

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 089**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/US2012/026551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12116294**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12749229 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2678446**

54 Título: **Presencia de reordenamientos del gen ERG y sobreexpresión de proteínas en NIP de bajo grado (NIP-BG) en biopsias de próstata**

30 Prioridad:

**24.02.2011 US 201161446300 P**

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

**18.10.2017**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 E. Innovation Park Drive  
Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**PESTANO, GARY;  
NAGLE, RAY;  
SATHYANARAYANA, UBARADKA;  
NAGY, ALEXANDRA, DEA;  
CORTEZ, CONNIE;  
GARSHA, KARL y  
DITAMORE, RYAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 638 089 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

Presencia de reordenamientos del gen ERG y sobreexpresión de proteínas en NIP de bajo grado (NIP-BG) en biopsias de próstata

5

**Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere a procedimientos para la detección en estadio temprano de células de cáncer de próstata en muestras biológicas que previamente han sido detectables como patología de cáncer. Más específicamente, la divulgación se refiere a un ensayo de inmunohistoquímica anti-ERG combinado acoplado con un ensayo FISH de ERG que da lugar a la identificación de NIP de bajo grado que es más probable que esté asociado con y, por lo tanto, sea predictivo de cáncer.

10

**Antecedentes de la invención**

15

La detección temprana del cáncer es la característica clave en el tratamiento de los pacientes con cáncer. En los hombres, el cáncer de próstata es la forma más frecuente de cáncer para todas las razas. Mientras que cada año se diagnostica con cáncer de próstata a más de 300.000 hombres solamente en los EE. UU., las pruebas disponibles actualmente son notoriamente inexactas y subjetivas. Como resultado, muchas incidencias de cáncer de próstata no se diagnostican hasta que la enfermedad ha progresado a estadios tardíos, incluyendo metástasis. Tanto la incidencia de cáncer de próstata como su mortalidad asociada han aumentado en los últimos diez años. Se estima que aproximadamente un 50-65 % del cáncer de próstata está localizado, un 9-17 % se ha diseminado a un área cerca de la próstata y un 20-25 % ha metastatizado a otras partes del cuerpo.

20

25

La detección del cáncer de próstata se realiza principalmente mediante pruebas de PSA (una prueba de sangre para antígeno prostático específico) y DRE (tacto rectal). La confirmación del cáncer se realiza mediante el examen de muestras de tejido derivadas de biopsias con aguja. Estos procedimientos no pueden diferenciar entre enfermedad benigna y cáncer. La falta de diferenciación puede resultar, por ejemplo, en la exposición de pacientes con enfermedad benigna a tratamientos que son innecesarios y tienen efectos secundarios (por ejemplo, impotencia e incontinencia). Es más, se estima que la prueba de PSA no detecta un 20 %-30 % de todas las personas con cáncer. Existe una clara necesidad de pruebas diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad.

30

Zhang *et al.* (Diagn Mol Pathol, 2010; 19: 151-156) describen un ensayo de separación de dos colores de TMPRSS2 usando sondas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) marcadas directamente para determinar la frecuencia y especificidad de las alteraciones genéticas asociadas con TMPRSS2 en muestras fijadas en formol incluidas en parafina de carcinoma prostático, NIP y tejido prostático normal (epitelio) de muestras de prostatectomía radical.

35

Park *et al.* (Neoplasia, 2010; 12(7): 590-598) correlacionaron la expresión de la proteína ERG con la presencia de reordenamientos del gen ERG en tejidos de cáncer de próstata usando un análisis combinado de inmunohistoquímica (IHC) y FISH.

40

Con el aumento de la incidencia de cáncer de próstata y la alta tasa a la que este trastorno metastatiza, hay una necesidad crítica de detección de esta enfermedad en los estadios más tempranos, y de tratamientos que se puedan dirigir a las células de cáncer de próstata potencialmente metastásico. Idealmente, estos tipos de tratamientos tendrían aplicación tanto en estadio temprano, cáncer de próstata confinado, como en el tratamiento de la enfermedad metastásica.

