

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 183**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/US2012/070746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101612**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12815922 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2798082**

54 Título: **Materiales y procedimientos para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento terapéutico/profiláctico del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**30.12.2011 US 201161582212 P**

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

**19.09.2017**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, YING;  
MORRISON, LARRY;  
PESTOVA, EKATERINA y  
SOKOLOVA, IRINA**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**ES 2 633 183 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

Materiales y procedimientos para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento terapéutico/profiláctico del cáncer de próstata

5

## CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente descripción se refiere a procedimientos de diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer, en particular cáncer de próstata, la detección de alteraciones fenotípicas y genotípicas, inmunofluorescencia, e hibridación in situ, así como un conjunto de sondas y un kit útiles en tales procedimientos.

10

## ANTECEDENTES

[0002] El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común en los hombres, y, después del cáncer de pulmón, la segunda causa principal de muerte en los hombres. Se estimaron 217.730 nuevos casos en 2010 que dieron lugar a 32.050 muertes (www.cancer.gov). La mayoría de los tumores están confinados a la próstata. Otros están localizados clínicamente en la zona peri-prostática, pero se extienden a través de la cápsula prostática y pueden implicar las vesículas seminales. Los tumores restantes son metastásicos.

15

20

[0003] La ausencia de marcadores de diagnóstico fiables que permitan la detección precoz y precisa de los tumores cuando están confinados a la próstata, así como marcadores de pronóstico que permitan la predicción de la progresión de la enfermedad, son un problema fundamental en el tratamiento del cáncer de próstata. La detección precoz y el diagnóstico del cáncer de próstata actualmente se basa en el examen rectal digital (DRE), la medición de antígeno prostático específico (PSA), la ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB). El enfoque de diagnóstico principal emplea una combinación de DRE y la medición de los niveles séricos de PSA; sin embargo, este enfoque tiene limitaciones importantes. La detección de una elevación en el nivel de PSA es más sensible que específica (Thompson et al, NEJM 350: 2239-2246 (2004)). En consecuencia, más hombres se someten innecesariamente a la biopsia de aguja debido a la prueba de PSA y, por desgracia, la naturaleza focal del cáncer de próstata da lugar a errores en el muestreo de biopsia con aguja con tasas de falsos negativos del 15-30% durante el diagnóstico (Campos-Fernandes et al., Eur. Urol 55: 600-609 (2009)). De los aproximadamente 1,2 millones de pacientes que se someten a una biopsia de próstata cada año en los EE.UU., el 70-80% reciben resultados negativos, pero no pueden estar tranquilos porque un cáncer podría haberse escapado por un error de muestreo (Nonn et al, Prostate. 69: 1470-1479 (2009)). Por lo tanto, repetir biopsias (segunda, tercera o cuarta) son necesarias debido a los niveles elevados continuos de PSA (Campos-Fernandes et al. (2009), supra).

25

30

35

[0004] Además de PSA, se han identificado otros marcadores y procedimientos. Por ejemplo, la medición del nivel de la amplificación del gen HER-2/neu por hibridación in situ fluorescente (FISH) se ha revelado como un procedimiento para determinar la gravedad del cáncer de próstata (Publicación de solicitud de patente internacional No. WO 1998/045479). La determinación de la presencia de un segmento de la banda cromosómica 8q24.1-24.2 amplificado ha sido divulgado como un procedimiento de diagnóstico de la progresión del cáncer de próstata (patente de Estados Unidos No. 5.658.730). La determinación de la pérdida del locus 8p21-22, una ganancia del cromosoma 8, y un aumento adicional del número de copias de c-myc respecto al número de copia del centrómero se ha revelado como un procedimiento de pronosticar el cáncer de próstata (patente de Estados Unidos No. 6.613.510). La determinación del patrón de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas que comprenden una sonda para el locus 8p, tal como 8p21-22, y una sonda para el locus 8q24 y la correlación del patrón de hibridación con el diagnóstico de cáncer de próstata también se ha descrito (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos. No. 2003/0091994). Una ganancia de 8q24 (c-myc) y una pérdida de heterocigosidad de 8p21-22 (LPL) (Bova y otros, Cancer Res. 53: 3869-3873 (1993); Kagan et al, Oncogene 11: 2121-2126. (1995); y Emmert-Buck et al, Cancer Res 55: 2959-2962 (1995)) y 10q23 (PTEN) (Yoshimoto et al, Br J. Cancer 97 (5): 678-685 (3 septiembre 2007; epub 14 de agosto, 2007) también ha sido descrito. El ensayo de la pérdida de heterocigosidad en uno o más loci en uno o más de los cromosomas 1-22 se ha descrito como un procedimiento de detección de una célula con un fenotipo neoplásico o preneoplásico (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0165895). La detección de un aumento en el nivel de expresión del gen 20P1F12/TMPRSS2 se ha descrito como un procedimiento de identificación de cáncer de próstata (patente de Estados Unidos No. 7.037.667). La detección de una ruptura en la secuencia del cromosoma humano 12q24 en el locus del gen de SMRT utilizando FISH se ha descrito como un procedimiento para determinar la probabilidad de metástasis del cáncer de próstata (patente de Estados Unidos No. 7.425.414). La determinación del nivel de un constituyente como ARN de PTEN se ha descrito como un procedimiento para evaluar la presencia de cáncer de próstata (Publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2008/121132). La detección de una fusión de genes ACSL3-ETS ha sido descrita como un procedimiento de diagnóstico de cáncer de próstata (Publicación de solicitud de patente internacional WO 2009/144460). La detección de la presencia de una fusión de genes que tiene una parte de una región reguladora de la transcripción de un gen TMPRSS2 y una porción 3' de un gen de ERG, ETV1 o ETV4 ha sido descrita como un procedimiento de identificación de cáncer de próstata (patente de Estados Unidos. No. 7.718.369), así como la predicción de la recurrencia, la progresión y el potencial metastásico (Publicación de solicitud de patente internacional WO 2010/056993). La detección de la sobreexpresión de PITX2 se ha descrito como un procedimiento

40

45

50

55

60

65

para diagnosticar la presencia o riesgo de cáncer de próstata (Publicación de solicitud de patente internacional No. WO 2010/099577). La identificación de un aumento del nivel de un ácido nucleico o polipéptido seleccionado del OCT3/4, Nanog, Sox2, c-myc, IF4, queratina 8, y uPAR se ha descrito como un procedimiento de identificación de un carcinoma de próstata (Publicación de solicitud de patente internacional No. 2011/037643).

**[0005]** Además de lo anterior, se ha estudiado el “efecto campo” del cáncer de próstata por varios grupos. Utilizando el análisis de imagen digital, los investigadores han identificado cambios sutiles de la morfología nuclear en el tejido histológicamente benigno adyacente al cáncer de próstata (Qian et al, Hum Pathol 28: 143-148 (1997); y Veltri et al, Clin Cancer Res. 10: 3.465 a 3473 (2004)). Utilizando microarrays de ADNc, se describió la diferencia de perfil de expresión génica entre el tejido adyacente normal de cáncer de próstata y el tejido normal obtenido a partir de donantes de órganos (Chandran et al, BMC Cancer 5 (1): 45 (2005); Yu et al, J. Clin Oncol 22 (14): 2790-2799 (2004); y Rizzi et al, PLoS ONE 3 (10): e3617 (2008)). En el documento WO 03/012067 se utilizaron microarrays de ADNc para determinar los niveles de expresión en tejidos de cáncer de próstata. También se han utilizado Arrays affymetrix para analizar la expresión génica en muestras de próstata (Balakumaran et al, Cancer Research 69 (19): 7803-7810 (2009)). Los perfiles de expresión génica de cáncer de próstata se revisan en Reynolds, Cancer Letters 271 (1): 13-24 (2008) y la aplicación del array CGH a cánceres de próstata se revisa en Ishkanian et al, Acta Oncologica 49 (7): 888-894 (2010).

**[0006]** Usando inmunohistoquímica, se observaron cambios de expresión de proteínas de múltiples biomarcadores en glándulas prostáticas con neoplasia intraepitelial en grado normal y elevado cercanas y distantes (HGPIIN). Estos marcadores incluyen Mcm-2 y Ki67 (Ananthanarayanan et al, Cancer BMC. 6: 73 (2006); Santinelli et al, Am J. Clin Pathol 128 (4): 657-666 (2007)),  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) (Santinelli et al (2007), supra; y Ananthanarayanan et al, Prostate 63 (4): 341-346 (2005)), y del receptor de andrógenos (AR) (Olapade-Olaopa et al, Clin Cancer Res 5 (3): 569-576 (1999)), etc. Usando la micro-disección por captura pcon láser y PCR específica de metilación cuantitativa, muchos grupos también observaron un efecto de campo para el silenciamiento de genes a través de la hipermetilación en la carcinogénesis de próstata (Mehrotra et al, Prostate 68 (2): 152-160 (2008); y Aitchison et al, Prostate 67 (6): 638-644 (2007)). Los genes incluyen GSTP1, APC, RASSF1A, HIN-1 y RARB2.

**[0007]** En vista de lo anterior, sigue habiendo una necesidad de procedimientos de diagnóstico y pronóstico más fiables e informativos en el tratamiento del cáncer de próstata. La presente descripción tiene por objeto proporcionar un conjunto de marcadores, así como los procedimientos de uso y un kit que comprende el conjunto de marcadores, para el diagnóstico, el pronóstico y la evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer, en particular el cáncer de próstata. Este y otros objetivos y ventajas, así como características inventivas, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en este documento.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA

**[0008]** Basándose en la descripción presentada en este documento, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar el cáncer de próstata en un paciente, cuyo procedimiento comprende: poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprenden una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en el que un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y % de alteraciones de cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata.

**[0009]** En otro aspecto, la invención proporciona un conjunto de sondas que consisten en:

- (a) una sonda específica del locus para MYC;
- (b) una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN);
- (c) una sonda centromérica para el cromosoma 8; y
- (d) una sonda centromérica para el cromosoma 7 o una sonda específica del locus para la lipoproteína lipasa (LPL).

**[0010]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit que comprende sondas en el que las sondas consisten en un conjunto de sondas que consisten en:

- (a) un conjunto de sondas que permiten el diagnóstico del cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas consiste en una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, y
- (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente.

**[0011]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para detectar el cáncer de próstata en un paciente, cuyo procedimiento comprende:

poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprenden una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para lipoproteína lipasa (LPL), una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) y una sonda centromérica para el cromosoma 8 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas,

en el que un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18), en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata, y

en el que un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 superior a 16 (con un intervalo de 9 a 18), en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata

**[0012]** En un aspecto adicional, la invención proporciona un conjunto de sondas que consisten en:

(a) una sonda específica del locus para MYC;

(b) una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (LPL) o una sonda centromérica para el cromosoma 7;

(c) una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN);

(d) una sonda centromérica para el cromosoma 8; y

(e) un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR), que puede estar marcado de forma detectable.

**[0013]** En otro aspecto adicional, la invención proporciona un kit que comprende sondas en el que las sondas consisten en un conjunto de sondas que consisten en:

(a) un conjunto de sondas que permiten el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas consiste en una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (LPL), una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), y una sonda centromérica para el cromosoma 8 y

(b) instrucciones para el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente.

**[0014]** Las realizaciones adicionales de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

**[0015]** Se proporciona un procedimiento de detección de cáncer de próstata en un paciente. Las alternaciones genómicas en un tumor de próstata (tumor maligno; designado en el presente documento "región del tumor de interés (ROI)") o un área adyacente, aparentemente benigna, de una próstata (designado en el presente documento "ROI benigno"), tales como en una o más secciones de tejido de una próstata, se identifican y se ensayan de acuerdo con el procedimiento. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprenden una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en el que un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y un % de alteraciones del cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata.

**[0016]** En otro ejemplo, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprenden una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (LPL), una sonda específica del locus para PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de las células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Se eligieron puntos de corte del combinado "% de ganancia de MYC/LPL o % de alteraciones de CEP8 o % de pérdidas de PTEN o % de ganancia de MYC/CEP8" para los parámetros de FISH de ROI del tumor en la región de rendimiento diana: el cuadrante entre una sensibilidad del

97,1% y un 96,2% de especificidad. Un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 de más 16 (con un intervalo de 9 a 18) en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Se eligieron cortes del combinado "% de ganancia de MYC/LPL o % de alteraciones de CEP8 o % de pérdida de PTEN o % de ganancias de MYC/CEP8" para los parámetros FISH de la ROI benigna en la región de rendimiento diana: el cuadrante entre la sensibilidad del 80,8% y el 82,4% de especificidad.

**[0017]** La muestra de células de la próstata puede ser una sección de la próstata del paciente. La sección puede estar fijada con formalina y bañada en parafina y se coloca en un portaobjetos de microscopio. Antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento puede comprender además evaluar morfológicamente la sección e identificar al menos una ROI de tumor, al menos una ROI benigna, o al menos una ROI de tumor y al menos al menos una ROI benigna. Alternativamente, antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento puede comprender además evaluar la sección mediante inmunofluorescencia e identificar al menos una ROI de tumor. La evaluación de la sección por inmunofluorescencia puede comprender poner en contacto la sección con un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) marcado de forma detectable y detectar la sobreexpresión de AMACR, en el que la sobreexpresión de AMACR en una región de la sección indica la presencia de una ROI de tumor. Antes de la evaluación de la sección por inmunofluorescencia, el procedimiento puede comprender además tratar la sección con recuperación de epítomos inducida por calor.

**[0018]** También se proporciona un conjunto de sondas. En un caso, el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para PTEN, una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, en el que el conjunto de sondas comprende opcionalmente además un anticuerpo contra AMACR, que puede estar marcado de forma detectable. En otro ejemplo, el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para LPL, una sonda específica del locus para PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8. El conjunto de sondas comprende opcionalmente además un anticuerpo contra AMACR, que puede estar marcado de forma detectable.

**[0019]** También se proporciona un kit. En un caso, el kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para PTEN, una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, y (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente, en el que las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de la próstata obtenidas del paciente la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y un % de alteraciones del cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. En otro caso, el kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para la LPL, un locus específico sonda para PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8 y (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente, en el que las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de la próstata obtenidas del paciente la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de las células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 de más 16 (con un intervalo de 9 a 18) en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. El kit puede comprender además instrucciones para evaluar morfológicamente una sección de una próstata de un paciente e identificar al menos una ROI de tumor, al menos una ROI benigna, o al menos una ROI de tumor y al menos una ROI benigna antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas. Alternativamente, el kit puede comprender además instrucciones para evaluar una sección de una próstata de un paciente por inmunofluorescencia e identificar la presencia de una ROI de tumor antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en cuyo caso el kit puede comprender además un anticuerpo contra AMACR, que puede estar marcado de forma detectable, y las instrucciones evaluar una sección de una próstata de un paciente por inmunofluorescencia pueden comprender además poner en contacto la sección con un anticuerpo contra AMACR marcado de forma detectable y detectar la sobreexpresión de AMACR, en el que la sobreexpresión de AMACR en una región de la sección indica la presencia de una ROI de tumor. Las instrucciones pueden comprender además

tratar la sección con recuperación de epítomos inducida por calor antes de la evaluación de la sección de una próstata de un paciente por inmunofluorescencia.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5
- [0020]**  
 La figura 1a es un gráfico de % de pérdida y % de ganancia versus locus de la sonda enumeradora de cromosoma (CEP) 8 en muestras de hiperplasia prostática benigna (BPH) y de cáncer (región de interés de tumor de ROI de tumor).
- 10 La figura 1b es un gráfico de % de pérdida y % de ganancia versus locus para la sonda enumeradora del cromosoma (CEP) 8 en las muestras de BPH y cáncer (ROI benigna).  
 La figura 2a es un gráfico de sensibilidad frente a 1-especificidad (curva receiver operating characteristic (ROC)) para ROI del tumor, en donde (■) es el porcentaje de alteraciones para la sonda enumeradora del cromosoma 8 (% de alteraciones de CEP 8), (▲) es el porcentaje de ganancia de MYC/lipoproteína lipasa (LPL) (% de ganancia de MYC/LPL), (●) es el porcentaje de ganancia de MYC/CEP 8 (% de ganancia de MYC/CEP8), y (□) es el porcentaje de pérdida de fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) (% pérdida de PTEN), y (O) es la combinación de corte de CEP 8, MYC, LPL, y PTEN (corte de 4 sondas).
- 15 La figura 2b es un gráfico de sensibilidad frente a 1-especificidad (curva ROC) para ROI benigna, en donde (■) es el porcentaje de alteraciones para la sonda enumeradora del cromosoma 8 (% de alteraciones de CEP 8), (▲) es el porcentaje de ganancia de MYC/lipoproteína lipasa (LPL) (% de ganancia de MYC/LPL), (●) es el porcentaje de ganancia de MYC/CEP 8 (% de ganancia de MYC/CEP8), y (□) es el porcentaje de pérdida de fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) (% pérdida de PTEN), y (O) es la combinación de corte de CEP 8, MYC, LPL, y PTEN (corte de 4 sondas).
- 20 La figura 3 es una tabla de valores de corte de diagnóstico para % de alteraciones de CEP 8, % de ganancia de MYC/LPL, % de ganancia de MYC/CEP8, y % de pérdida de PTEN.
- 25 La figura 4 es un gráfico de sensibilidad frente a 1-especificidad (curva ROC) para los parámetros de FISH individuales (% de pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, y % de ganancia de CEP8) y la combinación de cuatro sondas. Los datos se calcularon a partir de la evaluación FISH de las 17 muestras de ROI benigna y 26 de HPB. El gráfico ROC para la combinación de cuatro sondas se basa en las 33 muestras de ROI de tumor y las 26 muestras de BPH. Las AUC máximas de las curvas ROC se muestran en la tabla.
- 30 La figura 5 es una tabla de valores de corte de diagnóstico para % de Pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, y % de ganancia de CEP8.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 35
- [0021]** La presente descripción proporciona un conjunto de marcadores, así como un procedimiento de uso y un kit que comprende el conjunto de marcadores, para el diagnóstico, el pronóstico y la evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer, en particular el cáncer de próstata. Los términos siguientes son pertinentes a la presente descripción:
- 40 "aproximadamente" se refiere a aproximadamente una variación de +/- 10% del valor indicado. Debe entenderse que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, se haga o no referencia específica al mismo.
- 45 **[0022]** "Biomarcador", tal como se define por el Instituto Nacional de Salud, es "una característica que se mide y se evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica."
- [0023]** "Sonda de enumeración de cromosomas (CEP)" o "sonda centromérica" es cualquier sonda que permite que el número de cromosomas específicos en una célula se enumere. Una sonda de enumeración de cromosomas típicamente reconoce y se une a una región cerca de (referida como "pericentromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitiva (por ejemplo, ADN alfa-satélite). El centrómero de un cromosoma se considera típicamente que representa ese cromosoma, ya que se requiere el centrómero para la segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica particular pueden diferenciarse de la pérdida o ganancia de todo el cromosoma (aneusomía), dentro del cual normalmente se encuentra, mediante la comparación del número de señales que corresponde al locus particular (número de copias) con el número de señales correspondientes al centrómero. Un procedimiento para hacer esta comparación es dividir el número de señales que representan el lugar geométrico por el número de señales que representan el centrómero. Relaciones de menos de uno indican pérdida relativa o delección del locus, y las relaciones mayores que uno indican ganancia relativa o la amplificación del locus. Del mismo modo, la comparación puede hacerse entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo sobre dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma. En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que una sonda del brazo cromosómico alternativamente se puede usar para aproximar la pérdida o ganancia cromosómica total. Sin embargo, tales sondas no son tan precisas en la enumeración de cromosomas, ya que la pérdida de las señales de estas sondas no siempre puede indicar una pérdida de todo el cromosoma. Ejemplos de sondas de enumeración de cromosoma incluyen sondas CEP®
- 50
- 55
- 60
- 65

comercialmente disponibles de Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

**[0024]** "Número de copias" es una medida de ADN, ya sea de un solo locus, uno o más locus, o un genoma completo. Un "número de copias" de dos es de "tipo salvaje" en un ser humano (a causa de la diploidía, a excepción de los cromosomas sexuales). Un "número de copias" distinto de dos en un ser humano (a excepción de los cromosomas sexuales) se desvía de tipo salvaje. Tales desviaciones incluyen amplificaciones, es decir, incrementos en el número de copias, y supresiones, es decir, la disminución de números de copias e incluso la ausencia de números de copias.

