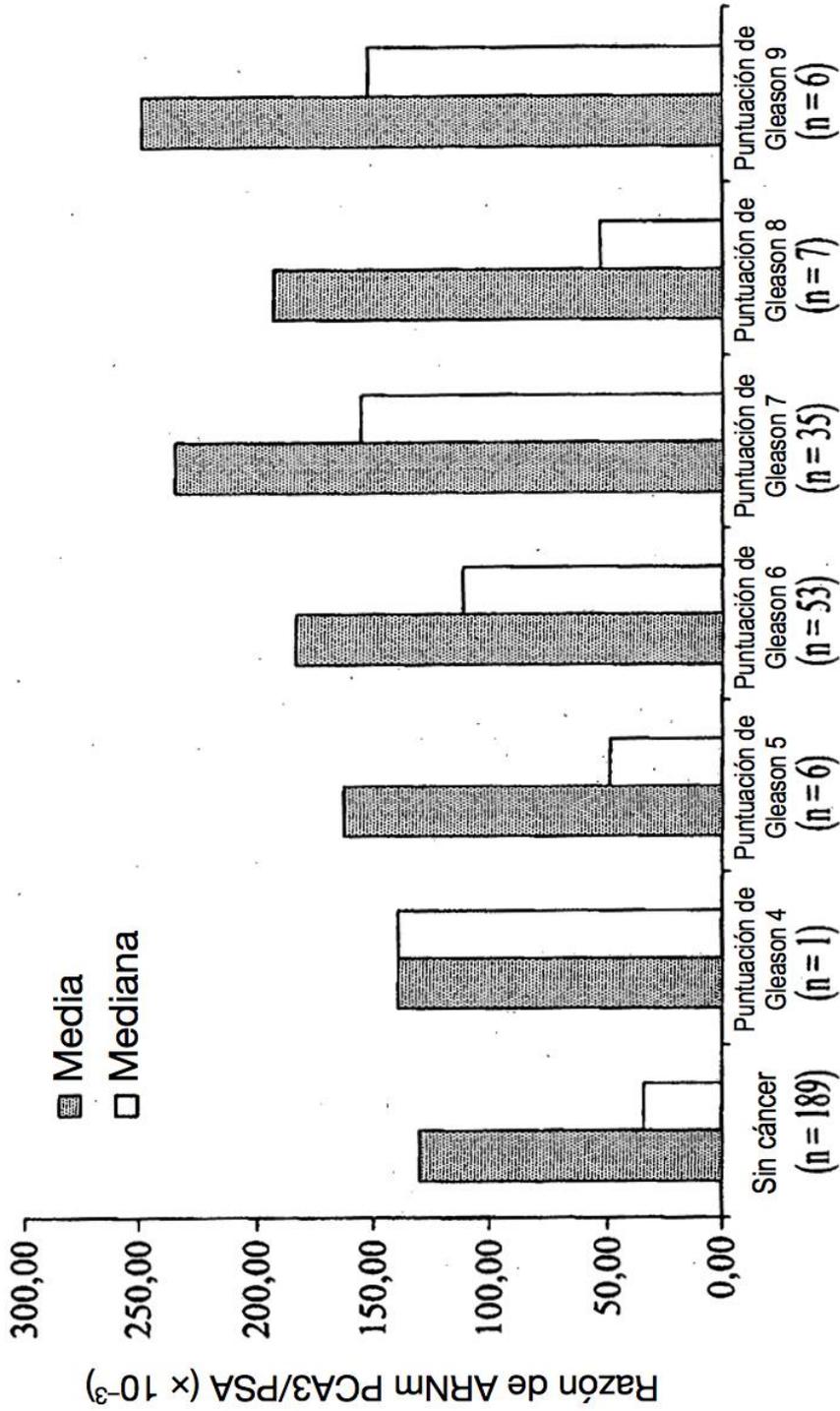
FIGURA 4

**Media y mediana de la razón entre el ARNm de PCA3/PSA frente a la puntuación de Gleason en biopsias**

|                             | Media  | Mediana |
|-----------------------------|--------|---------|
| Sin cáncer (n = 189)        | 129,85 | 34,00   |
| Puntuación Gleason 4 (n=1)  | 140,00 | 140,00  |
| Puntuación Gleason 5 (n=6)  | 162,33 | 48,50   |
| Puntuación Gleason 6 (n=53) | 183,19 | 112,00  |
| Puntuación Gleason 7 (n=35) | 234,63 | 155,00  |
| Puntuación Gleason 8 (n=7)  | 192,86 | 53,00   |
| Puntuación Gleason 9 (n=6)  | 248,67 | 152,50  |