45

La salud masculina es un área que se beneficiaría enormemente si hubiera un procedimiento específico de detección que se pueda usar para detectar la neoplasia intraepitelial prostática de bajo grado (NIP-BG). La NIP-BG es una proliferación premaligna en las células prostáticas, más comúnmente encontrada en la zona periférica. La NIP se identificará en hasta un 16 % de los hombres que han tenido biopsias transrectales de próstata guiadas por ecografía. En la NIP, la disposición celular muestra la conservación de la arquitectura del conducto y de la glándula con interrupción progresiva de la capa de células basales con grados crecientes de NIP, mientras que la invasión del estroma es insuficiente. Otros cambios histológicos o biológicos de los que se ha informado incluyen: pérdida de la diferenciación neuroendocrina y secretora, anomalías nucleares y nucleolares, neovascularidad, aumento del potencial proliferativo e inestabilidad genética con variación del contenido de ADN. Con grados cada vez mayores de NIP, se observa un grado creciente de aberración nuclear junto con una alteración creciente de las células basales. La NIP tiene una capa de células basales intactas o fragmentadas, mientras que el cáncer (CP) carece de una capa de células basales. La inmunotinción específica de células basales para la citoqueratina está presente en la NIP, pero está ausente en áreas del CP.

50

55

60

La NIP se clasifica desde el grado más bajo (grado I) con los menores cambios al grado más alto (grado III) con los cambios más extensos. La mayoría de los documentos médicos clasifican la NIP como de alto o bajo grado. La NIP de alto grado y la NIP de grado III se usan indistintamente. El CP se asocia más con la NIP de alto grado que con la de bajo grado. La NIP parece preceder a la aparición del CP en más de 5 años. Existe una correlación significativa entre un hallazgo de NIP de alto grado y el diagnóstico de cáncer de próstata en biopsias posteriores. La NIP-AG se

65

correlacionó a un diagnóstico posterior de este tipo en un 33-100 % de los casos en varios estudios. En un estudio, la NIP se detectó en un total de 66 hombres: 21 con NIP de bajo grado y 45 con NIP de alto grado. Las biopsias repetidas revelaron CP en 5/21 o un 24 % del grupo de bajo grado y en 26/45 o un 58 % del grupo de alto grado.

- 5 Por lo tanto, los procedimientos de detección de la NIP de bajo grado, que es aún anterior en el ciclo de progresión de la enfermedad en comparación con la NIP de alto grado, que podría dar lugar al desarrollo de cáncer, se podrían usar para la detección en estadio temprana y el pronóstico del cáncer de próstata y dar lugar a mejores regímenes de tratamiento para el cáncer de próstata.
- 10 Joniau *et al.* (European Urology, 2005; 48: 379-385) proporcionan una recapitulación de las estrategias y criterios para la detección temprana del cáncer de próstata. En particular, el documento gira en torno a la neoplasia intraepitelial prostática (NIP). Los autores llegan a la conclusión de que la NIP es considerada como el precursor más probable del cáncer de próstata, y el hallazgo de NIP de alto grado aislada en las biopsias de próstata debe impulsar al médico a tomar medidas, tales como biopsias repetidas o ensayos de quimioprevención. Además, se menciona que la NIP-BG no puede ser ignorada, y esta suposición se hace basada en estudios en los que un 30 %
- 15 de los pacientes tenía cáncer en el grupo de NIP-BG.

### Breve resumen de la invención

20 La invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico en estadio temprano del cáncer de próstata en un sujeto, que comprende determinar la presencia de neoplasia intraepitelial prostática de bajo grado (NIP-BG) en dicho sujeto, que comprende: proporcionar una muestra del sujeto; detectar la presencia o ausencia en la muestra de una fusión génica que tiene una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' de un gen ERG mediante la detección de reordenamientos cromosómicos de ADN

25 genómico usando una técnica de hibridación de ácido nucleico, y detectar la sobreexpresión de la proteína ERG usando un ensayo de inmunohistoquímica en el que la presencia en la muestra tanto de la fusión génica como de una sobreexpresión de ERG es indicativa de NIP de bajo grado en el sujeto que se relaciona con la presencia de cáncer o es pronóstica de cáncer y en el que se ha determinado previamente que dicho sujeto es negativo para cáncer de próstata.