**[0025]** "Marcado", "marcado con un marcador detectable," y "marcado de forma detectable" se usan indistintamente en este documento para indicar que una entidad (por ejemplo, una sonda) se puede detectar. "Marcador" y "marcador detectable" significan un resto unido a una entidad para hacer la entidad detectable, tal como un resto unido a una sonda para hacer la sonda detectable tras la unión a una secuencia diana. El resto, en sí, puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otro resto. El uso del término "marcado de forma detectable" pretende abarcar marcaje. El marcaje detectable puede seleccionarse de tal manera que el marcador genera una señal, que puede ser medida, y la intensidad de la cual es proporcional a la cantidad de entidad enlazada. Una amplia variedad de sistemas para el marcaje y/o la detección de moléculas, tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, sondas, son bien conocidos. Los ácidos nucleicos marcados se pueden preparar mediante la incorporación o la conjugación de un marcador que es directamente o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Los marcadores detectables adecuados incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, partículas magnéticas, partículas densas de electrones, marcadores de masa, marcadores de spin, haptenos, y similares. En el presente documento se prefieren los fluoróforos y agentes quimioluminiscentes.

**[0026]** "Sonda específica del locus" e "identificador específico del locus (LSI)" se puede usar de forma intercambiable en el presente documento para referirse a una sonda que se une selectivamente a un locus específico en una región en un cromosoma, por ejemplo, un locus que se ha determinado que experimenta ganancia/pérdida en la metástasis. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes, o ambas, incluyendo exones, intrones, y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.

**[0027]** "Muestra de ácido nucleico" se refiere a una muestra que comprende ácido nucleico en una forma adecuada para la hibridación con una sonda, tal como una muestra que comprende núcleos o ácidos nucleicos aislados o purificados a partir de tales núcleos. La muestra de ácido nucleico puede comprender ADN genómico total o parcial (por ejemplo, cromosoma o cromosomas particulares), ARNm total o parcial (por ejemplo, cromosoma o cromosomas o gen o genes particulares), o secuencia o secuencias seleccionadas. Los cromosomas condensados (tal como están presentes en la interfase o metafase) son adecuados para el uso como dianas en la hibridación in situ, tal como FISH.

**[0028]** "Punto de corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren en general a un valor de corte que se utiliza para evaluar los resultados de eficacia de diagnóstico/pronóstico/terapéutica mediante la comparación de los resultados del ensayo contra el punto de corte/nivel predeterminado, donde el punto de corte/nivel predeterminado se ha relacionado o asociado con varios parámetros clínicos (por ejemplo, gravedad de la enfermedad, la progresión/no progresión/de mejora, etc.).

**[0029]** "Sonda", en el contexto de la presente descripción, es un oligonucleótido o polinucleótido que se puede hibridar selectivamente con al menos una parte de una secuencia diana en condiciones que permiten o promueven la hibridación selectiva. En general, una sonda puede ser complementaria a la cadena codificante o sentido (+) de ADN o complementaria a la cadena no codificante o contrasentido (-) de ADN (a veces referida como "complementaria inversa"). Las sondas pueden variar significativamente de longitud. Una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, tal como aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, puede ser preferible en algunas aplicaciones, mientras que una longitud de aproximadamente 50-1x10<sup>5</sup> nucleótidos puede ser preferible para sondas cromosómicas y una longitud de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 800.000 nucleótidos puede ser preferible para las sondas específicas de locus.

**[0030]** "Cáncer de próstata" incluye todos los tipos de cáncer de próstata, tales como adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células escamosas, sarcoma y carcinoma de células de transición. La mayoría de los cánceres de próstata (alrededor del 95%) es el adenocarcinoma. El cáncer de próstata se distingue de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN, que se distingue además como de bajo grado o de alto grado), que es un precursor del cáncer de próstata. El carcinoma de células pequeñas y el carcinoma de células escamosas tienden a ser muy agresivos en la naturaleza y no conducen a un aumento en el antígeno prostático específico (PSA). El carcinoma de células de transición rara vez se desarrolla en la próstata, pero se deriva de los tumores primarios en la vejiga y/o la uretra.

[0031] "Hibridar selectivamente con" (así como "hibridación selectiva", "hibridar específicamente con", y "hibridación específica"), en el contexto de la presente descripción, se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda se hibridará preferentemente con su secuencia diana, y en menor grado a, o nada en absoluto a, otras secuencias no diana. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácido nucleico (por ejemplo, como en "array", hibridación de Southern, hibridación Northern, o FISH) son dependientes de la secuencia, y se diferencian en diferentes condiciones. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en, por ejemplo, Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, "Overview of Principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, NY (1993) ("Tijssen"). En general, la hibridación y condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5°C inferior al punto de fusión térmico (T<sub>m</sub>) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean igual a la T<sub>m</sub> para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios, que tienen más de 100 residuos complementarios, en una matriz o en un filtro en una transferencia Southern o Northern, es de 42°C usando soluciones de hibridación estándar (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed, Vol 13, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (2001)).

[0032] "Secuencia diana", "región diana" y "ácido nucleico diana" se refieren a una secuencia de nucleótidos que reside en una localización cromosómica específica cuya pérdida y/o ganancia, por ejemplo, se determina. La terminología usada en este documento es para el propósito de describir los casos y realizaciones particulares solamente y no se pretende de otro modo que sean limitantes.

***Procedimientos de detectar, diagnosticar, pronosticar, y controlar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del cáncer de próstata***

[0033] Se proporciona un procedimiento de detección de cáncer de próstata en un paciente. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en el que un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y un % de alteraciones del cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. En otro caso, el procedimiento comprende poner en contacto una muestra de células de la próstata, tal como una sección de tejido o células obtenidas de la misma, del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (locus de LPL), una sonda específica del locus para el locus de PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de las células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 de más 16 (con un intervalo de 9 a 18) en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Se eligieron puntos de corte del combinado "% de ganancia de MYC/LPL o % de alteraciones de CEP8 o % de pérdida de PTEN o % de ganancia de MYC/CEP8" para los parámetros de FISH de ROI del tumor en la región de rendimiento diana: el cuadrante entre una sensibilidad del 97,1% y un 96,2% de especificidad. Se eligieron puntos de corte del combinado "% de ganancia de MYC/LPL o % de alteraciones de CEP8 o % de pérdida de PTEN o % de ganancias de MYC/CEP8" para los parámetros FISH de la ROI benigna en la región de rendimiento diana: el cuadrante entre la sensibilidad del 80,8% y el 82,4% de especificidad.

[0034] El conjunto de sondas puede comprender además uno o más de una sonda específica del locus p16 (9p21), fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; locus 7p21), una sonda centromérica para el cromosoma 3, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 10, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El conjunto de sondas marcadas de forma detectable puede comprender además uno o más de



una sonda específica del locus para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27Kip1 (4q43), una sonda específica del locus para la quinasa 2 dependiente de ciclina (CDK2; 12q13), una sonda específica del locus para la ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda específica del locus para la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12).

**[0035]** Se proporciona un procedimiento de pretratamiento de la muestra histológica y de hibridación para el cáncer de próstata. Se cocieron los portaobjetos de muestras histológicas (secciones) FFPE (fijadas en formalina y bañadas en parafina) a 56°C durante 2-24 horas, a continuación se pretrataron dos a tres veces en Hemo-De (Scientific Safety Solvents) o Xylene durante 5 a 10 minutos cada uno a temperatura ambiente, seguido de dos aclarados de 1 minuto en 100% de etanol a temperatura ambiente, incubación en ácido fórmico al 45%/peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y un aclarado en agua desionizada durante 3-10 minutos. Los portaobjetos se incubaron a continuación en solución de pretratamiento (1 X SSC, pH 6,3) a 80 +/- 5°C durante 35-50 minutos, se aclararon durante 3 minutos en agua desionizada, se incubaron 22 +/- 5 minutos en pepsina al 0,15% en solución de HCl 0,1 N a 37°C, y se aclararon de nuevo durante 3 minutos en agua desionizada. Los portaobjetos se deshidrataron durante 1 minuto cada uno en 70%, 85% y 100% de etanol y a continuación se secaron al aire. Se añadieron diez microlitros de cada mezcla de hibridación de sonda respectiva (tampón LSI®, ADN de bloqueo, sondas marcadas) a las muestras, y se aplicó un cubreobjetos y se selló con cemento de caucho. Los portaobjetos se desnaturalizaron simultáneamente durante 5 minutos a 73 +/- 2°C y se hibridaron durante 10-24 horas a 37°C en un ThermoBrite (Vysis/Abbott Molecular, Inc.) Después de la hibridación, se retiraron los cubreobjetos. La muestra se pudo colocar en una solución de lavado que consistía en 0,3x - 2x SSC y NP-40 al 0,3%-0,5%, y la temperatura de la muestra se elevó a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2-5 minutos. A continuación, el soporte que llevaba la muestra se contratiñó con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución, o tras secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contratiñó con aproximadamente 10 µl de DAPI, y se colocó un nuevo cubreobjetos se colocó sobre la muestra. A continuación, la muestra se observó o almacenó, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

**[0036]** Se proporciona un procedimiento IF-FISH a portaobjetos FFPE de próstata. Para el ensayo de FISH e inmunofluorescencia (IF) simultáneas sobre los mismos portaobjetos de tejido tumoral sólido FFPE de próstata, se desarrolló un protocolo de pretratamiento de muestras/recuperación de antígeno y se optimizó para mejores resultados en el tejido FFPE para IF-FISH.

**[0037]** La primera etapa de este procedimiento es la recuperación de antígeno. Cocer los portaobjetos FFPE de cáncer de próstata a 56°C durante dos horas durante la noche. Desparafinar mediante dos inmersiones en Hemo-De durante 10 minutos cada una. Incubar dos veces en etanol al 100% durante dos minutos cada una. Hidratar mediante la colocación en 85%, 70%, 50% y 30% de etanol durante dos minutos cada una. Sumergir en agua Milli-Q de grado molecular durante cinco minutos. Precalentar un baño de agua con recipiente Coplin que contiene tampón de citrato de sodio (tampón de citrato de sodio: citrato de sodio 10 mM, 0,05% de Tween 20, pH 6,0) hasta que la temperatura llega a 96 +/- 4°C. Incubar durante 20 - 60 minutos. Enfriar a temperatura ambiente durante 20-40 minutos en la mesa de trabajo. Lavar los portaobjetos durante cinco minutos en agua Milli-Q. Enjuagar una vez durante cinco minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

**[0038]** La segunda etapa es la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpo AMACR y ensayo de amplificación de la señal con tiramida (34). Utilizar el kit de ensayo de solución de tiramida (TSA) y seguir con el kit Alexa Fluor 488 TSA (amplificación de señal con tiramida) número 2 (Invitrogen, Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de peroxidasa endógena se bloquea mediante incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añadir reactivo de bloqueo (100 µl/portaobjetos) con incubación en una caja humidificada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añadir 100 µl de anticuerpo de conejo AMACR diluido (diluido en reactivo de bloqueo al 1% a 1: 00) con incubación durante una hora a temperatura ambiente. Lavar los portaobjetos tres veces en PBS/0,1% de Tween 20 durante cinco minutos cada uno. Diluir la solución madre de conjugado de HRP 1:100 en solución de bloqueo al 1%. Un volumen L 100 micras de esta solución de trabajo es suficiente para cubrir un estándar de 22 x 22 mm cubreobjetos. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar tres veces en PBS/0,1% de Tween 20 durante cinco minutos cada uno. Lavar una vez en PBS. Añadir 100 µl de solución de tiramida por portaobjetos seguido de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Lavar los portaobjetos en PBS durante cinco minutos. Lavar los portaobjetos durante cinco minutos en agua Milli-Q. Proceder con FISH.

[0039] La tercera etapa es el ensayo FISH. Deshidratar los portaobjetos en alcohol (70%, 85% y 100%, 1 min cada uno), y secar al aire completamente. Añadir 10 µl de solución de sonda a cada portaobjetos, y sellar el cubreobjetos sobre el portaobjetos con cemento de caucho. Desnaturalizar simultáneamente la sonda y el ADN diana a 73°C durante cinco minutos, seguido de hibridación durante la noche a 37°C. La muestra puede colocarse en la solución de lavado que consiste en 0,3x - 2x SSC y NP-40 al 0,3% - 0,5%, y la temperatura de la muestra se puede elevar a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2-5 minutos. A continuación, el soporte que lleva la muestra puede contratarse con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución, o tras secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contratarse con aproximadamente 10 µl de DAPI, y se coloca un nuevo cubreobjetos sobre la muestra. A continuación, la muestra se puede observar o almacenar, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

[0040] Con respecto a todos los procedimientos anteriores, la naturaleza/tamaño de la sonda dependerá, al menos en parte, del procedimiento utilizado para determinar un parámetro particular, por ejemplo, número de copias, relación de número de copias, o porcentaje de ganancia de un gen de interés. Cuando un procedimiento de pronóstico/diagnóstico anterior se lleva a cabo por hibridación in situ, tal como FISH, por ejemplo, la sonda puede ser relativamente grande. Cuando un procedimiento de pronóstico/diagnóstico anterior se lleva mediante otro procedimiento, la sonda puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación in situ, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen de interés.

[0041] En vista de lo anterior, una sonda para la detección de un parámetro que implica MYC, por ejemplo, como el número de copias de MYC, una relación de número de copias que implica MYC, o el porcentaje de ganancia de MYC, por hibridación in situ, tal como FISH, se hibrida preferiblemente a la región 8q24 del cromosoma 8, que comprende el gen MYC. La sonda también puede hibridarse con una región adyacente situada en el lado centromérico de 8q24, una región adyacente situada en el lado telomérico de 8q24, o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 820 kb, tal como 821 kb, de 8q24 y está centrada en el gen MYC. Una sonda para la detección de un parámetro que implica MYC por otro procedimiento puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación in situ, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen MYC (la información de la secuencia está disponible en línea a partir de fuentes, tales como GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) y GeneCards® ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))). "MYC" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y todas las sondas que pueden utilizarse para determinar un parámetro que implica MYC, ya sea el número de copias, la relación de número de copias, el aumento de porcentaje, y similares, independientemente del procedimiento particular utilizado para determinar el parámetro.

[0042] Como "MYC", "LPL" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y todas las sondas que pueden usarse para determinar un parámetro que implica LPL, ya sea el número de copias, la relación de número de copias, el aumento de porcentaje, y similares, independientemente del procedimiento particular utilizado para determinar el parámetro. "LPL" incluye una sonda que se hibrida preferiblemente a la región p22 del cromosoma 8, que comprende el gen de la LPL. La sonda de LPL también puede hibridar con una región adyacente situada en el lado centromérico de 8p22, una región adyacente situada en el lado telomérico de 8p22, o ambas. Una sonda de LPL preferida cubre aproximadamente 170 kb de 8p22 y está centrada en el gen de la LPL. "PTEN" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y todas las sondas que pueden usarse para determinar un parámetro que implica PTEN, ya sea el número de copias, la relación de número de copias, el aumento de porcentaje, y similares, independientemente del procedimiento particular utilizado para determinar el parámetro. "PTEN" incluye una sonda que se hibrida preferiblemente a la región q23 del cromosoma 10, que comprende el gen de PTEN. La sonda de PTEN también puede hibridar con una región adyacente situada en el lado centromérico de 10q23, una región adyacente situada en el lado telomérico de 10q23, o ambas. Una sonda de PTEN preferida cubre aproximadamente 365-370 kb, tal como 368 kb de 10q23 y está centrada en el gen de PTEN. Las regiones adyacentes del gen de PTENE incluyen marcadores STS D10S215 en el lado centromérico y RH93626 en el lado telomérico. El uso de las designaciones de sonda como se explicó anteriormente se aplica a los procedimientos, sondas y kits descritos en este documento. El mismo uso se aplica a otras designaciones de sonda establecidas en este documento. Como se indicó anteriormente para el gen MYC, la información de secuencia para los genes indicados en el presente documento está disponible en línea a partir de fuentes, tales como GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) y GeneCards® ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))).

[0043] La muestra de células de la próstata es una sección de la próstata del paciente. La muestra, tal como una sección de tejido, se puede obtener mediante resección quirúrgica, biopsia con aguja, resección transuretral de la próstata (RTUP), o una técnica similar. La sección puede fijarse con formalina y bañarse en parafina y se coloca en un portaobjetos de microscopio. Alternativamente, se puede utilizar una sección conservada por otros medios, tales como la congelación.

[0044] Antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento puede comprender además evaluar morfológicamente la sección e identificar al menos una ROI de tumor, al menos una ROI benigna, o al menos una ROI de tumor y al menos una ROI benigna. Alternativamente, antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento puede comprender además evaluar la sección mediante

inmunofluorescencia e identificar al menos una ROI de tumor. La evaluación de la sección por inmunofluorescencia puede comprender poner en contacto la sección con un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) marcado de forma detectable y detectar la sobreexpresión de AMACR, en el que la sobreexpresión de AMACR en una región de la sección indica la presencia de una ROI de tumor. Antes de la evaluación de la sección por inmunofluorescencia, el procedimiento puede comprender además tratar la sección con recuperación de epítomos inducida por calor.