**Figura 5**

Media y mediana de la razón de ARNm PCA3/PSA frente a la puntuación de Gleason en las biopsias



Resultados de la biopsia

**FIGURA6**

**Número de casos frente a la puntuación de Gleason  
en biopsias**

|                         | Total | Razón entre los ARNm de<br>PCA3/PSA > 132 x 10 <sup>-3</sup> | Razón entre los ARNm de<br>PCA3/PSA < 132 x 10 <sup>-3</sup> |
|-------------------------|-------|--|--|
| Puntuación de Gleason 4 | 1     | 1  | 0  |
| Puntuación de Gleason 5 | 6     | 2  | 4  |
| Puntuación de Gleason 6 | 53    | 24   | 29   |
| Puntuación de Gleason 7 | 35    | 24   | 11   |
| Puntuación de Gleason 8 | 7     | 1  | 6  |
| Puntuación de Gleason 9 | 6     | 3  | 3  |
|                         | 108   |  |  |

**Figura 7**

Número de casos frente a la puntuación de Gleason en las biopsias

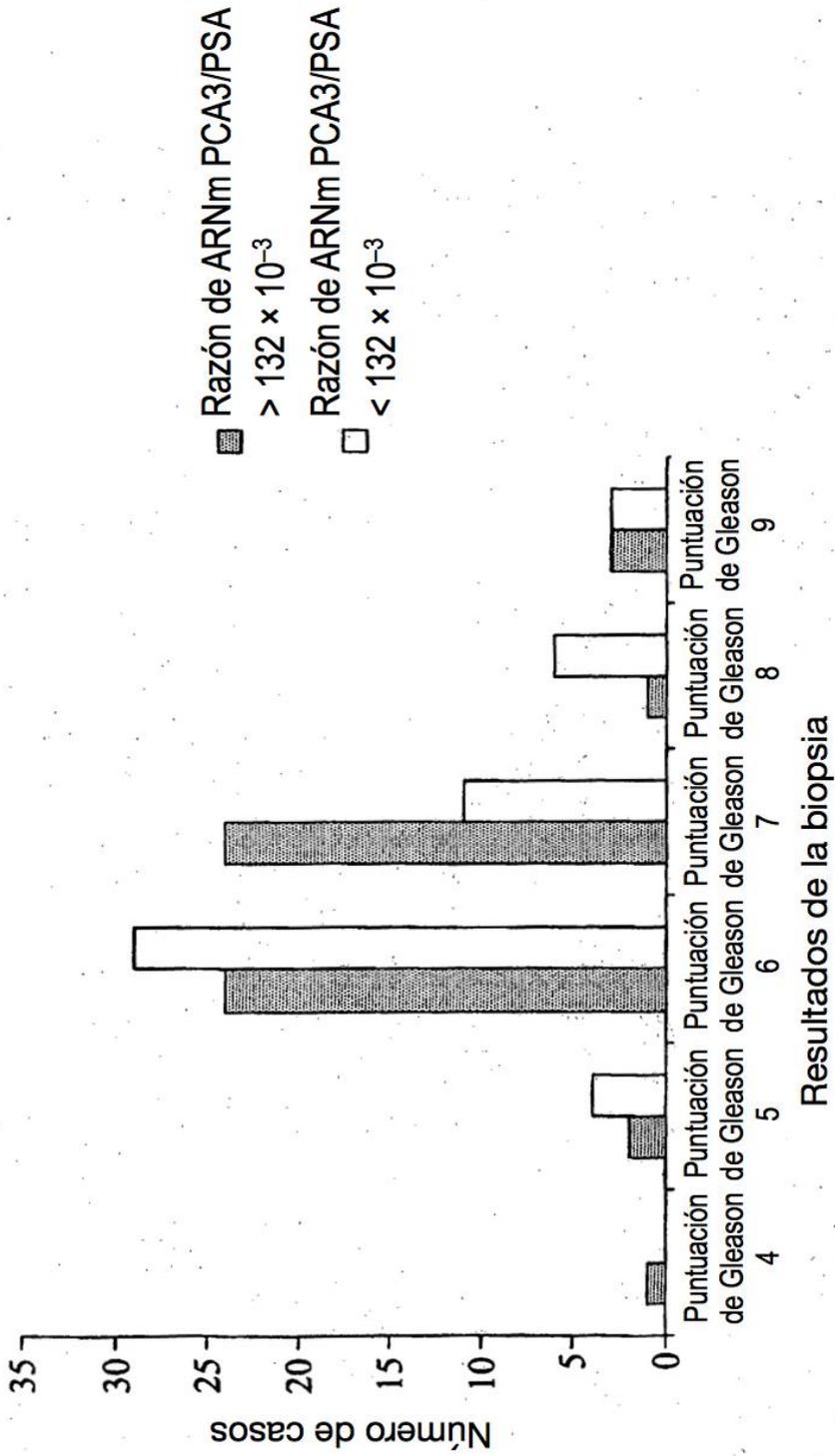
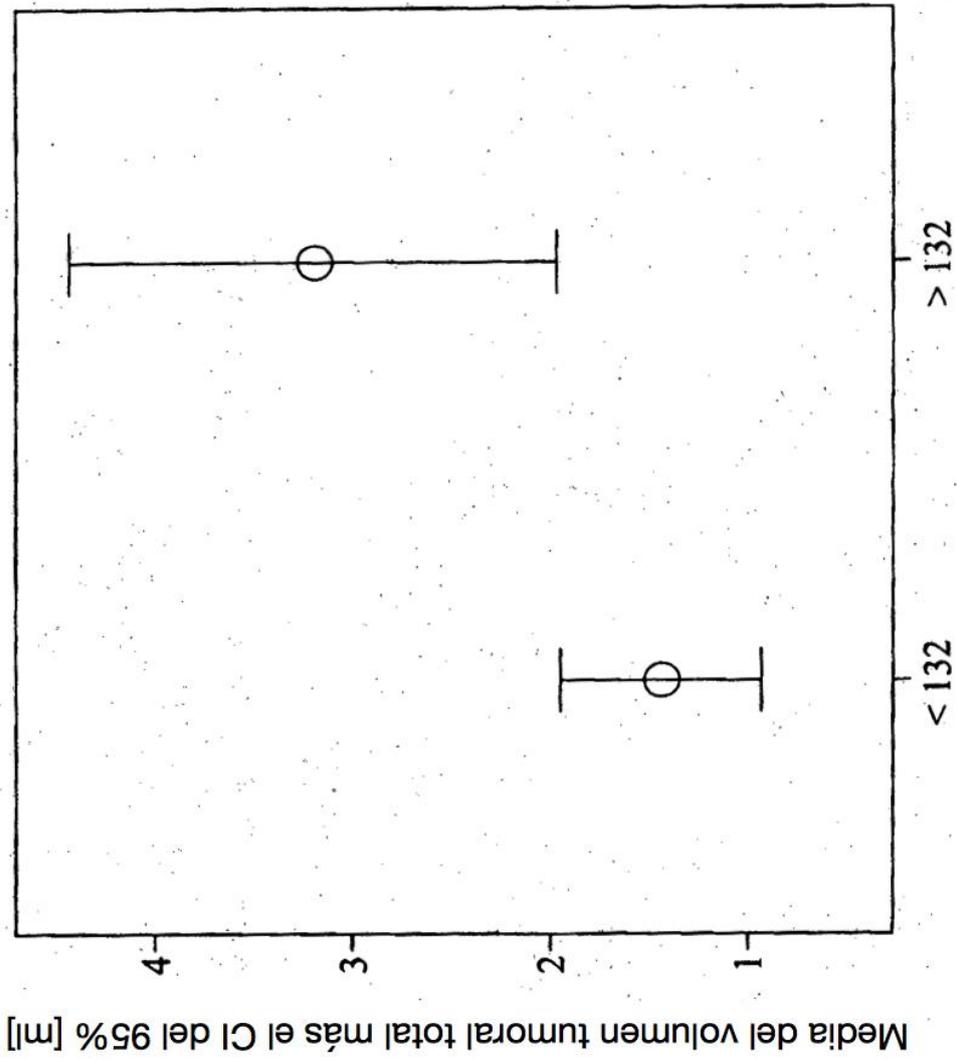


FIGURA 8



**FIGURA 9**  
Razón de ARN PCA3/PSA ( $\times 10^{-3}$ )