30 En modos de realización preferentes, el gen regulado por andrógeno se puede seleccionar del grupo que incluye TMPRSS2, NDRG1, SLC45A3 y PSA. En otros modos de realización, la detección de la presencia o ausencia de una fusión génica en la muestra comprende la detección de reordenamientos cromosómicos de ADN genómico usando una técnica de hibridación de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en hibridación *in situ* (ISH), micromatriz y técnica de Southern.

35

En ciertos modos de realización, dicha detección comprende detectar transcritos de ARNm quiméricos que tienen una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' de ERG.

40 En los procedimientos de diagnóstico de la invención, la hibridación *in situ* es hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda 5p desarrollada a partir de RP11-95121 y CTD-2506J13 y se localiza en el cromosoma 21q22.3 y una sonda ERG 3p desarrollada a partir de RP11-476D17 y RP11-24A11 y se localiza en el cromosoma 21q22.3.

45

En procedimientos ejemplares, la detección de la sobreexpresión de la proteína ERG comprende detectar una proteína ERG truncada en el extremo amino que resulta de una fusión de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno a un gen ERG. En otros modos de realización, la detección de la sobreexpresión comprende detectar una proteína quimérica que tiene una porción amino-terminal codificada por una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción carboxi-terminal del gen ERG.

50

Los procedimientos de diagnóstico según la invención se pueden llevar a cabo en cualquier muestra que se examine para determinar el cáncer de próstata. Por ejemplo, la muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en tejido, sangre, orina, semen, secreciones prostáticas y células prostáticas.

55 En modos de realización específicos, la fusión génica es la fusión de un gen ARG (incluyendo, pero no limitado a, TMPRSS2) y el gen ERG, y en el que el procedimiento comprende además la etapa de caracterizar las células prostáticas basándose en la presencia o ausencia de una eliminación genómica en la fusión génica. Los reordenamientos de TMPRSS2-ERG son conocidos para los expertos en la técnica. En modos de realización ejemplares, dicho reordenamiento génico es una eliminación de ADN genómico entre el gen TMPRSS2 y el gen ERG en el cromosoma 21. Más en particular, la eliminación incluye la eliminación del exón 1 del gen ERG o incluye la eliminación del exón 3 del gen TMPRSS2. Por ejemplo, la eliminación comprende una eliminación en la que se eliminan entre 2,8 y 2,85 megabases de ADN genómico.

60

65 La eliminación se puede detectar usando un ensayo FISH que usa al menos una sonda marcada fluorescentemente seleccionada del grupo que consiste en RP11-95121, CTD-2506J13, RP11-476D17 y RP11-24A11. En modos de

realización ejemplares, la eliminación es indicativa de cáncer de próstata metastásico en el sujeto.

Los procedimientos de diagnóstico según la invención pueden comprender además la tinción de dichas células prostáticas usando una tinción de hematoxilina y eosina (H y E) para determinar la presencia de células luminales atípicas con tamaño nuclear ampliado sin nucleolos visibles en comparación con las células adyacentes normales. De forma alternativa, o adicionalmente, los procedimientos de diagnóstico pueden comprender además la determinación de la presencia de antígeno prostático específico (PSA) en dichas células prostáticas.

Como se ha indicado, los procedimientos de diagnóstico según la invención proporcionan ventajosamente una identificación temprana del cáncer de próstata cuando otros procedimientos han señalado una muestra negativa para el cáncer de próstata. Por ejemplo, los procedimientos divulgados se llevan a cabo en sujetos que inicialmente han obtenido pruebas negativas para el cáncer de próstata determinadas mediante biopsia con aguja y/o determinadas mediante tinción con H y E.