**[0045]** El procedimiento anterior se puede llevar a cabo usando cualquier procedimiento de detección adecuado conocido en la técnica. Preferiblemente, el procedimiento anterior se lleva a cabo utilizando la hibridación in situ, tales como la hibridación fluorescente in situ (FISH). Preferiblemente, cada sonda está marcada de forma detectable con un marcador distinto, tal como un fluoróforo diferente. Alternativamente, se pueden utilizar la detección de nucleótidos radiomarcados (hibridación in situ (ISH)), detección de la hibridación cromomérica, y similares, tal como se describe en el presente documento.

**[0046]** Cuando los procedimientos anteriores se llevan a cabo mediante hibridación in situ, en el que cada sonda está marcada de forma detectable con un marcador distinto, tal como mediante FISH, en el que cada sonda está marcada con un fluoróforo diferente, los procedimientos pueden llevarse a cabo en una muestra de células de la próstata, que son frescas, tales como las células frescas de una biopsia de la próstata (las células frescas se pueden cultivar durante 1-3 días y se puede añadir un bloqueador, tal como Colcemid, al cultivo para bloquear las células en metafase, durante la cual los cromosomas están altamente condensados y pueden ser visualizados), congeladas, o fijadas (por ejemplo, fijadas en formalina y bañadas en parafina), tratadas (por ejemplo, con ARNasa y pepsina) para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN) y reducir la unión no específica, y a continuación se someten a hibridación con una o más sondas, lavando para eliminar cualquier sonda sin unir, y la detección de sondas hibridadas. Por ejemplo, se puede aplicar una suspensión de células como una única capa sobre un portaobjetos, y se puede medir la densidad celular mediante un microscopio de contraste de luz o fase. Las células también pueden obtenerse a partir de otras fuentes, tales como fluidos corporales, por ejemplo, orina o semen, conservarse en fijadores, tales como metanol-ácido acético (reactivo de Carnoy), y aplicarse a un portaobjetos o un soporte similar para su examen y análisis microscópico.

**[0047]** Alternativamente, se puede montar una sección (aproximadamente 4-6  $\mu\text{m}$  de grosor) de tejido, tal como una sección de una muestra fijada en formalina, bañada en parafina (FFPE) de tejido de la próstata, sobre un portaobjetos, tal como un portaobjetos SuperFrost Plus cargado positivamente (disponible de ThermoShandon, Pittsburgh, PA), cocido a 56°C de 2 horas a 24 horas (durante la noche). Para el ensayo de FISH, las secciones se desparafinan mediante el pretratamiento de dos a tres veces en Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) o Xylene durante 5 a 10 minutos cada uno a temperatura ambiente, seguido de lavado dos veces en 100% de etanol a temperatura ambiente durante un minuto para cada aclarado, incubación en ácido fórmico al 45%/peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y a continuación aclarado en agua desionizada durante 3-10 minutos. Los portaobjetos se incuban a continuación en solución de pretratamiento (1XSSC, pH 6,3) a 80 +/- 5°C durante 35 - 50 minutos, se aclaran durante 3 minutos en agua desionizada, se incuban 22 +/- 5 minutos en pepsina al 0,15% en solución de HCl 0,1N a 37°C, y se aclaran de nuevo durante 3 minutos en agua desionizada. Los portaobjetos se deshidratan a continuación durante 1 minuto cada uno en 70%, 85% y 100% de etanol y a continuación se secan al aire.

**[0048]** Se añaden a las muestras diez microlitros de cada mezcla de sonda de hibridación respectiva (tampón LSI®, ADN de bloqueo, y sondas marcadas), y los cubreobjetos se aplican y se sellan con goma de caucho. Los portaobjetos se desnaturalizan simultáneamente durante cinco minutos a 73 +/- 2°C y se hibridan durante 10-24 horas a 37°C en un ThermoBrite (Vysis/Abbott Molecular, Inc.) Después de la hibridación, los cubreobjetos se retiran. La muestra se coloca en la solución de lavado que consiste en 0,3x - 2x SSC y NP-40 al 0,3%-0,5%, y la temperatura de la muestra se eleva a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2-5 minutos. A continuación, el soporte que lleva la muestra puede contratarse con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución, o tras secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contrañe con aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  de DAPI, y se coloca un nuevo cubreobjetos sobre la muestra. A continuación, la muestra se puede observar o almacenar, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

**[0049]** A este respecto, se puede realizar la recuperación de epítomos inducida por calor (HIER), lo que permite la inmunofluorescencia y FISH simultáneas. Para el ensayo de FISH e inmunofluorescencia (IF) simultáneas sobre los mismos portaobjetos de tejido tumoral sólido FFPE de próstata, se desarrolló un protocolo de pretratamiento de muestras/recuperación de antígeno y se optimizó para mejores resultados en el tejido FFPE para IF-FISH.

**[0050]** La primera etapa de este procedimiento es la recuperación de antígeno. Se cuecen los portaobjetos FFPE de cáncer de próstata a 56°C durante de 2 horas a toda la noche. Los portaobjetos se desparafinan a continuación mediante dos inmersiones en Hemo-De durante 10 minutos cada uno. Los portaobjetos se incuban a continuación en etanol al 100% dos veces durante 2 minutos cada vez. Los portaobjetos se hidratan mediante la colocación en 85%, 70%, 50%, 30% de etanol durante 2 minutos cada uno, y una inmersión final de 5 minutos en agua Milli-Q de grado molecular. Se precalienta un baño de agua con un recipiente Coplin que contiene tampón de citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 6,0) hasta que la temperatura llega a 96 +/- 4°C. Los portaobjetos

se incuban a continuación durante 20-60 minutos, y se enfrían a temperatura ambiente durante 20-40 minutos en la mesa de trabajo. Los portaobjetos se lavan durante cinco minutos en agua Milli-Q y se aclaran una vez durante cinco minutos en PBS.

5 **[0051]** La segunda etapa es la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpo AMACR y ensayo de amplificación de señal con tiramida. Se utilizan el kit de ensayo de solución de tiramida (TSA) y el kit Alexa Fluor 488 TSA (amplificación de  
 10 señal con tiramida) número 2 (Invitrogen, Molecular Probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de peroxidasa endógena se bloquea mediante incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añade reactivo de bloqueo (100 µl/portaobjetos), y los portaobjetos se incuban en una caja  
 15 humidificada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden cien microlitros de anticuerpo de conejo AMACR diluido (diluida en reactivo de bloqueo al 1% a 1:100, y los portaobjetos se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavan tres veces durante cinco minutos cada uno en PBS/Tween 20 al 0,1%. Se diluye la solución madre de conjugado de HRP 1:100 en solución de bloqueo al 1%. Un volumen de 100 µl de esta solución de trabajo es suficiente para cubrir un cubreobjetos estándar de 22 x 22 mm. Los portaobjetos se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos, y después se lavan tres veces en PBS/Tween 20 al 0,1% durante cinco minutos cada lavado, seguido de un lavado en PBS. Se añade una solución de tiramida (100 µl) a cada portaobjeto, y los portaobjetos se incuban a temperatura ambiente durante diez minutos en la oscuridad. Los portaobjetos se lavan durante cinco minutos en PBS y después se lavan durante cinco minutos en agua Milli-Q.

20 **[0052]** La tercera etapa es el ensayo FISH. Los portaobjetos se deshidratan en alcohol (70%, 85% y 100%, 1 min cada uno), y se dejan secar al aire completamente. Se añade solución de sonda (10 µl) a cada portaobjeto, y se sella un cubreobjetos sobre el portaobjetos con cemento de caucho. La sonda y el ADN diana se desnaturalizan a 73°C durante cinco minutos, seguido de hibridación durante la noche a 37°C. La muestra puede colocarse en una solución de lavado que consiste en 0,3x-2x SSC y NP-40 al 0,3%-0,5%, y la temperatura de la muestra se puede  
 25 elevar a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2-5 minutos. A continuación, el soporte que lleva la muestra se puede contrateñir con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución o tras el secado de la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contrateñe con aproximadamente 10 µl de DAPI, y se coloca un nuevo cubreobjetos sobre la muestra. La muestra puede observarse o almacenarse, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

30 **[0053]** Antes de la detección, las muestras de células pueden opcionalmente preseleccionarse en base a alteraciones citológicas evidentes. La preselección identifica células sospechosas, lo que permite que el cribado se centre en esas células. La preselección permite la detección más rápida y aumenta la probabilidad de que un resultado positivo no se pueda perder. Preferiblemente, las regiones de interés en el portaobjetos de muestras  
 35 próstata se identifican mediante la detección de la sobreexpresión de alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR) usando IF y un anticuerpo contra AMACR. Alternativamente, las células de una muestra biológica se pueden colocar en un portaobjetos de microscopio y se exploran visualmente para detectar alteraciones citológicas comúnmente asociadas con células displásicas y neoplásicas. Tales alteraciones incluyen alteraciones en el tamaño nuclear, la forma nuclear, y la tinción nuclear, tal como se evaluó por contrateñimiento de los núcleos con tinción o colorantes de ácido nucleico, tales como yoduro de propidio o clorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), por lo general después de la hibridación de las sondas a sus ADN diana. Típicamente, las células neoplásicas albergan núcleos que se agrandan, de forma irregular, y/o muestran un patrón de tinción moteada. El yoduro de propidio, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante específico de ADN de fluorescente rojo que se puede observar en un pico de longitud de onda de emisión de 614  
 40 nm. DAPI, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, es una tinción específica de ADN de fluorescente azul que puede observarse en un pico de longitud de onda de emisión de 452 nm con un filtro DAPI a bajo aumento. En este caso, sólo aquellas células preseleccionadas para la detección se someten a un recuento por pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Preferiblemente, las células preseleccionadas en el orden de al menos 20, y más preferiblemente al menos 30-40, en número son elegidas para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

45 **[0054]** Alternativamente, un área que evidencia cierto nivel de displasia o una lesión sospechosa puede localizarse utilizando el filtro DAPI a bajo aumento y se comprueba a fondo para la presencia de núcleos que alberguen números de copias anormales de cualquier sonda. En una célula normal, se detectarán dos copias de una sonda determinada. En una célula anormal, se detectarán más o menos copias de una sonda determinada. Las áreas con los cambios más significativos del número de copias se seleccionan preferiblemente para la enumeración. Siempre que sea posible, se seleccionan tres áreas anormales y, dentro de cada área anormal, se analizan 10 núcleos aleatorios bajo alta potencia (64 x o 100 x objetivo). Preferiblemente, los núcleos son no solapantes y albergan señales lo suficientemente brillantes.

50 **[0055]** Alternativamente, las células para la detección pueden elegirse independiente de características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se solapan en una zona o zonas determinadas en un portaobjetos de microscopio se pueden evaluar por pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Como ejemplo adicional, las células en el portaobjetos, por ejemplo, las células que muestran morfología alterada, del orden de al menos  
 55 aproximadamente 50, y más preferiblemente al menos aproximadamente 100, en número que aparecen en orden

consecutivo en un portaobjetos de microscopio se pueden elegir para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

[0056] Las copias de MYC (8p24), LPL (8p22), PTEN (10q23), y el cromosoma 8, solo o en combinación adicional con copias de una o más de p16 (9p21), cromosoma 3, cromosoma 7, cromosoma 10, y el cromosoma 17 se cuentan, así como las fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21) y deleciones y/o translocaciones de los mismos. Además, se cuentan las copias de uno o más de p27Kip1 (4q43), CDK2 (12q13), ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda específica del locus para la fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica para el locus de AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12).

[0057] Por lo tanto, tales procedimientos comprenden poner en contacto una muestra de células de la próstata obtenidas de un paciente, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico, con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica del locus para MYC (8p24), una sonda específica del locus para LPL (8p22), una sonda específica del locus para PTEN (10q23), y una sonda centromérica para el cromosoma 8, solo o en combinación adicional con uno o más de una sonda específica del locus de p16 (9p21), fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21), una sonda centromérica para el cromosoma 3, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 10, y una sonda centromérica para el cromosoma 17, en el que el conjunto de sondas marcadas de forma detectable puede comprender una o más de una sonda específica del locus para p27Kip1 (4q43), CDK2 (12q13), ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda para el locus de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12), en condiciones que permiten (o promueven) que la sonda se una selectivamente con su secuencia de ácido nucleico diana y forme un complejo de hibridación estable. Tales procedimientos comprenden además la detección de la formación del complejo de hibridación y el recuento del número de complejos de hibridación. En vista del número de complejos de hibridación que comprenden MYC (8p24), LPL (8p22), PTEN (10q23), y el cromosoma 8, solo o en combinación adicional con el número de complejos de hibridación de uno o más de p16 (9p21), fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21), cromosoma 3, cromosoma 7, cromosoma 8, cromosoma 10, y el cromosoma 17, solo o en vista además del número de complejos de hibridación que comprenden uno o más de p27Kip1 (4q43), CDK2 (12q13), ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda para el locus de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12), el procedimiento comprende además determinar el número de copias de MYC (8p24), LPL (8p22), PTEN (10q23; véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 6.262.242; 6.482.795; y 7.217.795), y el cromosoma 8, solo o en combinación adicional con el número de copias de una o más de p16 (9p21), cromosoma 3, cromosoma 7, cromosoma 10, y el cromosoma 17, así como las fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21) y deleciones y/o translocaciones de los mismos, solo o en combinación adicional con el número de copias de una o más de p27Kip1 (4q43), CDK2 (12q13), ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda para el locus de fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda

específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12), Si se desea, el número de copias puede compararse con un punto de corte predeterminado, en el que un número de copias mayor que el punto de corte predeterminado (es decir, para una ganancia) y un número de copias menor que el punto de corte predeterminado (es decir, para una pérdida), según el caso, indican que el paciente tiene cáncer de próstata. Cuando aproximadamente el 20% o más de las células de próstata examinadas de un paciente tienen translocaciones y/o deleciones que implican fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21), se considera que el paciente tiene cáncer de próstata.

**[0058]** Mientras la desparafinación, el pretratamiento, la tinción y el lavado de portaobjetos de rutina también puede ser llevado a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, el uso de un sistema automatizado, sin embargo, tal como el Proceso de VP 2000 (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL), disminuye la cantidad de tiempo necesario para preparar portaobjetos para su evaluación. Los portaobjetos se pueden preparar en grandes lotes (por ejemplo, 50 portaobjetos), a diferencia de lotes pequeños (por ejemplo, 4 portaobjetos) cuando se utilizan recipientes comunes Coplin para el lavado post-hibridación. Además, la evaluación de los portaobjetos se puede automatizar completamente con el uso de imágenes automatizadas, reduciendo así la cantidad de manos en el tiempo requerido para el análisis de la muestra. La completa automatización también permite el uso de un algoritmo de imagen que captura más células alteradas con más frecuencia y de forma coherente. También, aunque se puede utilizar cualquier procedimiento adecuado de preparación de portaobjetos conocido en la técnica, los portaobjetos se preparan preferiblemente usando ThinPrep 2000 (Hologic, Inc., Bedford, MA), que genera monocapas de células más uniformes y consistentes.

**[0059]** Otros procedimientos ya conocidos en la técnica o actualmente en desarrollo pueden requerir o preferir el uso de una muestra de células de la próstata que sea distinta de células fijadas en formalina y bañadas en parafina, por ejemplo, células frescas o congeladas, células homogeneizadas, células lisadas, o ácidos nucleicos aislados o purificados (por ejemplo, una "muestra de ácido nucleico" tal como ADN) de células de la próstata ("muestra de células de la próstata" como se usa en el presente documento pretende abarcar todas las formas de una muestra de células de la próstata que permitan la determinación del número de copias y la ganancia/pérdida). Los núcleos también pueden ser extraídos de secciones gruesas de muestras bañadas en parafina para reducir los artefactos de truncamiento y eliminar el material incrustado extraño. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se recogen y se procesan antes de la hibridación utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Dicho procesamiento incluye típicamente el tratamiento con proteasa y una fijación adicional en una solución de aldehído, tal como formaldehído.

**[0060]** Ejemplos de procedimientos que pueden ser utilizados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), Q-PCR a tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA), barrido densitométrico de productos de PCR, PCR digital, opcionalmente con preamplificación del gen o genes y/o región o regiones cromosómicas para los que el número de copias están por determinar (véase, por ejemplo, Vogelstein et al, PNAS USA. 96.: 9236-9241 (1999); publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0252773; y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. 2009/0069194), hibridación genómica comparativa (CGH; véase, por ejemplo, Kallioniemi et al, Science 258: 818-821 (1992); y la publicación de solicitud de patente internacional N° WO 93/18186), análisis de microsátélites o alelotipos Southern, transferencias de puntos, arrays, microarrays (Carter, Nature Genetics Supplement 39: S16-S21 (julio de 2007)), hibridación de sondas amplificable múltiple (MAPH), amplificación de la sonda dependiente de ligación multiplex (MLPA; véase, por ejemplo, Schouten et al, Nucleic Acids Res. 30: e57 (2002)), cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC; Kumar et al., J. Biochem. Biophys. Methods 64 (3): 226-234 (2005)), hibridación dinámica específica de alelo (DASH), medición de longitudes de sonda fluorescente en el ADN genómico peinado (Herrick et al, PNAS 97 (1): 222-227 (2000)), pirosecuenciación de referencia (RQPS; Liu et al, Cold Spring Harb protoc doi: 10.1101/pdb.prot5491 (2010)), mapeo de extremos fósidos en una secuencia de referencia (tecnología basada en capilar), secuenciación microelectroforética y nanoporos (véase, por ejemplo, Service, Science 311: 1544-1546 (2006); y Shendure et al, Nat Genet Rev. 5: 335-344 (2004)), y similares.

**[0061]** La desnaturalización de las dianas de ácido nucleico para el análisis mediante hibridación in situ y procedimientos similares normalmente se realiza de una manera tal como para preservar la morfología celular. Por ejemplo, el ADN cromosómico puede ser desnaturalizado mediante un pH alto, calor (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 70-95°C), disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida), y combinaciones de los mismos. Las sondas, por el contrario, pueden desnaturalizarse por el calor en cuestión de minutos.

**[0062]** Después de la desnaturalización, se lleva a cabo la hibridación. Las condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico generalmente incluyen las combinaciones de condiciones que son empleables en un procedimiento de hibridación determinado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones se pueden determinar fácilmente por un experto en la técnica. Tales condiciones implican típicamente temperatura controlada, fase líquida, y el contacto entre una sonda y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores, incluyendo la concentración de sonda, longitud de diana, contenido de GC en la diana y la sonda, composición del disolvente, la temperatura y duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente,

la sonda y la diana pueden ser sometidos a condiciones de desnaturalización juntos mientras están en contacto entre sí, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede lograr con la posterior incubación de la sonda/muestra en, por ejemplo, una fase líquida de una mezcla con una relación aproximadamente 50:50 en volumen de 2-4 x SSC y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55°C durante un tiempo que está ilustrativamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 40°C durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente de bloqueo, tal como el ácido nucleico de bloqueo no marcado, tal como se describe en la patente de Estados Unidos. No. 5.756.696. Otras condiciones se pueden emplear fácilmente para hibridar específicamente las sondas a sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como sería fácilmente evidente para un experto en la técnica. Los protocolos de hibridación se describen, por ejemplo, en Pinket et al, PNAS USA. 85: 9138-9142 (1988); In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo, ed, Humana Press, Totowa, NJ (1994); y Kallioniemi et al, PNAS USA. 89: 5321-5325 (1992).