También se divulga un ensayo de células prostáticas para determinar la presencia de NIP-BG, que comprende: a) obtener una muestra de ensayo de células prostáticas; b) analizar la muestra de células prostáticas para determinar la expresión de ERG usando un ensayo de inmunohistoquímica; c) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa b) con el nivel en una muestra de control; d) realizar un ensayo FISH para determinar la presencia o ausencia en la muestra de una fusión génica que tiene una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' de un gen ERG y e) determinar que dichas células prostáticas desarrollarán cáncer o son indicativas de células cancerosas proximales (o adyacentes) en dicho sujeto si el nivel de expresión de ERG en las células prostáticas en dicha muestra de ensayo es mayor que el de la muestra control y existe la presencia de fusión génica de una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' del gen ERG que se determinó en la etapa e).

#### Breve descripción de varias vistas de los dibujos

Figura 1: NIP de bajo grado en dos casos que muestran (1A) tinción con H y E del CASO 1, y (1B) la sobreexpresión de ERG por IHC en una sección de preparaciones cortadas en serie del CASO 1; (1C) tinción con H y E del CASO 2, y (1D) sobreexpresión de ERG por IHC en una sección de preparaciones cortadas en serie del CASO 2. Nota: La NIP-BG se diagnostica sobre H y E por células luminales atípicas con tamaño nuclear ampliado sin nucleolos visibles en comparación con las células adyacentes normales.

Figura 2: Reordenamientos de ERG en el ensayo de separación de próstata.

Figura 3: NIP de bajo grado adyacente al cáncer de próstata evaluado por H y E e IHC de ERG.

#### Descripción detallada de la invención

Actualmente, la comunidad de anatomía patológica no informa sobre la NIP de bajo grado. El diagnóstico por tinción de H y E no está bien caracterizado y es en gran medida subjetivo, por lo tanto, no queda claro si existe una asociación directa entre NIP-BG y la progresión a adenocarcinoma prostático. La presente divulgación se extiende sobre el hallazgo de que los ordenamientos génicos de ETS están presentes en el cáncer de próstata. Los procedimientos divulgados proporcionan evidencias de reordenamientos génicos de ERG y la sobreexpresión de la proteína ERG asociada en NIP de bajo grado. La presente divulgación muestra que existe la posibilidad de identificar un subconjunto novedoso de NIP de bajo grado que puede tener mayor probabilidad de estar asociado con o progresar a carcinoma prostático. Estos hallazgos pueden ser útiles en la práctica clínica para proporcionar procedimientos de pronóstico del riesgo de un hombre de cáncer de próstata que puede haber no sido detectado en la biopsia con aguja y, por lo tanto, proporcionan una predicción más sensible y precisa de la probabilidad de tener o desarrollar cáncer de próstata.

La práctica actual para evaluar el cáncer de próstata es no informar sobre la NIP de bajo grado. En su lugar, esta categoría de pacientes se somete a un nuevo cribado usando el seguimiento de PSA, DRE repetidos y múltiples biopsias repetidas según sea necesario hasta que se encuentre evidencia definitiva de cáncer. La ventaja de la presente divulgación es que proporciona un procedimiento mejorado para predecir el cáncer en comparación con las biopsias solas, reduciendo de este modo la necesidad de biopsias innecesarias y proporcionando un diagnóstico en estadio temprano del cáncer de próstata.

El descubrimiento de el reordenamiento génico de TMPRSS2:ERG en los cánceres de próstata y su asociación con la progresión de la enfermedad tiene implicaciones tanto terapéuticas como diagnósticas. La identificación de hombres que tienen alto riesgo de progresión de las lesiones de NIP preneoplásicas a carcinoma prostático es una necesidad médica no satisfecha que puede afectar directamente a la práctica de la toma de muestras para biopsia con aguja y el cribado de PSA. Estudios anteriores han identificado la presencia de reordenamientos de ERG en aproximadamente un 15 % de las NIP de alto grado. Además, las lesiones de NIP-AG con ERG reordenado están altamente asociadas con reordenamientos génicos en los focos tumorales adyacentes en las muestras de prostatectomía. En la presente divulgación, un procedimiento de diagnóstico se centra en determinar la presencia

tanto de reordenamientos génicos de ERG como de sobreexpresión de proteínas en NIP-BG como correlativos de cáncer y usa los mismos para identificar a hombres que están en riesgo de desarrollar carcinoma prostático más rápidamente.