**[0063]** Tras la finalización de un periodo de incubación adecuado, la unión no específica de sondas cromosómicas a muestra de ADN puede eliminarse mediante una serie de lavados. La temperatura y concentraciones de sal se seleccionan adecuadamente para una rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y puede determinarse mediante la hibridación sistemática de sondas con muestras de composición genética conocida. En general, los lavados de alta rigurosidad se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 0,2 x SSC a aproximadamente 2 x SSC y aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico, tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de rigurosidad menor, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura inferior con un aumento de la concentración de sal.

**[0064]** Cuando se utilizan sondas o composiciones de sondas marcadas con fluoróforo, el procedimiento de detección puede implicar la microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Cualquier procedimiento de imagen microscópica adecuado puede ser usado en conjunción con los procedimientos descritos en el presente documento para observar múltiples fluoróforos. En el caso en el que se emplea la microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden visualizar bajo luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiados. Los sistemas de imágenes digitales automatizados, tales como los sistemas MetaSystems, BioView o Applied Imaging, alternativamente se pueden utilizar junto con la enumeración de la señal y los algoritmos de adquisición de datos.

**[0065]** Dependiendo del procedimiento empleado, se puede utilizar un sistema de análisis de imagen digital para facilitar la visualización de los resultados y para mejorar la sensibilidad de detectar pequeñas diferencias en la intensidad de fluorescencia. Un sistema ejemplar es QUIPS (un acrónimo de sistema de procesamiento de imágenes cuantitativo), que es un sistema de análisis de imágenes automatizado basado en un microscopio de fluorescencia estándar equipado con una etapa automatizada, control de foco y rueda de filtros (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY). La rueda de filtros está montada en la trayectoria de excitación de fluorescencia del microscopio para la selección de la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en el bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin cambio de registro de imágenes. El microscopio tiene dos puertos de cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, CA) para la visualización de imágenes de vídeo sensibles a alta velocidad, que se utiliza para encontrar áreas interesantes en un portaobjetos así como para enfocar. El otro puerto de la cámara tiene una cámara CCD refrigerada (modelo 200 por Photometrics Ltd., Tucson, AZ), que se utiliza para la adquisición de la imagen real en alta resolución y sensibilidad. La cámara CCD refrigerada está interconectada a una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un bus VME. Toda la adquisición de imágenes multicolor se controla mediante un paquete de software de procesamiento de imágenes SCIL-Imagen (Centro de Procesamiento de Imágenes Delft, Delft, Países Bajos).

**[0066]** En array CGH (aCGH) las sondas se inmovilizan en localizaciones distintas sobre un sustrato y no están marcadas (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente internacional No. WO 96/17958). En cambio, los ácidos nucleicos de la muestra, que comprenden ácido o ácidos nucleico diana están marcados. Cualquiera de los ácidos nucleicos de la muestra se marcan antes de la hibridación o los complejos de hibridación están marcados de forma detectable. En aCGH doble o multi-color, la matriz de sondas se hibrida simultáneamente o secuencialmente a dos o más colecciones de ácidos nucleicos diana marcados de forma diferente.

**[0067]** Preferiblemente, la expresión del biomarcador se evalúa por inmunofluorescencia (IF) para localizar áreas para el análisis por FISH. Los resultados de IF se correlacionan estrechamente con alteraciones FISH identificadas usando las sondas descritas en el presente documento, así como la evaluación morfológica de un tumor.

**[0068]** Los procedimientos anteriores se pueden usar para estratificar a los pacientes en los que necesitan repetir la biopsia o seguimiento intensivo y los que no. Los procedimientos anteriores también pueden ser utilizados para distinguir el cáncer de próstata de una afección benigna, tal como hiperplasia prostática benigna (BPH). Tales procedimientos se pueden utilizar conjuntamente con otros procedimientos, tales como la evaluación histológica del

tejido, detección del antígeno prostático específico (PSA), nomograma (por ejemplo, nomograma de Katan), metilación, y mutación. En este sentido, los procedimientos también se pueden utilizar para confirmar el diagnóstico después de la prostatectomía radical y para distinguir el cáncer de próstata de una lesión pre-cancerosa (por ejemplo, la proliferación acinar pequeña atípica en la próstata (ASAP), neoplasia intra-epitelial de próstata de bajo grado (PIN), y PIN de alto grado) en la próstata y una lesión precancerosa en la próstata de una afección benigna, tal como BPH. Los procedimientos pueden ayudar en el diagnóstico del adenocarcinoma en una muestra obtenida por biopsia, resección trans-uretral (RTUP), o cirugía, por ejemplo, prostatectomía radical. Una ventaja de los procedimientos anteriores, particularmente en el contexto de la detección y el diagnóstico, es que las alteraciones cromosómicas indicativas de cáncer de próstata pueden detectarse en las células que rodean un tumor (es decir, células de "efecto de campo"). Por lo tanto, incluso si el tumor se pierde durante la biopsia, su presencia puede ser detectada de acuerdo con los procedimientos anteriores, reduciendo de este modo los resultados falsos negativos y la necesidad de biopsias de repetición. Los procedimientos también se pueden utilizar en el pronóstico de cáncer de próstata, el seguimiento de la eficacia del tratamiento profiláctico o terapéutico (por ejemplo, terapia hormonal o de radiación) del cáncer de próstata, y el seguimiento de la recurrencia del cáncer de próstata. Los procedimientos se pueden utilizar para confirmar los resultados obtenidos con los procedimientos de detección basados en orina o en sangre. El riesgo de cáncer en pacientes con lesiones pre-cancerosas puede evaluarse usando dichos procedimientos, así como la agresividad del cáncer (por ejemplo, más alteraciones cromosómicas y/o alteraciones cromosómicas más extendidas en las células de efecto de campo). Tales procedimientos también se pueden utilizar para ayudar en las decisiones de tratamiento, por ejemplo, la vigilancia activa, cirugía o terapia con hormonas o radiación, y las decisiones de tratamiento adyuvante, tal como en el contexto de la prostatectomía radical.

**[0069]** Por lo tanto, el procedimiento puede comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente del que se obtuvo la muestra de ensayo. Si el procedimiento comprende además la evaluación de la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente del cual se obtuvo la muestra de ensayo, el procedimiento comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El procedimiento puede adaptarse para su uso en un sistema automatizado o en un sistema semi-automatizado.

**[0070]** Generalmente, puede emplearse un nivel predeterminado como punto de referencia para evaluar los resultados obtenidos en el ensayo de una muestra de células de la próstata para detectar alteraciones cromosómicas. Generalmente, al realizar dicha comparación, el nivel predeterminado se obtiene mediante la realización de un ensayo particular un número suficiente de veces y en las condiciones apropiadas de tal manera que puede realizarse una unión o asociación de una alteración cromosómica en particular (presencia o nivel) con una etapa particular o punto final de una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, preeclampsia o enfermedad cardiovascular) o con especial indicios pueden ser hechos. Típicamente, el nivel predeterminado se obtiene con los ensayos de los sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos).

**[0071]** En particular, con respecto a un nivel predeterminado, como se emplea para el control de la progresión y/o tratamiento de la enfermedad, la alteración cromosómica (presencia o nivel) puede ser "sin cambios", "favorable" (o "alterada favorablemente"), o "desfavorable" (o "alterada desfavorablemente"). "Elevada" o "aumentada" se refiere a un nivel de alteración cromosómica en una muestra de células de la próstata que es superior a un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o es más alta que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de referencia). El término "bajada" o "reducida" se refiere a un nivel de alteración cromosómica en una muestra de células de la próstata que es menor que un nivel o intervalo (por ejemplo, nivel predeterminado) típico o normal, o es inferior a otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de referencia). El término "alterado" se refiere a un nivel de alteración cromosómica en una muestra de células de la próstata que se altera (aumenta o disminuye) sobre un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, nivel predeterminado), o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o de referencia).

**[0072]** El nivel o intervalo típico o normal para una alteración cromosómica determinada se define de acuerdo con la práctica estándar. Debido a que los niveles de alteraciones cromosómicas en algunos casos serán muy bajos, un nivel alterado o alteración se pueden considerar que se ha producido cuando hay cualquier cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal, o nivel o intervalo de referencia, que no puede ser explicado por error experimental o variación de la muestra. Por lo tanto, el nivel medido en una muestra particular se compara con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de un sujeto normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin enfermedad detectable, y un paciente o población "normal" o de "control" es/son los que muestra una enfermedad no detectable, respectivamente, por ejemplo. Además, dado que las alteraciones cromosómicas no se encuentran rutinariamente en altos niveles en la mayoría de la población humana, un "sujeto normal" puede ser considerado un individuo con ningún aumento del nivel detectable sustancial de una alteración cromosómica determinada, y un paciente o población "normal" (a veces denominado de "control") es/son los que muestran un nivel aumentado no sustancialmente detectable de una alteración cromosómica determinada. Un "sujeto aparentemente normal" es aquel en el que las alteraciones cromosómicas no han sido o están siendo evaluados. El nivel de una alteración cromosómica determinada se dice que está "elevado" cuando la alteración cromosómica es normalmente indetectable, pero se detecta en una muestra de ensayo, así como cuando el análisis está presente en la muestra de ensayo a un nivel superior al normal. Por lo tanto, entre otras cosas, la descripción proporciona un procedimiento de cribado de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer de próstata.



**[0073]** El procedimiento también puede implicar la detección de otros marcadores y similares. Por ejemplo, el procedimiento también puede implicar la detección de antígeno prostático específico (PSA), por ejemplo.

5 **[0074]** Los procedimientos descritos en este documento también se pueden usar para determinar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer de próstata o no. En concreto, dicho procedimiento puede comprender las etapas de:

(a) determinar las alteraciones cromosómicas en una muestra de células de próstata de un sujeto (por ejemplo, usando los procedimientos descritos en el presente documento, o procedimientos conocidos en la técnica); y

10 (b) comparar los niveles de alteraciones cromosómicas determinados en la etapa (a) con niveles predeterminados, en el que, si los niveles de alteraciones cromosómicas determinados en la etapa (a) son favorables con respecto a los niveles predeterminados, entonces el sujeto se determina que no tiene o no está en riesgo de cáncer de próstata. Sin embargo, si los niveles de alteraciones cromosómicas determinados en la etapa (a) son desfavorables con respecto a los niveles predeterminados, entonces el sujeto se determina que tiene o está en riesgo de cáncer de  
15 próstata.

**[0075]** Además, se proporciona en este documento un procedimiento de control de la progresión del cáncer de próstata en un sujeto. De manera óptima, el procedimiento comprende las etapas de:

(a) determinar alteraciones cromosómicas en una muestra de células de la próstata de un sujeto;

20 (b) determinar los niveles de alteraciones cromosómicas en una muestra posterior de células de la próstata del sujeto; y

(c) comparar los niveles de alteraciones cromosómicas tal como se determina en la etapa (b) con los niveles de alteraciones cromosómicas tal como se determina en la etapa (a), en el que si los niveles en la etapa (b) no se han modificado o son desfavorables cuando se compara con los niveles determinados en la etapa (a), entonces se  
25 determina que el cáncer de próstata ha continuado, progresado o empeorado en el sujeto. En comparación, si los niveles tal como se determina en la etapa (b) son favorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces se determina que el cáncer de próstata se ha interrumpido, ha experimentado regresión o ha mejorado en el sujeto.

30 **[0076]** Opcionalmente, el procedimiento comprende además comparar los niveles de alteraciones cromosómicas como se determina en la etapa (b), por ejemplo, con niveles predeterminados. Además, opcionalmente, el procedimiento comprende el tratamiento del sujeto, por ejemplo, con una o más composiciones farmacéuticas, radiación, y terapia de hormonas, durante un período de tiempo si la comparación muestra que los niveles como se determina en la etapa (b), por ejemplo, están desfavorablemente alterados con respecto a los niveles  
35 predeterminados.

**[0077]** Aún más, los procedimientos se pueden utilizar para controlar el tratamiento en un sujeto que recibe el tratamiento, por ejemplo, con una o más composiciones farmacéuticas, radiación, y/o terapia hormonal. Específicamente, tales procedimientos implican proporcionar una primera muestra de células de la  
40 próstata de un sujeto antes de que el sujeto haya sido tratado. A continuación, se determinan los niveles de alteraciones cromosómicas en la primera muestra de células de la próstata (por ejemplo, usando los procedimientos descritos en este documento o como se conoce en la técnica). Después se determinan los niveles de alteraciones cromosómicas, opcionalmente los niveles se comparan a continuación con los niveles predeterminados. Si los niveles como se determina en la primera muestra de células de la próstata son más bajos que los niveles predeterminados, entonces el sujeto no es tratado. Sin embargo, si los niveles determinados en la primera muestra de células de la próstata son más altos que los niveles predeterminados, entonces el sujeto es tratado durante un período de tiempo. El período de tiempo que el sujeto se trata puede determinarse por un experto en la técnica (por ejemplo, el período de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferiblemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).  
50

**[0078]** Durante el transcurso del tratamiento, segunda y posteriores muestras de células de la próstata se obtienen entonces del sujeto. El número de muestras y el tiempo en el que dichas muestras se obtienen del sujeto no son críticos. Por ejemplo, una segunda muestra se podría obtener siete (7) días después de que el sujeto es tratado por primera vez, se podría obtener una tercera muestra dos (2) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, se podría obtener una cuarta muestra tres (3) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, una quinta muestra se podría obtener cuatro (4) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, etc.  
55

**[0079]** Después de que se obtuvo cada segunda o posterior muestra del sujeto, se determinan los niveles de alteraciones cromosómicas en el segundo o posterior muestra (por ejemplo, usando los procedimientos descritos en este documento o como se conoce en la técnica). Los niveles tal como se determina en cada una de la segunda y siguientes muestras se comparan entonces con los niveles tal como se determina en la primera muestra (por ejemplo, la muestra que fue originalmente opcionalmente comparada con el nivel predeterminado). Si los niveles como se determina en la etapa (c) son favorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces se determina que el cáncer de próstata se ha interrumpido, ha experimentado regresión o ha mejorado, y el sujeto debe continuar con el tratamiento. Sin embargo, si los niveles determinados en la etapa (c) son invariables  
60  
65

o desfavorables cuando se comparan con los niveles tal como se determina en la etapa (a), entonces se determina que el cáncer de próstata ha continuado, progresado o empeorado, y el sujeto debe tratarse con un mayor dosis de composición farmacéutica, radiación, u hormona, por ejemplo, o el sujeto debe tratarse de manera diferente.

5 **[0080]** En general, para ensayos en los que se puede repetir la prueba (por ejemplo, el seguimiento de progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda o posterior muestra de ensayo en un período en el tiempo después de que la primera muestra de prueba se haya obtenido del sujeto. Específicamente, una segunda muestra de prueba del sujeto puede obtenerse minutos, horas, días, semanas o años después de que la primera muestra de prueba se haya obtenido del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de ensayo puede  
 10 obtenerse del sujeto en un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4  
 15 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, alrededor de 2 años, alrededor de 2,5 años, alrededor de 3,0 años, alrededor de 3,5 años, alrededor de 4,0 años, alrededor de 4,5 años, alrededor de 5,0 años, alrededor de 5,5 . año, alrededor de 6,0 años, alrededor de 6,5 años, alrededor de 7,0 años, alrededor de 7,5 años, alrededor de 8,0 años, alrededor de 8,5 años, alrededor de 9,0 años, alrededor de 9,5 años o aproximadamente 10,0 años después de que se haya obtenido la primera muestra de prueba del sujeto.

40 **[0081]** Por otra parte, la presente descripción también se refiere a procedimientos para determinar si un sujeto predispuesto o que sufre de cáncer de próstata se beneficiará del tratamiento. En particular, la descripción se refiere a procedimientos y productos de diagnóstico de compañía. Por lo tanto, el procedimiento de "control del tratamiento de la enfermedad en un sujeto" como se describe en el presente documento también puede abarcar de forma más óptima seleccionar o identificar candidatos para la terapia.

45 **[0082]** Por lo tanto, en casos particulares, la descripción también proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer de próstata es un candidato para la terapia. Generalmente, el sujeto es alguien que ha experimentado algún síntoma de la enfermedad o que realmente se ha diagnosticado que tiene, o está en riesgo de tener, dicha enfermedad, y/o que demuestra niveles desfavorables de alteraciones cromosómicas, tal como se describe en el presente documento.

50 **[0083]** El procedimiento comprende opcionalmente un ensayo tal como se describe en este documento, donde los niveles de alteraciones cromosómicas son evaluados antes y después del tratamiento de un sujeto. La observación de niveles desfavorables de alteraciones cromosómicas tras el tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará de recibir más tratamiento o un tratamiento continuado, mientras que la observación de los niveles favorables de alteraciones cromosómicas tras el tratamiento confirma que el sujeto se beneficiará de recibir más tratamiento o un tratamiento continuado. Esta confirmación ayuda con la gestión de los estudios clínicos, y la provisión de una mejor atención al paciente.

#### 60 **Sondas**

**[0084]** También se proporciona un conjunto de sondas. En un caso, el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC (8q24), una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN; 10q23), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, en el que el conjunto de sondas comprende opcionalmente además un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR), que puede estar marcado de forma detectable. En otro caso, el conjunto de sondas comprende una sonda

específica del locus para MYC (8q24), una sonda específica del locus para la lipoproteína lipasa (LPL; 8p22), una sonda específica del locus para PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8. El conjunto de sondas comprende opcionalmente además un anticuerpo contra AMACR, que puede estar marcado de forma detectable. La sonda específica del locus para MYC (8q24) cubre preferiblemente aproximadamente 820 kb, tal como 821 kb, centrada en el gen de MYC e incluye todo el gen de MYC, así como las regiones adyacentes (véase la discusión de "MYC" en la sección de procedimiento anterior). La sonda específica del locus para LPL (8p22) cubre preferiblemente aproximadamente 170 kb centrada en el gen de LPL e incluye todo el gen de LPL, así como las regiones adyacentes (véase la discusión de "LPL" en la sección de procedimiento anterior). La sonda específica del locus para PTEN (10q23) cubre preferiblemente de aproximadamente 365 a 370KB, tal como 368 kb, centrada en el gen de PTEN e incluye todo el gen de PTEN, así como las regiones adyacentes, tales como los marcadores STS D10S215 en el lado centromérico y RH93626 en el lado telomérico (véase la discusión de "PTEN" en la sección de procedimiento anterior). El conjunto de sondas puede comprender además opcionalmente uno o más de una sonda específica del locus de p16 (9p21), fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21 locus), una sonda centromérica para el cromosoma 3, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 10, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El conjunto de sondas puede comprender además uno o más de una sonda específica del locus para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27Kip1 (4q43), una sonda específica del locus para CDK2; 12q13), una sonda específica del locus para la ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda específica del locus para la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12).