5 Para dichos propósitos de diagnóstico, se puede tomar una muestra de tejido prostático de un individuo y evaluar la presencia de las fusiones de ERG y la sobreexpresión de ERG. La muestra de tejido puede excluir la capa unicelular del revestimiento celular del epitelio glandular, o incluir células tanto dentro como fuera de la capa. A modo de ejemplos no limitativos, la muestra puede ser tejido (por ejemplo, una muestra de biopsia de próstata o una muestra de tejido obtenida por prostatectomía), sangre, orina, semen, secreciones prostáticas o una fracción de las mismas (por ejemplo, plasma, suero, sobrenadante de orina, sedimento de células de orina o células prostáticas). Una muestra de orina preferentemente se recoge inmediatamente después de un tacto rectal (DRE) cuidadoso, que provoca que las células prostáticas de la glándula prostática se desprendan en las vías urinarias. En ciertos modos de realización, la muestra de tejido prostático puede ser el resultado de un procedimiento de biopsia. La muestra de tejido prostático puede ser una pluralidad de células contiguas y/o una o más células separadas de la próstata.

15 Los procedimientos de prueba de diagnóstico/pronóstico divulgados también se pueden combinar con pruebas de PSA y/o DRE. Las pruebas para el antígeno prostático específico (PSA) son bien conocidas en la técnica. Como se señaló anteriormente, se estima que el cribado de PSA para detectar el cáncer de próstata no detecta (es decir, falsos negativos) una proporción significativa de los individuos evaluados que realmente tienen cáncer de próstata. Una ventaja de la presente invención es que el procedimiento de cribado para el cáncer de próstata puede detectar cáncer de próstata en un individuo que tiene el cáncer, pero da un resultado negativo en una prueba para PSA. El presente procedimiento se puede usar solo o en combinación con una prueba para PSA.

25 Con fines terapéuticos, es deseable tener la capacidad de determinar si un paciente diagnosticado o que presenta disfunción prostática tiene una enfermedad prostática benigna o cáncer de próstata. La enfermedad benigna de próstata incluye la hiperplasia prostática benigna (HPB). De forma ventajosa, en los procedimientos divulgados la detección de NIP-BG se correlaciona con el cáncer de próstata, permitiendo de ese modo al experto en la técnica distinguirlo de la enfermedad prostática benigna en un paciente diagnosticado o que presente disfunción prostática. La presencia de NIP-BG determinada mediante el ensayo combinado de IHC-FISH de ERG descrito en el presente documento se asocia con cáncer de próstata y, a la inversa, la ausencia de NIP-BG es indicativa de enfermedad prostática benigna. Un paciente diagnosticado o que presenta disfunción prostática se puede haber evaluado en una prueba de PSA, y puede haber dado un resultado negativo. Mediante la combinación de la prueba de PSA con la prueba de IHC-FISH de ERG descrita en el presente documento es posible proporcionar una detección sensible y en estadio temprano del cáncer de próstata.

35 Las fusiones génicas recurrentes indicativas de cáncer de próstata ya se han caracterizado durante varios años. Las fusiones génicas son el resultado de un reordenamiento cromosómico de un gen regulado por andrógeno (ARG) y un gen miembro de la familia ETS, incluyendo, por ejemplo, el protoncogén ERG. A pesar de su recurrencia, la unión en la que ARG se fusiona al gen miembro de la familia ETS varía. Las fusiones génicas comprenden típicamente una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un ARG y una porción 3' de un gen miembro de la familia ETS. Las fusiones génicas recurrentes tienen uso como marcadores de diagnóstico y/o pronóstico y dianas clínicas para el cáncer de próstata.