**[0085]** Las sondas adecuadas para su uso como sondas específicas de locus se hibridan a una región específica en un cromosoma que contiene un gen. La sonda específica del locus para el gen MYC (8p24) puede hibridar con todo o una parte del gen de MYC en p24 en el cromosoma 8 (es decir, 8p24). La sonda específica del locus para el gen de LPL (8p22) se puede hibridar con todo o una parte del gen de LPL en p22 en el cromosoma 8 (es decir, 8p22). La sonda específica del locus para el gen de PTEN (10q23) se puede hibridar con todo o una parte del gen de PTEN en q23 en el cromosoma 10 (es decir, 10q23). Del mismo modo, la sonda específica del locus para p27Kip1 (4q43) se puede hibridar con todo o una parte del gen de p27Kip1 en q43 en el cromosoma 4 (es decir, 4q43), la sonda específica del locus para CDK2 (12q13) se puede hibridar con todo o una parte del gen de CDK2 en q13 en el cromosoma 12 (es decir, 12q13), la sonda específica del locus para la ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22) se puede hibridar con todo o una parte del gen de CCNE1 en q12 en el cromosoma 19 o con todo o una parte del gen de CCNE2 en q22 en el cromosoma 8, una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14) se puede hibridar con todo o una parte del gen de Rb1 en q14 en el cromosoma 13, una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2) se puede hibridar con todo o una parte del gen de Nkx3.1 en p21.2 en el cromosoma 8, una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11) se puede hibridar a toda o una parte del gen de EGFR en p11 en el cromosoma 7, una sonda específica del locus para la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K; 3q26) se puede hibridar con todo o una parte de el gen de PI3K en q26 en el cromosoma 3, una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32) se puede hibridar con todo o una parte del gen de Akt1 en q32 en el cromosoma 14, una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11) se puede hibridar con todo o una parte del gen de FOXO1 en q14.11 en el cromosoma 13, una sonda específica del locus para homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15) se puede hibridar con todo o una parte del gen de MDM2 en q14.3-Q15 en el cromosoma 12, una sonda específica del locus de p53 (17p13.1) se puede hibridar con todo o una parte del gen de p53 en p13.1 en el cromosoma 17, una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1) se puede hibridar con todo o una parte del gen de KRAS en p12.1 en el cromosoma 12, una sonda específica del locus para el homólogo B1 del oncogén viral de sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34) se puede hibridar con todo o una parte del gen de BRAF en q34 en el cromosoma 7, una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13) se puede hibridar con todo o una parte del gen de CCND1 en q13 en el cromosoma 11, una sonda específica del locus para LLC de células B/linfoma 2 (BCL2 2; 18q21.3/18q21.33) se puede hibridar con todo o una parte del gen de BCL2 en q21.3-q21.33 en el cromosoma 18, y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12) se puede hibridar con todo o una parte del gen de AR en q12 en el cromosoma X.

**[0086]** Una sonda adecuada para su uso como sonda de ruptura se hibrida con TMPRSS2 (21q22), permitiendo de este modo la detección de translocaciones y/o deleciones.

**[0087]** Las sondas adecuadas para su uso como sondas cromosómicas se hibridan con ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de cromosomas de primates contienen una familia compleja de repeticiones largas en tándem de ADN, que se componen de una longitud de monómero de repetición de alrededor de 171 pares de bases (pb), que se conoce como ADN  $\alpha$ -satélite. Las sondas cromosómicas son típicamente de

aproximadamente  $50-1 \times 10^5$  nucleótidos de longitud. Las sondas más largas típicamente están fragmentadas en aproximadamente 100-600 nucleótidos de longitud. La sonda para el cromosoma 3 se puede hibridar con el ADN alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 3, mientras que la sonda para el cromosoma 7 se puede hibridar con el ADN alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 7, la sonda para el cromosoma 8 se puede hibridar con el ADN alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 8, la sonda para el cromosoma 10 se puede hibridar con el ADN alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 10, y la sonda para el cromosoma 17 se puede hibridar con el ADN alfa-satélite situado en el centrómero del cromosoma 17. Ejemplos de tales sondas incluyen CEP3, CEP7, CEP8, CEP 10 y CEP17.

**[0088]** Las sondas enumeradoras de cromosomas (CEP) y las sondas específicas de locus que reconocen una región o subregión de cromosoma pueden obtenerse comercialmente o prepararse fácilmente por los expertos en la técnica. Tales sondas se pueden obtener comercialmente de Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, UK). Las sondas cromosómicas pueden prepararse, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos de proteínas (PNA), ADN humano clonado, tales como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales P1 (PACs) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Una región de interés puede obtenerse a través de la amplificación por PCR o clonación. En otra realización, las sondas cromosómicas pueden ser oligosondas. Alternativamente, las sondas cromosómicas se pueden preparar sintéticamente de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

**[0089]** Cuando el reconocimiento de un locus de gen particular es deseable, puede preferirse las sondas que hibridan a lo largo de toda la longitud del gen diana, aunque no se requiere. Una sonda específica del locus puede diseñarse para hibridarse con un oncogén o gen supresor de tumor, la aberración genética del cual se correlaciona con la metástasis, por ejemplo, MYC.

**[0090]** Las sondas se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las sondas se pueden sintetizar o producir de forma recombinante. Tales sondas pueden variar en longitud desde aproximadamente 25.000 pares de bases a aproximadamente 800.000 pares de bases.

**[0091]** Preferiblemente, las sondas están marcadas de forma detectable, y cada sonda está claramente marcada. Preferiblemente, las sondas se marcan de forma detectable con fluoróforos, y cada sonda está claramente marcada. Ejemplos de fluoróforos preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácido 7-amino-4-metil-cumarina-3-acético (AMCA), 5-carboxi-X-rodamina, 6-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), ácido 7-dietilaminocumarina-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-isotiocianato, tetrametilrodamina-6-isotiocianato, 5-carboxiltetrametilrodamina, 6-carboxiltetrametilrodamina, ácido 7-hidroxicumarina-3-carboxílico, ácido N-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico, eosina-5-isotiocianato, eritrosina-5-isotiocianato, SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.), rojo de Texas (Molecular Probes, Inc.), amarillo Lucifer, y azul acetalazida CASCADE (Molecular Probes, Inc.). El marcador particular utilizado no es crítico; deseablemente, sin embargo, el marcador particular no interfiere con la hibridación in situ de la sonda y la detección del marcador en cualquier otra sonda. El marcador deseablemente es detectable en un número de copias tan bajo como sea posible para maximizar la sensibilidad del ensayo y ser detectable por encima de cualquier señal de fondo. También deseablemente, el marcador proporciona una señal muy localizada, proporcionando así un alto grado de resolución espacial.

**[0092]** La unión de fluoróforos a sondas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se puede lograr mediante cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido en particular, por ejemplo, y el nucleótido marcado se puede incorporar en la sonda utilizando técnicas estándar, tales como la traducción nick, cebado aleatorio (Rigby et al, J. Mol Biol 113: 237 (1997)), marcaje por PCR, marcaje final, marcaje directo mediante modificación química de determinados residuos, tales como residuos de citosina (patente de Estados Unidos No. 5.491.224), y similares. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente a los nucleótidos con brazos conectores activados, que han sido incorporados en la sonda, por ejemplo, a través de un enlazador a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los procedimientos para marcar sondas se describen en la patente de los Estados Unidos. No. 5.491.224, y Morrison et al, Molecular Cytogenetics: Protocols and applications, capítulo 2, "Labeling fluorescence in situ Hybridization Probes for Genomic Targets", pág. 21-40, Fan, Ed, Humana Press (2002).

**[0093]** Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros agentes o colorantes en lugar de fluoróforos como restos que contienen marcadores. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, restos que contienen marcadores radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Los agentes que son detectables con luz visible incluyen colorantes cianina. Alternativamente, se pueden utilizar restos de detección que se visualizan por medios indirectos. Por ejemplo, las sondas pueden marcarse con biotina o digoxigenina usando procedimientos de rutina conocidos en la técnica, y a continuación pueden procesarse adicionalmente para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr a través de la unión posterior de avidina conjugada a un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización y la discriminación de las sondas se pueden lograr tal como se describe a continuación.

**[0094]** Las sondas cromosómicas hibridadas a regiones diana alternativamente pueden ser visualizadas mediante reacciones enzimáticas de restos marcadores con sustratos adecuados para la producción de productos de color insolubles. Cada sonda se puede discriminar de otras sondas dentro del conjunto mediante la elección de un resto marcador distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar a través de la posterior incubación con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro azul tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que el diaminobenzoato sirve como un sustrato para HRP.

#### **Kit**

**[0095]** También se proporciona un kit. En un caso, el kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, y (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente, en el que las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de la próstata obtenida del paciente la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y un % de alteraciones del cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. En otro caso, el kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, y (b) instrucciones para detectar, diagnosticar pronosticar o evaluar el tratamiento terapéutico/profiláctico del cáncer de próstata en un paciente. De este modo, el kit puede comprender (a) un conjunto de sondas que permite el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas comprende una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para la LPL, un locus específico sonda para PTEN, y una sonda centromérica para el cromosoma 8 y (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente, en el que las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de la próstata obtenidas del paciente la presencia de alteraciones cromosómicas. Un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de las células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18) en una muestra de células de la próstata de una ROI del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. Un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 de más 16 (con un intervalo de 9 a 18) en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata. El conjunto de sondas puede comprender además uno o más de una sonda específica del locus de p16 (9p21), fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1 (21q22; 7p21 locus), una sonda centromérica para el cromosoma 3, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 10, y una sonda centromérica para el cromosoma 17. El conjunto de sondas puede comprender además uno o más de una sonda específica del locus para el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27Kip1 (4q43), una sonda específica del locus para CDK2; 12q13), una sonda específica del locus para la ciclina E (CCNE1; 19q12 y CCNE2; 8q22), una sonda específica del locus para el retinoblastoma 1 (Rb1; 13q14), una sonda específica del locus para NK3 homeobox 1 (Nkx3.1; 8p21.2), una sonda específica del locus para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; 7p11), una sonda específica del locus para la fosfoinositido 3-quinasa (PI3K; 3q26), una sonda específica del locus para AKT1 quinasa (Akt1; 14q32), una sonda específica del locus para FKHR (FOXO1; 13q14.11), una sonda específica del locus del homólogo de proteína de unión a p53 (MDM2; 12q14.3-12q15), una sonda específica del locus de p53 (17p13.1), una sonda específica del locus para el homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS; 12p12.1), una sonda específica del locus para el homólogo B1 de oncogén viral del sarcoma murino v-raf (BRAF; 7q34), una sonda específica del locus para la ciclina D1 (CCND1; 11q13), una sonda específica del locus para la LLC de células B/linfoma 2 (BCL2; 18q21.3/18q21.33), y una sonda específica del locus para el receptor de andrógenos (AR; Xq12). El kit puede comprender además instrucciones para evaluar morfológicamente una sección de una próstata de un paciente e identificar al menos una ROI de tumor, al menos una ROI benigna, o al menos una ROI de tumor y al menos una ROI benigna antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas.

**[0096]** Alternativamente, el kit puede comprender además instrucciones para evaluar una sección de una próstata de un paciente mediante inmunofluorescencia e identificar la presencia de una ROI de tumor antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en cuyo caso el kit puede comprender además un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR), que puede estar marcado de forma detectable, y las instrucciones para evaluar una sección de una próstata de un paciente por inmunofluorescencia pueden comprender además poner en contacto la sección con un anticuerpo contra AMACR marcado de forma detectable y detectar la sobreexpresión de AMACR, en el que la sobreexpresión de AMACR en una región de la sección indica la presencia de una ROI de tumor. Las

instrucciones pueden comprender además tratar la sección con recuperación de epítomos inducida por calor antes de la evaluación de la sección de una próstata de un paciente por inmunofluorescencia. Dichos kits pueden comprender además agentes de bloqueo u otras sondas, diversos marcadores o agentes de marcaje para facilitar la detección de las sondas, reactivos para la hibridación (por ejemplo, tampones), una extensión de metafase, y similares.

#### EJEMPLOS

**[0097]** Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente descripción incluyendo la presente invención. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

#### Ejemplo 1

**[0098]** Este ejemplo describe el análisis de muestras de próstata utilizando varias combinaciones de sondas e hibridación in situ fluorescente (FISH).

**[0099]** Se recogieron muestras de prostatectomía de 16 pacientes con adenocarcinoma de próstata en el Rush Medical Center, Chicago, IL. Estaban disponibles dos conjuntos de portaobjetos fijados con formalina, bañados en parafina (FFPE) de nueve pacientes: un conjunto que contenía el área del tumor trazada por un patólogo (región del tumor de interés (ROI)) y el otro conjunto que contenía una zona distante del tumor (ROI distante). Se recogieron portaobjetos de 11 pacientes con hiperplasia prostática benigna (BPH) mediante resección transuretral de la próstata (RTUP) y se utilizaron como controles.

**[0100]** Los portaobjetos se pretrataron por incubación en 1 x SSC (ácido cítrico 15 mM y 0,15 M de NaCl) y la posterior digestión con pepsina. Los portaobjetos se hibridaron por FISH multicolor con los siguientes conjuntos de sondas: MYC, LPL, y la sonda enumeradora de cromosoma (CEP) 8; PTEN, CEP10® y CEP7®; fusiones TMPRSS2-ERG o ETV1; y CEP3®, CEP7®, CEP17®, y p16. Se evaluaron varios campos. Se enumeraron de veinticinco a 50 células/muestra para el número de señales fluorescentes para cada sonda en el conjunto. Todos los patrones de redistribución y cambios del número de copias copiar se observaron y se registraron para la sonda de ruptura de TMPRSS2. Los portaobjetos de ROI distante se rastrearon en busca de patrones de señales de FISH más anormales, y los campos de visión que contenían estos patrones y las regiones adyacentes se enumeraron.

**[0101]** La ROI de tumor en muestras de prostatectomía radical contenían alteraciones cromosómicas, incluyendo amplificación/ganancia de MYC, pérdida de LPL, pérdida de PTEN, redistribución de TMPRSS2, y aneuploidía. Las alteraciones cromosómicas significativas también se observaron en los portaobjetos benignos que contenían ROI distante. Se analizaron los resultados de enumeración para determinar un punto de corte para cada sonda individual o para un clasificador derivado, tal como una relación de dos sondas, que discriminaría mejor patrones de alteraciones asociadas con el cáncer de los patrones en el tejido aparentemente benigno en las muestras de BPH. El punto de corte se basó en el porcentaje de células que contenían una alteración genómica. Un punto de corte fijo de un recuento de señal menor que el recuento de señal media benigna menos 3 desviaciones estándar se utilizó para establecer una pérdida, mientras que un punto de corte fijo de una señal de recuento mayor que el recuento de señal media benigna más tres desviaciones estándar se utilizó para establecer una ganancia. El punto de corte para la redistribución de TMPRSS2 fue mayor que aproximadamente el 20% de las células dentro de la región evaluada que contenía la redistribución. En base a los puntos de corte fijos, se observaron una ganancia de MYC y aneuploidía en 15/16 ROI de tumor y se observó una redistribución de TMPRSS2 en 11/16 ROI de tumor, mientras que se observaron una ganancia de MYC y aneuploidía en 2/9 de ROI distante y se observó una redistribución de TMPRSS2 en 5/9 de ROI distante. Los resultados del análisis demostraron además que la detección de varias alteraciones cromosómicas en los valores de corte seleccionados era altamente específica para las muestras de pacientes con adenocarcinoma.

#### Ejemplo 2

**[0102]** Este ejemplo describe el análisis de muestras de próstata con FISH usando varias combinaciones de sondas.

**[0103]** Se utilizaron un total de seis sondas para la evaluación. Estas seis sondas consistieron en tres sondas centroméricas (CEP® para los cromosomas 7, 8, y 10, así como tres sondas identificadoras específicas del locus (LSI®) (MYC (8q24), LPL (8p21-22) y PTEN (10q23)). La selección de sondas se basó en la revisión de la literatura que reveló aberraciones frecuentes en el cáncer de próstata (Bova y otros, Cancer Res. 53: 3869-3873 (1993); Kagan et al, Oncogene 11: 2121-2126 (1995); Emmert-Buck et al, Cancer Res. 55: 2959-2962 (1995); Yoshimoto et al (2007), supra; y Kazunari et al, J. Nat'l Cancer Inst 9 (18): 1574-1580 (1999)). Las sondas LSI® y CEP® se obtuvieron de Vysis/Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL). Las sondas incluidas para la posterior evaluación se combinaron en dos conjuntos de sondas. El primer conjunto de sondas fue ProVysion®, que consistía en MYC 8q24 (SpectrumGreen®, LPL 8p21-22 (SpectrumOrange®, y CEP8® (SpectrumAqua®). El segundo conjunto de sondas (conjunto PTEN) incluía PTEN (SpectrumOrange®), CEP7® (SpectrumAqua), y CEP10® (SpectrumGreen).

**[0104]** Se obtuvieron treinta y tres muestras de prostatectomía radical (PR) de pacientes con adenocarcinoma de próstata de Rush University Medical Center, Chicago, IL. Para cada muestra, se trazó una sección de tejido de 4-6 µm por un patólogo para marcar la región o regiones del tumor. Para 17 de los 33 casos de RP, una segunda sección estaba disponible con sólo el tejido histológicamente benigno. Veintiséis muestras de hiperplasia prostática benigna (BPH) sirvieron como controles (Nakayama et al, J. Cell Biochem 91 (3): 540-552 (2004)). Las señales de FISH para cada una de las 6 sondas se enumeraron en 50-100 células por sección.

**[0105]** Para cada muestra, se trazó una sección de tejido de 5 µm por un patólogo para marcar la región o regiones del tumor, si está presente. Se cocieron los portaobjetos con sección de tejido FFPE a 56°C durante 2-24 horas, tratados previamente tres veces en Hemo-De (Scientific Safety Solvents) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente, se aclararon dos veces en 100% de etanol durante un minuto cada uno a temperatura ambiente, se incubaron en ácido fórmico al 45%/peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se aclararon en agua desionizada durante tres minutos. Los portaobjetos se incubaron a continuación en solución de pretratamiento (1XSSC, pH 6,3) a 80°C durante 35 minutos, se aclararon durante tres minutos en agua desionizada, se incubaron durante 22 minutos en pepsina al 0,15% en HCl 0,1N a 37°C, y se aclararon de nuevo durante tres minutos en agua desionizada. Los portaobjetos se deshidrataron durante 1 minuto cada uno en 70%, 85% y 100% de etanol y a continuación se secaron al aire. Se añadieron diez microlitros de cada mezcla de de hibridación de sondas respectiva (tampón LSI®, ADN de bloqueo, y sondas marcadas) a las muestras, y se aplicó un cubreobjetos y se selló con cemento de caucho. Los portaobjetos se desnaturalizaron simultáneamente durante cinco minutos a 73°C y se hibridaron durante 16-24 horas a 37°C en ThermoBrite (Vysis/Abbott Molecular, Inc.). Después de la hibridación, se retiraron los cubreobjetos, y los portaobjetos se lavaron en 2X SSC/NP-40 al 0,3% a 73°C durante dos minutos y a continuación en 2X SSC/NP-40 al 0,1% durante un minuto a temperatura ambiente. Se colocaron diez microlitros de contratinción DAPI I en el portaobjetos, y se aplicó un cubreobjetos.

**[0106]** Después de la hibridación, se realizó la enumeración de señales FISH. Cada muestra se analizó bajo un microscopio de fluorescencia usando filtros de paso de banda única (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) específicos para DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol), SpectrumOrange®, SpectrumGreen® y SpectrumAqua®. Se registró el número de señales de FISH para cada sonda en un mínimo de 50 núcleos interfase intactos, no solapados, consecutivos (tales como núcleos de aproximadamente 50-100 células) en las zonas de interés, que se identificaron por tinción con DAPI de los núcleos con referencia al correspondiente tejido teñido con H&E. Los parámetros de alteración tenidos en cuenta para cada sonda fueron los siguientes: ganancia: [recuento de señal] > 2, pérdida: [recuento de señal] <2, y alteración: [recuento de señal] > 2 o <2. Los puntos de corte fijos se calcularon como "media de % recuentos de células alteradas en 26 muestras de BPH + 3 SD". La alteración de la muestra se definió como "% de células alteradas ≥ puntode corte."

**[0107]** Se observaron señales de FISH alteradas en los portaobjetos para MYC, LPL, CEP8®, PTEN, CEP10® y CEP7®. Las alteraciones cromosómicas para amplificación/ganancia de MYC, pérdida de LPL y PTEN, y aneusomía no solamente se observaron en regiones tumorales de interés (ROIs) de las muestras de prostatectomía radical, sino también en algunas ROI benignas. La Tabla 1 muestra el resumen de los datos de enumeración. Veintidós de las 33 muestras tenía alteraciones que se detectaron con el conjunto de sondas ProVysion® (66,7%), y 20 de 33 muestras tenían alteraciones que se detectaron con el conjunto de sondas de PTEN (60,6%). La alteración total detectada para ROI de tumor con el conjunto de sondas ProVysion® + PTEN fue de 23/33, que es el 69,7%. De forma destacada, se observó un número significativo de alteraciones cromosómicas en 8 de 17 portaobjetos (8/17 = 47,1%; 4/17 = 23,5% para ProVysion®; 6/17 = 35,3% conjunto de sondas de PTEN) que contenían una ROI distante ("ROI distante") de un tumor (Tabla 1). Se observaron la ganancia y pérdida del cromosoma 8 de forma simultánea en una muestra entre la mayoría de los casos de cáncer de próstata analizados.

**Tabla 1. Alteraciones cromosómicas de los datos de enumeración FISH**

Número de muestra	ROI de tumor (33)		ROI distante (17 de 33)	
	ProVysion®	Grupo PTEN	ProVysion®	Grupo PTEN
01	POS	POS	POS	POS
02	NEG	NEG	NEG	NEG
03	POS	POS	NA	
04	NEG	NEG	NA	
05	POS	POS	NEG	NEG
06	NEG	NEG	NA	
07	NEG	NEG	NEG	NEG
08	NEG	NEG	NA	
09	POS	NEG	NA	
10	POS	POS	NA	
11	NEG	NEG	NEG	NEG
12	NEG	NEG	NEG	NEG
13	POS	POS	NEG	NEG
14	POS	NEG	NEG	NEG

15	NEG	NEG	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NA	NEG
17	POS	POS	NA	NEG
18	POS	POS	POS	NEG
19	POS	POS	NA	NEG
20	NEG	NEG	POS	NEG
21	NEG	POS	NA	NEG
22	POS	POS	NA	NEG
23	POS	POS	NA	NEG
24	POS	NEG	NA	NEG
25	POS	POS	NEG	POS
26	POS	POS	NA	POS
27	POS	POS	NEG	POS
28	POS	POS	NA	POS
29	POS	POS	NEG	POS
30	POS	POS	NA	POS
31	POS	POS	NA	POS
32	POS	POS	POS	POS
33	POS	POS	NEG	POS

POS = positivo  
NEG = negativo

[0108] Los resultados de enumeración se analizaron adicionalmente mediante Receiver Operating Characteristic (curva ROC) usando SAS versión 8.2 (SCA # S05020002). Para seleccionar las sondas y determinar un algoritmo de análisis FISH óptimo que produce la más alta sensibilidad y especificidad, se consideraron los siguientes parámetros para cada sonda:

- % de ganancia, porcentaje de células con > 2 señales,
- % de pérdida, porcentaje de células con < 2 señales,
- % alteraciones, porcentaje de células con > 2 o < 2 señales, y
- para proporciones de 2 sondas (sonda A/sonda B), % de ganancia fue el porcentaje de las células con una proporción A/B > 1, % de pérdida fue el porcentaje de células con una proporción A/B < 1.

[0109] Una combinación de parámetros de % de ganancia de MYC/LPL, % de pérdida de PTEN, % de ganancia de MYC/CEP8® y % de alteraciones de CEP8® dentro de las regiones tumorales trazadas identificaron el adenocarcinoma en 97,1% (33/34) de muestras de RP, con una especificidad del 96,2% (25/26) con relación a BPH ( $\chi^2 p < 0,001$ ). Cuando se detectó en regiones de histología normal, estas alteraciones se correlacionaron con adenocarcinoma en 82,4% (14/17 muestras de RP,  $\chi^2 p < 0,001$  en relación con BPH). La tabla 2 es el resumen del análisis ROC de AUC (área bajo la curva), la mejor especificidad y sensibilidad para cada sonda y combinación de sondas.

**Tabla 2. Análisis ROC**

Sondas y alteraciones	ROI del tumor			ROI benigna		
	AUC	Especificidad	Sensibilidad	AUC	Especificidad	Sensibilidad
% de ganancia de MYC/LPL O % de alteraciones de CEP8 O % de pérdida de PTEN O % de ganancia de MYC/CEP8	0,98	96,2	97,1	0,85	82,4	80,8
% de ganancia de CEP7/CEP10	0,68	69,2	58,8	0,62	84,6	47,1
% de ganancia de MYC/CEP8	0,91	88,5	76,5	0,48	64,5	70,6
% de pérdida de LPL/CEP8	0,85	84,6	82,4	0,60	84,6	47,1
% de pérdida de	0,881	80,8	82,4	0,788	80,8	64,7



PTEN/CEP10 *+						
% de ganancia de MYC/LPL	0,90	96,2	79,4	0,69	80,8	58,8
% de alteraciones de CEP7 *+	0,896	80,8	88,2	0,845	80,8	76,5
% de alteraciones de CEP8 +	0,966	88,5	94,1	0,752	76,9	64,7
% de alteraciones de CEP10 +	0,865	80,8	79,4	0,775	73,1	76,5
% de ganancia de MYC *+	0,908	76,9	91,2	0,846	76,9	82,4
% de alteraciones de LPL +	0,945	92,3	79,4	0,736	76,9	64,7
% de pérdida de PTEN *+	0,726	80,8	58,8	0,827	80,8	70,6
% de ganancia de CEP7 +	0,886	84,6	85,3	0,77	76,9	70,6
% de ganancia de CEP8 *+	0,853	76,9	79,4	0,871	76,9	82,4
% de ganancia de CEP10 +	0,93	84,6	94,1	0,786	84,6	76,5
AUC = área bajo la curva						

[0110] También se utilizó otro procedimiento para analizar el conjunto de datos que primero criban las sondas FISH potencialmente importantes mediante la comparación de los diferentes grupos de muestras (ROI tumor vs. BPH, y ROI benigna vs. BPH) utilizando prueba t de dos muestras. Se seleccionaron los parámetros de FISH con los valores de p significativos (valor de  $p < 0,05$ ) de la prueba t para un examen más a fondo.

[0111] Se evaluaron dieciséis parámetros derivados del número de copias genómicas detectado por FISH. Estos parámetros fueron % de alteraciones de CEP10, % de ganancia de CEP10, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de CEP7, % de alteraciones de CEP8, % de ganancia de CEP8, % de pérdida de CEP8, % de ganancia de MYC, % de alteraciones de LPL, % de pérdida de LPL, % de pérdida de PTEN, % de pérdida de PTEN/CEP10, % de ganancia de CEP7/CEP10, % de pérdida de LPL/CEP8, % de ganancia de MYC/CEP8 y % de ganancia de MYC/LPL. Los resultados de los análisis de la prueba t demostraron que para todos los 16 parámetros de FISH, sus valores promedio eran estadísticamente diferentes entre los grupos de tumor y BPH (Tabla 3).

Tabla 3. Prueba t de comparación de tumor y BPH

Parámetros FISH	Promedio tumor (Est.)	Promedio BPH (Est.)	valor p
% de Alteraciones de CEP10	40,03 (16,9)	22,92 (8,14 )	<0,0001
% de ganancia de CEP10	17,21 (20,49)	2,31 (4,72)	0,0002
% de Alteraciones de CEP7	37,83 (16,99)	19,46 (6,44)	<0,0001
% de ganancia de CEP7	15,87 (22,22)	1,54 (3,93)	0,0008
% de Alteraciones de CEP8	47,55 (16,02)	23 (6,02)	<0,0001
% de ganancia de CEP8	19,97 (23,73)	1,54 (2,42)	<0,0001
% de pérdida de CEP8	27,58 (15,33)	21,46 (5,78)	0,0383
% de ganancia de MYC	25,61 (29,13)	1,85 (2,71)	<0,0001
% de Alteraciones de LPL	57,45 (22,86)	22,69 (8,58)	<0,0001
% de pérdida de LPL	46,95 (25,91)	21,62 (8,69)	<0,0001
% de pérdida de PTEN	35,38 (23,37 )	20,92 (8,6)	0,0018
% de pérdida de PTEN/CEP10	25,54 (21,41)	7,85 (4,86)	<0,0001
% de ganancia de CEP7/CEP10	19,72 (13,49)	12,15 (5,36)	0,0047
% de pérdida de LPL/CEP8	35,89 (28,69 )	8,08 (4,18)	<0,0001
% de ganancia de MYC/CEP8	26,12 (20,53)	7,77 (4,25)	<0,0001

% de ganancia de MYC/LPL	37,52 (26,36)	8,08 (4,75)	<0,0001
--------------------------	---------------	-------------	---------

5 [0112] Los resultados de la prueba t de datos de ROI benigna y BPH muestran que 10/16 parámetros como se muestran en la Tabla 4 son estadísticamente diferentes por el efecto de campo. Estos diez parámetros de FISH eran % de alteraciones de CEP10, % de ganancia de CEP10, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de CEP7, % de alteraciones de CEP8, % de ganancia de CEP8, % de ganancia de MYC, % de alteraciones de LPL, % de pérdida de PTEN, y % de pérdida de PTEN/CEP10.

Tabla 4. Prueba t de comparación de benigno y BPH

Parámetros FISH	Promedio benigno (Est.)	Promedio BPH (Est.)	valor p	Flag
% de Alteraciones de CEP10	31,41 (9,91)	22,92 (8,14)	0,0038	significativo
% de ganancia de CEP10	5,25 (4,44)	2,31 (4,72)	0,0469	significativo
% de Alteraciones de CEP7	29,82 (8,57)	19,46 (6,44)	<0,0001	significativo
% de ganancia de CEP7	6,39 (6,81)	1,54 (3,93)	0,0139	significativo
% de Alteraciones de CEP8	31,37 (12,92)	23 (6,02)	0,0210	significativo
% de ganancia de CEP8	7,93 (6,93)	1,54 (2,42)	0,0017	significativo
% de pérdida de CEP8	23,44 (13)	21,46 (5,78)	0,5611	
% de ganancia de MYC	9,38 (8,31)	1,85 (2,71)	0,0019	significativo
% de Alteraciones de LPL	32,15 (12,45)	22,69 (8,58)	0,0052	significativo
% de pérdida de LPL	24,63 (11,4)	21,62 (8,69)	0,3312	
% de pérdida de PTEN	34,29 (16,86)	20,92 (8,6)	0,0064	significativo
% de pérdida de PTEN/CEP10	17,71 (16,47)	7,85 (4,86)	0,0275	significativo
% de ganancia de CEP7/CEP10	16,65 (10,26)	12,15 (5,36)	0,1105	
% de pérdida de LPL/CEP8	11,73 (9,45)	8,08 (4,18)	0,1487	
% de ganancia de MYC/CEP8	13,44 (12,84)	7,77 (4,25)	0,0951	
% de ganancia de MYC/LPL	13,97 (11,64)	8,08 (4,75)	0,0618	

10 [0113] Los diez parámetros de FISH, que mostraron una diferencia significativa entre la BPH y grupos de ROI o  
 benigno sobre la base de una prueba t de dos muestras, se seleccionaron para una evaluación adicional. Se aplicó  
 el procedimiento ROC para identificar el valor óptimo de corte para estos parámetros de FISH. La Tabla 5 resume la  
 sensibilidad, especificidad, y AUC para cada uno de estos diez parámetros de FISH que se distinguen en ROI de  
 tumor y BPH, así como entre ROI benigna y BPH. Se seleccionaron los cinco primeros parámetros individuales de  
 15 FISH en base a sus valores de AUC en la distinción de muestras de ROI benigna frente a BPH por efecto de  
 campo. Eran % de pérdida de PTEN/CEP10, % de pérdida de PTEN, % alteraciones de CEP7, % de ganancia de  
 MYC y % de ganancia de CEP8, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Selección de los cinco primeros parámetros individuales de FISH

Parámetros de FISH	tumor-BPH			benigna-BPH		
	Sensibilidad	Especificidad	AUC	Sensibilidad	Especificidad	AUC
% de ganancia de	0,794	0,769	0,853	0,824	0,769	0,871

<b>CEP8</b>						
% de ganancia de MYC	0,912	0,769	0,908	0,824	0,769	0,846
% de alteraciones de CEP7	0,882	0,808	0,896	0,765	0,808	0,845
% de pérdida de PTEN	0,808	0,726	0,706	0,588	0,808	0,827
% de pérdida de PTEN/CEP10	0,808	0,881	0,647	0,824	0,808	0,788
% de ganancia de CEP10	0,846	0,941	0,93	0,765	0,846	0,786
% de alteraciones de CEP10	0,808	0,865	0,765	0,794	0,731	0,775
% de ganancia de CEP7	0,846	0,886	0,706	0,853	0,769	0,77
% de alteraciones de CEP8	0,885	0,966	0,647	0,941	0,769	0,752
% de alteraciones de LPL	0,923	0,945	0,647	0,794	0,769	0,736

[0114] Los cinco parámetros de la sonda individuales principales se agruparon en todas las combinaciones posibles de conjuntos de cuatro sondas, y a continuación se analizaron mediante Receiving Operating Characteristic (curva ROC) usando SAS con valores de corte que iban desde el 5% al 35% en 1% en muestras benignas para los valores de corte, AUC, así como el mínimo DFI. Para las combinaciones de múltiples sondas, variando los puntos de corte de forma independiente para cada parámetro se genera un campo de puntos en el gráfico, y los puntos con el valor de sensibilidad más alto en cada valor de especificidad se utilizan para definir la curva ROC. Aunque se utilizaron procedimientos estadísticos para generar combinaciones posibles y de corte de valores, se utilizó el juicio científico para ponderar las diversas compensaciones para dar lugar a la decisión final de los valores de corte y combinaciones de sondas.

[0115] El análisis en la Tabla 6 mostró que el conjunto de sondas 3 tiene el mayor AUC de 0,938, mientras que el AUC del conjunto de sondas 1 es el segundo más grande de 0,917 con el menor DFI, y la mejor sensibilidad y especificidad. El conjunto de sondas 3 tiene una sola sonda LSI, a saber, PTEN, mientras el conjunto de sondas 1 tiene dos sondas LSI, a saber, PTEN y MYC. Las sondas CEP se utilizan para detectar aneuploidía, mientras que las sondas LSI se utilizan generalmente para detectar la delección, duplicación o amplificación de genes específicos. Basándose en este análisis, se seleccionó el conjunto de sondas 1, incluyendo el % de pérdida de PTEN, el % de alteraciones de CEP7, el % de ganancia de MYC, y el % de ganancia de CEP8. Las correspondientes sensibilidad y especificidad del conjunto de sondas 1 son 0,882 y 0,846, respectivamente.

Tabla 6. Análisis ROC de combinaciones de cuatro sondas de los primeros cinco parámetros individuales de FISH

Sondas	Combinación de sondas	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Corte 4	DFI	Sensibilidad	Especificidad	AUC
Conjunto de sondas 1	% pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8	33	28	35	34	0,194	0,882	0,846	0,917
Conjunto de sondas 2	% pérdida de PTEN/CEP10, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC	35	25	35	ND	0,261	0,824	0,808	0,911
Conjunto de sondas 3	% pérdida de PTEN/CEP10, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de CEP8	35	25	34	ND	0,225	0,882	0,808	0,938
Conjunto de sondas 4	% pérdida de PTEN/CEP10, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8	35	5	35	ND	0,371	0,647	0,885	0,834

**[0116]** La representación de curvas ROC para la mejor combinación de cuatro sondas y los cuatro parámetros de FISH individuales, incluyendo el % de pérdida de PTEN, el % de alteraciones de CEP7, el % de ganancia de MYC, el % de ganancia de CEP8, se muestran en la Figura 4. Los datos se obtuvieron de la evaluación FISH de las 17 muestras de ROI benigna y 26 muestras de BPH. El cálculo de la combinación de cuatro sondas de las 33 muestras de ROI de tumor y 26 muestras de BPH también se muestra en el gráfico de ROC. Las AUC de las curvas ROC se muestran en la tabla bajo la representación de ROC.

**[0117]** La tabla 7 fue el resumen del rendimiento de la combinación de 4 sondas. Los valores de corte seleccionados para cuatro parámetros de sonda individuales fueron % de pérdida de PTEN > 33, % de alteraciones de CEP7 > 28, % de ganancia de MYC > 35, y % de ganancia de CEP8 > 34. La sensibilidad de la combinación de 4 sondas fue del 100% y la especificidad del 84,6% para ROI de tumor vs. BPH. Cuando se hizo la comparación de ROI benigna con BPH, la combinación de sondas proporcionó una sensibilidad del 88,2% y una especificidad del 84,6%.