45 Los ARG están regulados por hormonas androgénicas y son de importancia crítica para la función fisiológica normal de la glándula prostática humana. También contribuyen al desarrollo y progresión del carcinoma prostático. Los ARG reconocidos incluyen, pero no se limitan a: TMPRSS2; PSA; PSMA; KLK2; SNRK; Seladin-1; y FKBP51 (Paoloni-Giacobino *et al.*, Genomics 44: 309 (1997); Velasco *et al.*, Endocrinology 145 (8): 3913 (2004)). En particular, se ha demostrado que TMPRSS2 (NM.sub.-005656) está altamente expresado en el epitelio prostático con respecto a otros tejidos humanos normales (Lin *et al.*, Cancer Research 59: 4180 (1999)). El gen TMPRSS2 está localizado en el cromosoma 21. Este gen se encuentra a 41.750.797-41.801.948 pb del pter (51.151 pb en total; orientación menos de la hebra).

La región reguladora de la transcripción de un ARG puede contener regiones codificantes o no codificantes del ARG, incluyendo la región promotora.

55 La familia ETS de factores de transcripción regula las rutas de señalización intracelular que controlan la expresión génica. Como efectores en dirección 3', activan o reprimen genes diana específicos. Como efectores en dirección 5', son responsables de la expresión espacial y temporal de numerosos receptores del factor de crecimiento. Casi 30 miembros de esta familia se han identificado e implicados en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. Estos incluyen, pero no se limitan a: ERG; ETV1 (ER81); FLU; ETS1; ETS2; ELK1; ETV6 (TEL1); ETV7 (TEL2); GABP.alfa.; ELF1; ETV4 (E1AF; PEA3); ETV5 (ERM); ERF; PEA3/E1AF; PU.1; ESE1/ESX; SAP1 (ELK4); ETV3 (METS); EWS/FLI1; ESE1; ESE2 (ELF5); ESE3; PDEF; NET (ELK3; SAP2); NERF (ELF2); y FEV.

65 La fusión de un ARG a un gen miembro de la familia ETS es detectable como ADN, ARN o proteína. Inicialmente, la fusión génica es detectable como un reordenamiento cromosómico de ADN genómico que tiene una porción 5' de una región reguladora de la transcripción del ARG y una porción 3' del gen miembro de la familia ETS. Una vez

transcrita, la fusión génica es detectable como un ARNm quimérico que tiene una porción 5' de la región reguladora de la transcripción del ARG y una porción 3' del gen miembro de la familia ETS. Una vez traducida, la fusión génica es detectable como una proteína miembro de la familia ETS truncada en el extremo amino resultante de la fusión de la región reguladora de la transcripción del ARG al gen miembro de la familia ETS; una proteína quimérica que tiene una porción amino-terminal de la región reguladora de la transcripción del ARG y una porción carboxi-terminal del gen miembro de la familia ETS; o, una proteína miembro de la familia ETS nativa regulada por incremento, pero por lo demás indistinguible. La proteína miembro de la familia ETS truncada y la proteína quimérica pueden diferir de sus respectivas proteínas nativas en la secuencia de aminoácidos, el procesamiento postraduccional y/o la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Dichas diferencias, si están presentes, se pueden usar para identificar la presencia de la fusión génica. En un modo de realización preferente, se usa FISH para detectar la presencia de la fusión génica.

### Ensayo de inmunohistoquímica de ERG

La evaluación de la expresión de la proteína ERG por IHC se puede lograr usando procedimientos manuales y automatizados. Se hace referencia a los siguientes procedimientos en la publicación fundamental que muestra la correlación entre IHC y FISH de ERG (de Neoplasia, Volumen 12 número 7 de julio de 2010 págs. 590-598). Esta referencia se cita solamente como un ejemplo de la realización de IHC de ERG. Las plataformas automatizadas alternativas y los procedimientos manuales pueden ofrecer resultados similares, pero aún no se han demostrado en la literatura.