**Tabla 7. Resumen de la combinación de cuatro sondas con valores de corte**

Parámetro FISH	BPH tumor**			BPH benigna**		
	Sensibilidad	Especificidad	AUC	Sensibilidad	Especificidad	AUC
Combinación*	1,000	0,846	0,960	0,882	0,846	0,917
* Combinación: % de pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8						
** Corte 1 % de pérdida de PTEN 33; corte 2 % de alteraciones de CEP7 28; corte 3 % de ganancia de MYC 35; corte 4 % de ganancia CEP8 34						

**[0118]** El análisis ROC mostrado en la figura 5 define aún más el intervalo de corte para cada parámetro FISH individual del conjunto de sondas seleccionadas.

**[0119]** En comparación con la prueba de PSA, la sensibilidad para los pacientes con un nivel de PSA en suero por encima de 4,0 ng/ml es aproximadamente un 20% en serie contemporánea, y la especificidad de la prueba de PSA es de aproximadamente el 60% al 70% (Prostate-Specific Antigen Best Practice Statement 2009 Update, American Urological Association). Con la prueba FISH utilizando un conjunto de 4 sondas seleccionada en este estudio, se consiguieron el 100% de sensibilidad y 84,6% de especificidad para muestras tumorales. Por lo tanto, el ensayo FISH tiene el potencial de superar a prueba de PSA. Con alta sensibilidad, un resultado negativo puede descartar la posibilidad de cáncer, y se pueden evitar biopsias adicionales. Por otra parte, PSA tiene una menor capacidad discriminante en los hombres con BPH sintomática (Meigs et al, J. Gen. Intern Med 11: 505 (1996)), mientras que el ensayo de FISH descrito en el presente documento tiene el potencial de detectar ROI benignas en base al efecto de campo con una sensibilidad del 88,2% y una especificidad del 84,6%.

**[0120]** Otro ensayo utilizado para el diagnóstico del cáncer de próstata es la prueba de PCA3 (Vlaeminck-Guillem et al, Urology. 75: 447 (2010)). En cuatro estudios que evaluaban los pacientes con PSA indeterminado (2,5 a 10,0 ng/ml), la sensibilidad fue del 53 al 84 por ciento y la especificidad varió del 71 al 80 por ciento. En tres estudios con al menos 200 pacientes que proporcionaron datos sobre el rendimiento de PCA3 después de una biopsia negativa anterior, la sensibilidad varió entre un 47 y un 58 por ciento, y la especificidad varió del 71 al 72 por ciento. Aunque PCA3 tiene un mejor rendimiento que el PSA en la predicción de forma independiente de una biopsia positiva, el rendimiento del ensayo FISH con cuatro sondas descrito en el presente documento es mejor que ambas pruebas de PSA y de PCA3, con 100% de sensibilidad y 84,6% de especificidad para las muestras de tumor, y 88,2% de sensibilidad y 84,6% de especificidad para ROI benignas.

**[0121]** Además de lo anterior, el ensayo de FISH se puede utilizar también en células de muestras congeladas o muestras de citología. La evaluación incluye la detección de señales a través de microscopía o adquisición de imágenes, la enumeración de la señal, y los posteriores algoritmos de análisis de datos. El ensayo de FISH utiliza el ADN estable para la detección de grandes cambios cromosómicos (delección, amplificación, aneusomía, y translocación), permite la evaluación molecular que se combina con la morfología del tejido, puede detectar alteraciones raras en los cánceres multifocales y heterogéneos, puede detectar la presencia de cáncer en una muestra de biopsia que no contiene tumor real tal como se accede mediante evaluación histológica, se puede utilizar como una prueba independiente o como un complemento a otras pruebas (por ejemplo, histología, PSA, nomograma, metilación, y mutación), y, mediante combinación de sondas, permite un aumento de la sensibilidad y especificidad a realizar, en comparación con un único ensayo de analito.

**[0122]** El procedimiento puede ayudar a la evaluación de tejido histológico para distinguir el cáncer de condiciones benignas difíciles (BPH), para distinguir tejido benigno de lesiones precancerosas, y puede ayudar en el diagnóstico de adenocarcinoma en biopsia, resección transuretral (TURP), o muestras quirúrgicas (prostatectomía radical).

**[0123]** En este estudio con un conjunto de muestras RP, se observaron alteraciones cromosómicas dentro de las regiones tumorales, así como dentro de las regiones de histología normal que se extendían más allá del tumor histológicamente evidente, lo cual confirmó el efecto de cancerización de campo del cáncer de próstata. La detección FISH de la cancerización de campo puede reducir el área de muestreo de biopsia para el diagnóstico mediante el descubrimiento de alteraciones cromosómicas en células de campo aparte de un cáncer existente que se ha

escapado mediante la biopsia. Por lo tanto, una prueba molecular a base de FISH para medir MYC, CEP8, PTEN, y CEP7 puede permitir la detección de cáncer, escapado de otra manera por el examen histopatológico y, así, mejorar el diagnóstico del cáncer de próstata mediante la reducción del error de muestreo de biopsias con aguja en próstata.

### 5 Ejemplo 3

**[0124]** Este ejemplo describe el análisis de muestras de próstata con inmunofluorescencia (IF) y FISH usando varias combinaciones de sondas.

10 **[0125]** Se analizaron los mismos portaobjetos de tejido de tumor sólido de próstata FFPE (Korac et al, J. Clin Pathol 58: 1336-1338 (2005)) por inmunofluorescencia y FISH. Se desarrolló un protocolo de pretratamiento de muestras/recuperación de antígenos y se optimizó para obtener los mejores resultados en el tejido FFPE.

15 **[0126]** La primera etapa de este procedimiento fue la recuperación de epítomos inducida por calor (HIER). Los portaobjetos de FFPE fueron tratados con Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) durante 10 minutos, D-limoneno durante 10 minutos, dos veces con 100% de etanol durante dos minutos, 85% de etanol durante dos minutos, 70% de etanol durante dos minutos, 50% de etanol durante dos minutos, 30% de etanol durante dos minutos, y agua durante cinco minutos. A continuación, los portaobjetos se calentaron en tampón de citrato de sodio, pH 6,0, a 100°C durante 30 minutos, se enfriaron en un tampón de citrato de sodio, pH 6,0, durante 20 minutos, se sumergieron en agua durante 5 minutos, y a continuación se sumergieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante cinco minutos.

25 **[0127]** La segunda etapa fue IF usando un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) (Zhong et al, Am J. Clin Pathol 123: 231-236 (2005)) y el ensayo de amplificación de señal con tiramida (Sokolova et al, J. Molec Diag 9 (5): 604-611 (2007)). El kit de ensayo de solución de tiramida y el kit de Alexa Fluor 488 TSA® (amplificación de la señal con tiramida) número 2 con peroxidasa de rábano picante (HRP) (catálogo no T20912; Invitrogen, Carlsbad, CA; Molecular Probes, Eugene, OR) se utilizaron según las instrucciones del fabricante. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió reactivo de bloqueo (100  $\mu$ l/portaobjetos) y se incubaron los portaobjetos en una caja humidificada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo contra AMACR diluido (100  $\mu$ l; conejo; P504S; clon 13H4; Sigma, St. Louis, MO) (diluido en 1% de reactivo de bloqueo al 1:100) y los portaobjetos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron tres veces durante cinco minutos en PBS/Tween 20 al 0,1%. La solución madre de conjugado de HRP se diluyó 1:100 en solución de bloqueo al 1%. Un volumen de 100  $\mu$ l de esta solución de trabajo era suficiente para cubrir cubreobjetos estándar de 22 X 22 mm. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces durante cinco minutos en PBS/Tween 20 al 0,1%, y se lavaron una vez en PBS. Se añadió solución de tiramida (100  $\mu$ l por portaobjetos) a cada portaobjetos, y el portaobjetos se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los portaobjetos se lavaron durante cinco minutos en PBS y a continuación se lavaron durante cinco minutos en agua Milli-Q.

40 **[0128]** La tercera etapa fue FISH. Los portaobjetos se deshidrataron en alcohol (70%, 85% y 100%, un minuto cada uno) y se dejaron secar al aire completamente. Se añadió solución de sonda (10  $\mu$ l) a cada portaobjetos, y se colocó un cubreobjetos sobre el portaobjetos con cemento de caucho. La sonda y el ADN diana se desnaturalizaron simultáneamente a 73°C durante cinco minutos y se hibridaron a portaobjetos durante la noche a 37°C. Los cubreobjetos se retiraron por inmersión en 2 x SSC/NP-40 al 0,1% a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron en 2 x SSC/NP-40 al 0,3% a 73°C durante 2 minutos, 2 x SSC/N-4 al 0,1% a temperatura ambiente durante un minuto, y a continuación con agua, y se dejaron secar al aire completamente en la oscuridad. Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI.

50 **[0129]** Utilizando IF medida por tiramida con anticuerpo contra AMACR en combinación con sondas FISH de PTEN (SpectrumOrange®) y CEP7® (SpectrumAqua®), se procesaron y evaluaron siete muestras. AMACR es un marcador específico de células cancerosas. Consistentemente sobreexpresa en el epitelio de cáncer de próstata. Su expresión se incrementa también en lesiones premalignas (neoplasia intraepitelial prostática) (Zhong et al. (2005, supra). La tinción de AMACR es fuertemente positiva en la ROI de tumor, lo que indica que la proteína AMACR se sobreexpresa. La mayoría de las células de esta región tienen solamente un alelo de PTEN por el ensayo de FISH, lo que indica una delección de PTEN, y dos alelos de CEP 7, lo que indica que el cromosoma 7 está intacto. Los resultados de análisis de las siete muestras se muestran en la tabla 8. La tabla muestra que 12 de 14 áreas (12/14 = 85,7%) de siete muestras de la tinción con IF (AMACR positivo + o negativo -) se correlacionaron con alteraciones de señal FISH de las sondas ensayadas, así como con la evaluación morfológica del tumor por un patólogo. En el cáncer de próstata heterogéneo y multifocal, la tinción de anticuerpos contra AMACR identificó áreas de interés para la evaluación por FISH.

Tabla 8. Inmunofluorescencia y análisis FISH.

Muestra	Tipo de portaobjetos	Estado AMACR	FISH (PTEN o CEP7)
23	área de tumor (trazada en el interior)	+	Anormal
		+	Normal
		-	Normal
01	benigno	-	Normal
		+	Anormal
15	Tumor	-	Normal
03	Tumor	+	Anormal
25	Tumor (área trazada en el interior)	+	Anormal
		-	Normal
	Tumor (área trazada en el exterior)	+	Anormal
		-	Normal
10	Tumor (área trazada en el interior)	+	Anormal
	Tumor (área trazada en el exterior)	+	Anormal
18	Tumor	+	Normal

## 5 Ejemplo 4

**[0130]** Este ejemplo describe un procedimiento de pretratamiento de la muestra histológica y de hibridación para el cáncer de próstata.

10 **[0131]** Se cocieron los portaobjetos de muestras histológicas (secciones) FFPE (fijadas en formalina y bañadas en parafina) a 56°C durante 2-24 horas, a continuación se pretrataron dos a tres veces en Hemo-De (Scientific Safety Solvents) o Xylene durante 5 a 10 minutos cada uno a temperatura ambiente, seguido de dos aclarados de 1 minuto en 100% de etanol a temperatura ambiente, incubación en ácido fórmico al 45%/peróxido de hidrógeno al 0,3% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y un aclarado en agua desionizada durante 3-10 minutos. Los portaobjetos se incubaron a continuación en solución de pretratamiento (1 X SSC, pH 6,3) a 80 +/- 5°C durante 35-50 minutos, se aclararon durante 3 minutos en agua desionizada, se incubaron 22 +/- 5 minutos en pepsina al 0,15% en solución de HCl 0,1 N a 37°C, y se aclararon de nuevo durante 3 minutos en agua desionizada. Los portaobjetos se deshidrataron durante 1 minuto cada uno en 70%, 85% y 100% de etanol y a continuación se secaron al aire. Se añadieron diez microlitros de cada mezcla de hibridación de sonda respectiva (tampón LSI®, ADN de bloqueo, sondas marcadas) a las muestras, y se aplicó un cubreobjetos y se selló con cemento de caucho. Los portaobjetos se desnaturalizaron simultáneamente durante 5 minutos a 73 +/- 2°C y se hibridaron durante 10-24 horas a 37°C en un ThermoBrite (Vysis/Abbott Molecular, Inc.) Después de la hibridación, se retiraron los cubreobjetos. La muestra se colocó en una solución de lavado que consistía en 0,3x - 2x SSC y NP-40 al 0,3%-0,5%, y la temperatura de la muestra se elevó a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2-5 minutos. A continuación, el soporte que llevaba la muestra se contratiñó con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución, o tras secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contratiñó con aproximadamente 10 µl de DAPI, y se colocó un nuevo cubreobjetos se colocó sobre la muestra. A continuación, la muestra se observó o almacenó, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

## 30 Ejemplo 5

**[0132]** Este ejemplo describe un procedimiento IF-FISH de portaobjetos de próstata FFPE.

35 **[0133]** Para el ensayo de FISH e inmunofluorescencia (IF) simultáneos sobre el mismo portaobjetos de tejido tumoral sólido de próstata FFPE, se desarrolló un protocolo de pretratamiento de muestras/recuperación de antígeno y se optimizó para mejores resultados en el tejido FFPE para IF-FISH.

40 **[0134]** La primera etapa de este procedimiento es la recuperación de antígeno. Los portaobjetos FFPE con cáncer de próstata se cocieron a 56°C durante 2 horas a toda la noche. A continuación, los portaobjetos se desparafinaron mediante dos inmersiones en Hemo-De durante 10 minutos cada uno. Los portaobjetos se incubaron a continuación en 100% de etanol durante 2 minutos dos veces. Los portaobjetos se hidrataron mediante la colocación en 85%, 70%, 50% y 30% de etanol durante 2 minutos cada uno. Se llevó a cabo una última inmersión de 5 minutos en agua Milli-Q de grado molecular. Se preclentó un baño de agua con un recipiente Coplin que contenía tampón de citrato de sodio (citrato de sodio 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 6,0) hasta que la temperatura alcanzó 96 +/- 4°C. Los portaobjetos se incubaron durante 20-60 minutos. Los portaobjetos se enfriaron a temperatura ambiente durante 20-40 minutos en la mesa de trabajo. Los portaobjetos se lavaron durante cinco minutos en agua Milli-Q y se aclararon una vez durante cinco minutos en PBS.

5 [0135] La segunda etapa es la inmunofluorescencia (IF) con anticuerpo AMACR y el ensayo de amplificación de  
señal con tiramida. El kit de ensayo de solución de tiramida y el kit de Alexa Fluor 488 TSA® (amplificación de la  
señal con tiramida) número 2 con peroxidasa de rábano picante (HRP) (catálogo no T20912; Invitrogen, Carlsbad,  
CA; Molecular Probes, Eugene, OR) se utilizaron según las instrucciones del fabricante. La actividad de peroxidasa  
10 endógena se bloqueó mediante incubación en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió  
reactivo de bloqueo (100 µl/portaobjetos) con incubación en una caja humidificada durante 30 minutos a temperatura  
ambiente. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de conejo contra AMACR diluido (diluido en 1% de reactivo de bloqueo  
al 1:100) con incubación durante una hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron tres veces durante  
15 cinco minutos en PBS/Tween 20 al 0,1%. La solución madre de conjugado de HRP se diluyó 1:100 en solución de  
bloqueo al 1%. Un volumen de 100 µl de esta solución de trabajo es suficiente para cubrir un cubreobjetos estándar  
de 22 X 22 mm. Los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se  
lavarón tres veces durante cinco minutos cada uno en PBS/Tween 20 al 0,1%, y a continuación se lavaron una vez  
en PBS. Se añadieron 100 µl de solución de tiramida por portaobjeto, seguido de la incubación durante 10 minutos a  
temperatura ambiente en la oscuridad. Los portaobjetos se lavaron a continuación durante cinco minutos en PBS y  
cinco minutos en agua Milli-Q.

20 [0136] La tercera etapa es el ensayo FISH. Los portaobjetos se deshidrataron en alcohol (70%, 85% y 100%, un  
minuto cada uno) y se dejaron secar al aire completamente. Se añadieron 10 µl de solución de sonda a cada  
portaobjetos, y se sellaron cubreobjetos sobre el portaobjetos con cemento de caucho. La sonda y el ADN diana se  
desnaturalizaron a 73°C durante cinco minutos, seguido de hibridación durante la noche a 37°C. La muestra se  
colocó en la solución de lavado que consistía en 0,3x-2x SSC y NP-40 al 0,3%-0,5% y la temperatura de la muestra  
se elevó a aproximadamente 73°C durante aproximadamente 2 minutos. A continuación, el soporte que llevaba la  
25 muestra se contratiñó con una tinción de unión a ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en  
solución, o tras secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, la muestra se contratiñó con aproximadamente  
10 µl de DAPI, y se colocó un nuevo cubreobjetos sobre la muestra. A continuación, la muestra se observó o  
almacenó, por ejemplo, a aproximadamente -20°C.

30 [0137] Todas las patentes, publicaciones de solicitud de patentes, artículos de revistas, libros de texto, y otras  
publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la  
materia a la que pertenece la invención.

35 [0138] La descripción, incluyendo la invención, descrita de manera ilustrativa en este documento puede ponerse en  
práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos o limitación o limitaciones, que no se  
describan específicamente en este documento. De este modo, por ejemplo, cada caso en el presente documento de  
cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser  
sustituido por cualquiera de los otros dos términos. Del mismo modo, las formas singulares "un", "una" y "el/la"  
incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo,  
las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo, que se describen en el  
40 presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción.

45 [0139] Los términos y expresiones, que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de  
limitación. En este sentido, cuando ciertos términos se definen bajo "Definiciones" y se definen, describen o discuten  
de otro modo en otra parte de la "Descripción detallada", todas estas definiciones, descripciones y discusiones  
pretenden atribuirse a tales términos. Tampoco hay ninguna intención al usar tales términos y expresiones de excluir  
ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Además, aunque se utilizan  
50 subtítulos, por ejemplo, "Definiciones", en la "Descripción detallada", dicho uso es únicamente para facilitar la  
referencia y no se pretende limitar cualquier descripción realizada en una sección a solamente esa sección; más  
bien, cualquier descripción realizada bajo un subtítulo pretende constituir una descripción en virtud de todos y cada  
uno de los subtítulos.



## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección del cáncer de próstata en un paciente, cuyo procedimiento comprende:  
 5 poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en el que un % de ganancia de MYC (% de ganancia es el % de células con MYC > 2 señales) superior a 35 (con un intervalo de 2 a 50), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 33 (con un intervalo de 29 a 33), un % de ganancia de cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con > 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 32 a 34), y un % de alteraciones de cromosoma 7 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 28 (con un intervalo de 24 a 29) en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor o una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende determinar alteraciones cromosómicas en una ROI benigna de la misma muestra de tumor.
- 20 3. Conjunto de sondas que consiste en:  
 (a) una sonda específica del locus para MYC;  
 (b) una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN);  
 (c) una sonda centromérica para el cromosoma 8; y  
 (d) una sonda centromérica para el cromosoma 7 o una sonda específica del locus para la lipoproteína lipasa (LPL).
- 25 4. Kit que comprende sondas en el que las sondas consisten en un conjunto de sondas que consisten en:  
 (a) un conjunto de sondas que permiten el diagnóstico del cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas consiste en una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), una sonda centromérica para el cromosoma 8, y una sonda centromérica para el cromosoma 7, y  
 30 (b) instrucciones para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente.
- 35 5. Procedimiento para detectar el cáncer de próstata en un paciente, cuyo procedimiento comprende:  
 poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas marcadas de forma detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para lipoproteína lipasa (LPL), una sonda específica de locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN) y una sonda centromérica para el cromosoma 8 en condiciones de hibridación y determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, en el que un % de ganancia de MYC/LPL (% de ganancia es el % de células con MYC/LPL > 1) superior a 14 (con un intervalo de 12 a 22), un % de alteraciones del cromosoma 8 (% de alteraciones es el % de células con > 2 o < 2 señales) superior a 34 (con un intervalo de 26 a 40), un % de pérdida de PTEN (% de pérdida es el % de células con < 2 señales) superior a 44 (con un intervalo de 22 a 54), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 (% de ganancia es el % de células con MYC/cromosoma 8 > 1) superior a 16 (con un intervalo de 10 a 18), en una muestra de células de la próstata de una región de interés (ROI) del tumor de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata, y  
 40 en el que un % de ganancia de MYC/LPL superior a 18 (con un intervalo de 12 a 19), un % de alteraciones del cromosoma 8 superior a 32 (con un intervalo de 25 a 34), un % de pérdida de PTEN superior a 26 (con un intervalo de 22 a 28), o un % de ganancia de MYC/cromosoma 8 superior a 16 (con un intervalo de 9 a 18), en una muestra de células de la próstata de una ROI benigna de la próstata del paciente indica que el paciente tiene cáncer de próstata.
- 50 6. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 5, en el que la muestra de células de próstata es una sección de la próstata del paciente.
- 55 7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la sección se fija en formalina y se baña en parafina y se coloca en un portaobjetos de un microscopio.
- 60 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que, antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento comprende además evaluar morfológicamente la sección e identificar al menos una ROI de tumor, al menos una ROI benigna o al menos una ROI de tumor y al menos una ROI benigna.
- 65 9. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que, antes de determinar la presencia de alteraciones cromosómicas, el procedimiento comprende evaluar la sección mediante inmunofluorescencia e identificar al menos una ROI de tumor.
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la evaluación de la sección mediante inmunofluorescencia comprende poner en contacto la sección con un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR) marcado de

forma detectable y detectar la sobreexpresión de AMACR, en el que la sobreexpresión de AMACR en una región de la sección indica la presencia de una ROI de tumor, opcionalmente, en el que, antes de evaluar la sección mediante inmunofluorescencia, el procedimiento comprende además tratar la sección con recuperación de epítomos inducida por calor.

5 11. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 5, que comprende determinar las alteraciones cromosómicas en una ROI de tumor.

10 12. Procedimiento, según la reivindicación 5, que comprende determinar las alteraciones cromosómicas en una ROI benigna adyacente a una ROI de tumor.

13. Conjunto de sondas que consiste en:

- 15 (a) una sonda específica del locus para MYC;  
(b) una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (LPL) o una sonda centromérica para el cromosoma 7;  
(c) una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN);  
(d) una sonda centromérica para el cromosoma 8; y  
(e) un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR), que puede estar marcado de forma detectable.

14. Kit que comprende sondas en el que las sondas consisten en un conjunto de sondas que consisten en:

- 20 (a) un conjunto de sondas que permiten el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente, en el que el conjunto de sondas consiste en una sonda específica del locus para MYC, una sonda específica del locus para lipoproteína lipasa (LPL), una sonda específica del locus para fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), y una sonda centromérica para el cromosoma 8 y  
(b) instrucciones para el diagnóstico de cáncer de próstata en un paciente.

25 15. Kit, según las reivindicaciones 4 ó 14, que comprende además un anticuerpo contra  $\alpha$ -metilacil-CoA racemasa (AMACR), que puede estar marcado de forma detectable.

Figura 1a

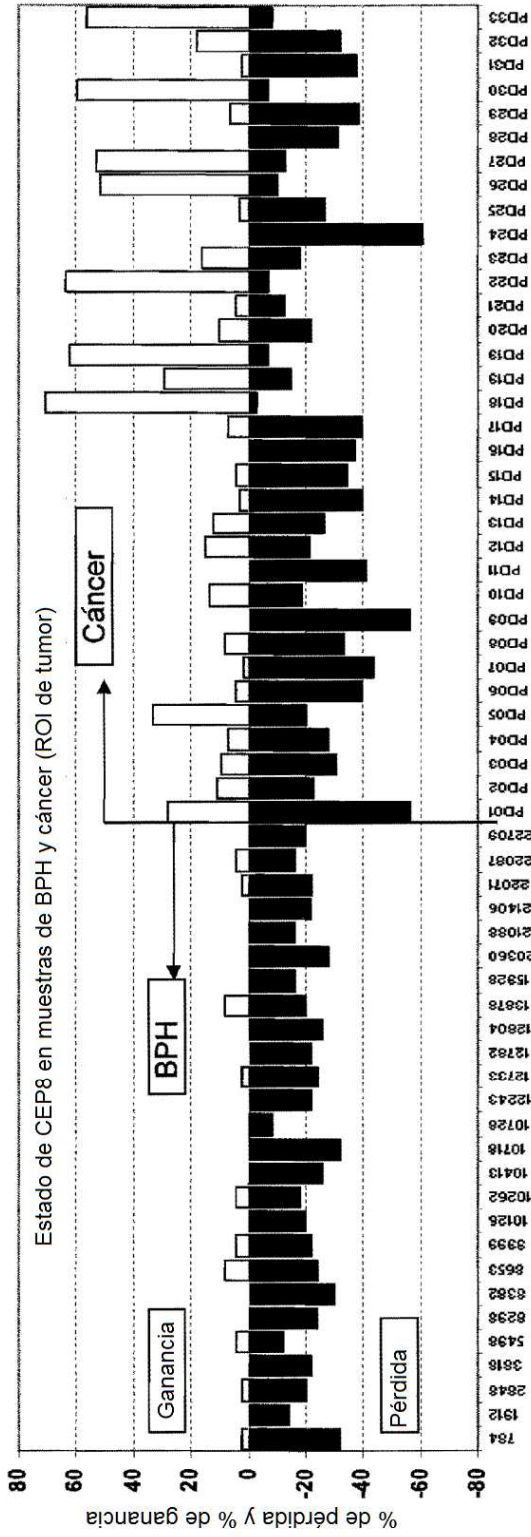


Figura 1b

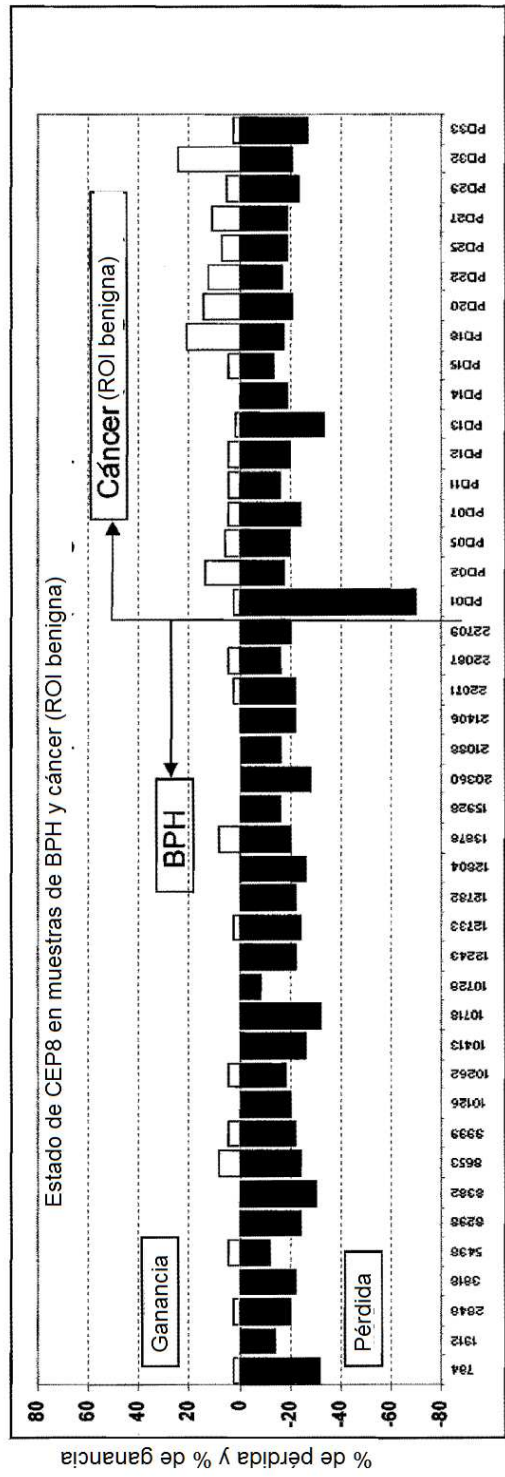


Figura 2a

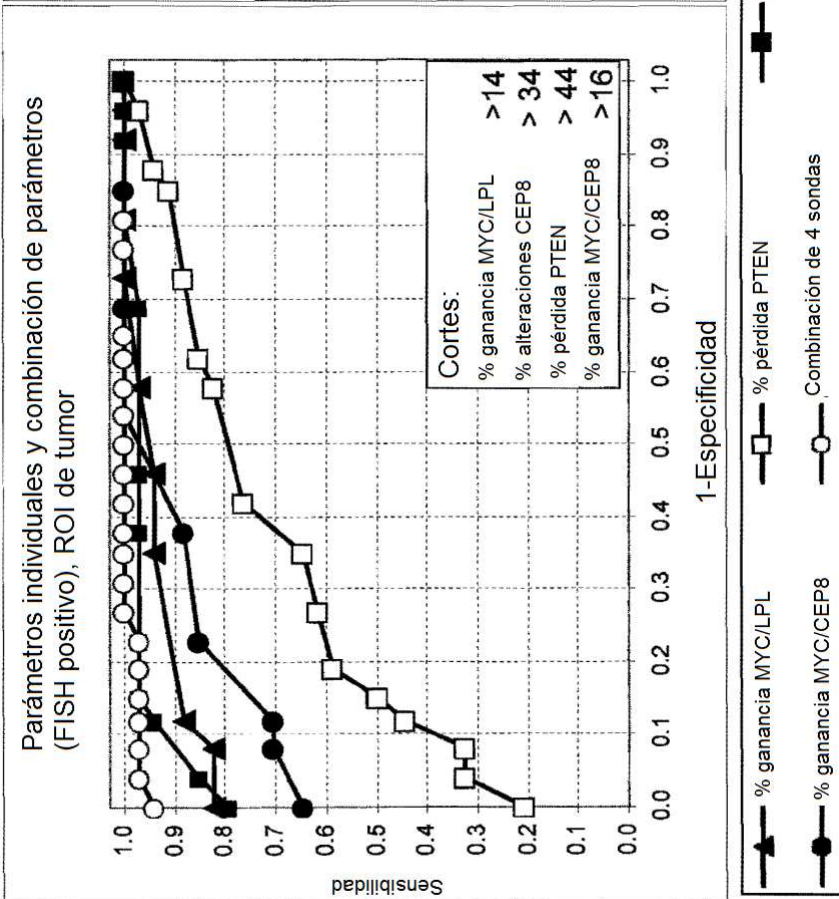
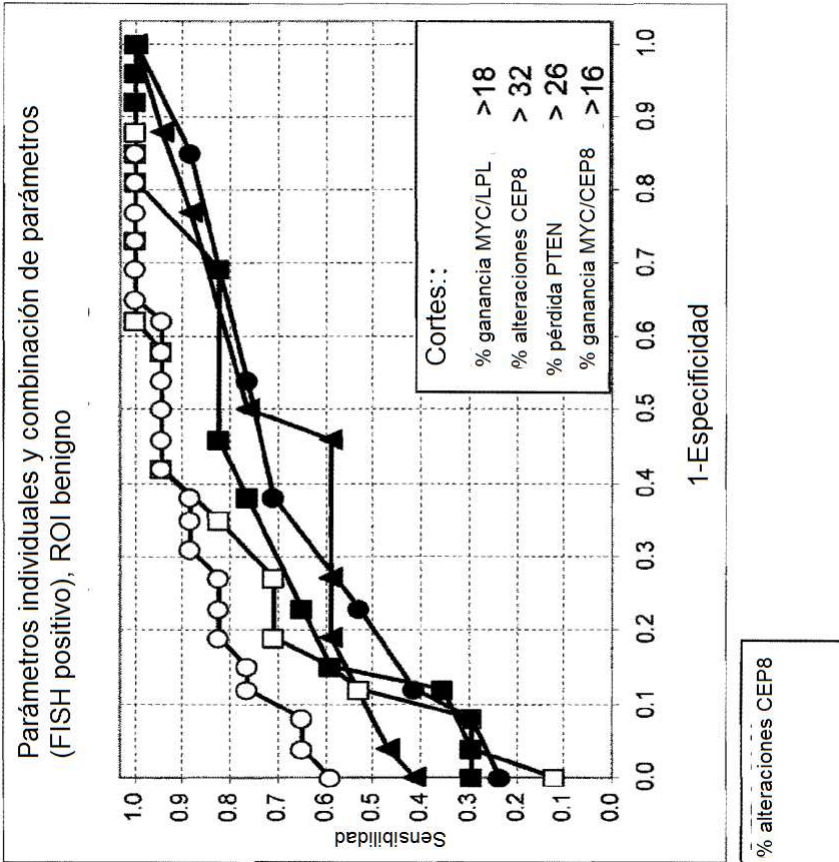


Figura 2b

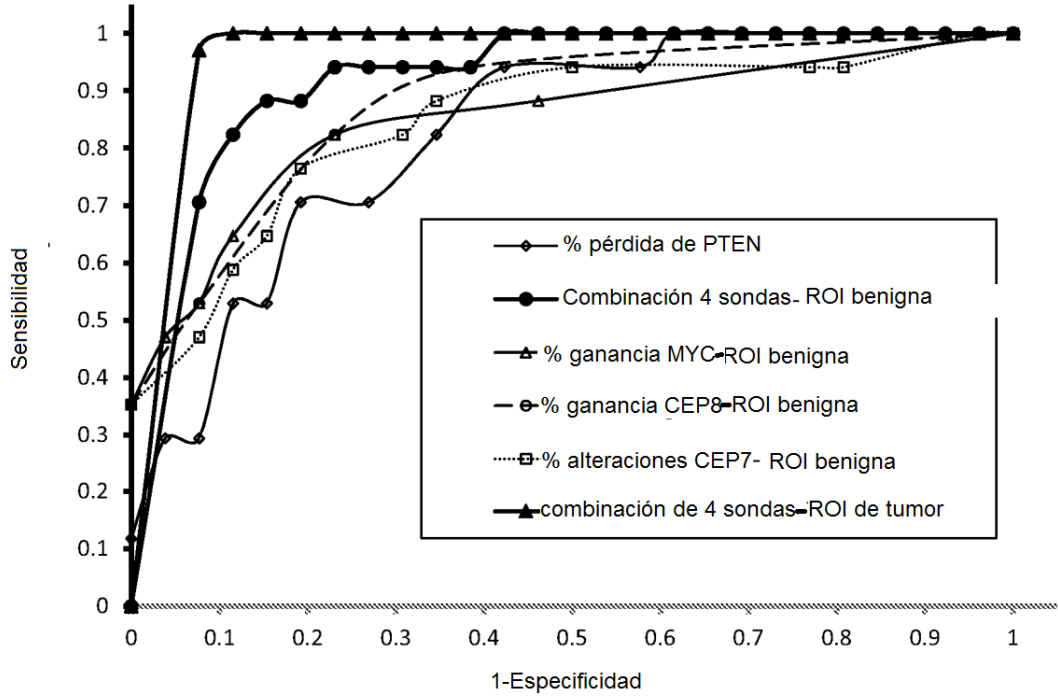


Intervalos de corte para el diagnóstico

Sondas y alteraciones	Parámetro	ROI de tumor			ROI benigna		
		Corte	Especificidad	Sensibilidad	Corte	Especificidad	Sensibilidad
% de ganancia de MYC/LPL	Intervalo superior de corte	22	100	61,8	19	100	35,3
	Corte elegido	14	96,2	79,4	18	80,8	58,8
	Intervalo inferior de corte	12	73,1	85,3	12	73,1	58,8
% de alteraciones de CEP8	Intervalo superior de corte	40	100	64,7	34	100	29,4
	Corte elegido	34	88,5	94,1	32	76,9	64,7
	Intervalo inferior de corte	26	61,6	97,1	25	61,6	76,5
% de pérdida de PTEN	Intervalo superior de corte	54	100	20,6	28	80,8	64,7
	Corte elegido	44	88,8	58,8	26	80,8	70,6
	Intervalo inferior de corte	22	65,4	64,7	22	65,4	82,3
% de ganancia de MYC/CEP8	Intervalo superior de corte	18	100	61,8	18	100	23,5
	Corte elegido	16	88,8	76,5	16	61,5	70,6
	Intervalo inferior de corte	10	61,5	88,2	9	61,5	70,6

Figura 3

Figura 4



Parámetro	AUC
% pérdida de PTEN – ROI benigna	0,827
% alteraciones CEP7 – ROI benigna	0,845
% ganancia MYC – ROI benigna	0,846
% ganancia CEP8 – ROI benigna	0,871
combinación de 4 sondas – ROI benigna	0,917
combinación de 4 sondas-ROI de tumor	0,960



Figura 5

Conjunto de sondas	Combinación de sondas	% de pérdida de PTEN	% de alteraciones de CEP7	% de ganancia de MYC	% de ganancia de CEP8	Sensibilidad	Especificidad
Intervalo superior de corte	% de pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8	33	29	50	34	82,35%	88,46%
Conjunto de sondas 1	% de pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8	33	28	35	34	88,20%	84,60%
Intervalo inferior de corte	% de pérdida de PTEN, % de alteraciones de CEP7, % de ganancia de MYC, % de ganancia de CEP8	29	24	2	32	100%	61,54%