Se realizaron análisis inmunohistoquímicos (IHC) en secciones de tejido tumoral fijadas en formol incluidas en parafina usando la plataforma de tinción automatizada DiscoveryXT de Ventana Medical Systems. El anticuerpo monoclonal de conejo primario se obtuvo de una fuente comercial. La recuperación del antígeno se llevó a cabo usando recuperación de calor y el estándar CC1, un tampón Tris/borato/EDTA de alto pH (VMSI, número de catálogo 950-124). Las preparaciones se incubaron con 1:100 del anticuerpo primario contra ERG durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se detectó usando el kit de detección ChromoMap DAB (VMSI, n.º de catálogo 760-159) y UltraMap anti-Rb HRP (VMSI, n.º de catálogo 760-4315). El anticuerpo secundario anti-Rb HRP se aplicó durante 16 minutos a temperatura ambiente. Las preparaciones se sometieron a tinción de contraste con Hematoxilina II (VMSI, n.º de catálogo 790-2208) durante 8 minutos seguido de reactivo Bluing (VMSI, n.º de catálogo 760-2037) durante 4 minutos a 37 °C.

### Ensayo FISH para la detección de fusión de ERG

La evaluación del estado de reordenamiento génico usando FISH con interfase de dos colores se puede realizar usando procedimientos manuales y automatizados. Se hace referencia a los siguientes procedimientos en la publicación fundamental que muestra la correlación entre IHC y FISH de ERG (de Neoplasia, Volumen 12 número 7 de julio de 2010 págs. 590-598). Esta referencia se cita solamente como un ejemplo de realización de FISH de ERG. Las plataformas automatizadas y los procedimientos manuales pueden ofrecer resultados similares. Se usaron secciones de TMA de cuatro micrómetros de grosor para el análisis FISH de interfase. El estado de reordenamiento se determinó usando un ensayo FISH de interfase de separación de dos colores como se describe previamente (Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, *et al.* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310 (5748), 644-648 y Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S, Tchinda J, Tomlins SA, Hofer MD, Pienta KG, *et al.* (2006). TMPRSS2: ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66 (17), 8337-8341).

Además, un ensayo FISH automatizado que usa las sondas de FISH ERG 3p y 5p y los puntos cuánticos 565 y 655 ofrece de forma similar una alta correlación con el ensayo IHC de ERG para la detección de reordenamientos génicos. Se presenta un resumen de los procedimientos que emplean la detección de puntos cuánticos en el gráfico reproducido a continuación:

### 3. Procedimiento FISH de punto cuántico automatizado de separación para ERG 5' y 3'.

Plataforma	BenchMark XT
Eliminación de parafina	Prolongado
Acondicionamiento celular	Prolongado/tampón de reacción
Digestión con proteasa	Proteasa 3, 12 min
Desnaturalización	90 °C, 12 min
Hibridación	44 °C, 8 horas
Lavado riguroso	72 °C, 8 min (3 ciclos)
5p ERG DIG/3p ERG DNP	2 gotas cada uno
Tampón de bloqueo	1 gota, 32 min a temperatura ambiente
Detección	QD 565 y QD 655, 32 min, TA
Tinción de contraste: DAPI	4 min a temperatura ambiente

Cubreobjetos	Cytoseal 60
--------------	-------------

Las sondas que no presentan reordenamiento, es decir, ambos alelos son "normales", permanecerán colocadas y se visualizarán como un par de señales amarillas, o como señales rojas/verdes yuxtapuestas muy cercanamente. Los reordenamientos de ERG ofrecerán una "inserción" de las sondas fluorescentes como se representa en la figura 2. Los eventos de separación se pueden visualizar como resultado de las "inserciones" en la región 5p de ERG, y pueden ir acompañados de "eliminación" de una de las señales 5p ERG (verde), así como duplicación del gen 3p ERP.

### Ejemplos

El objetivo de este estudio fue identificar el grado de reordenamiento de ERG en las lesiones de NIP de la próstata. Los autores de la presente invención desarrollaron un procedimiento de tinción automatizado para detectar la sobreexpresión de ERG mediante inmunohistoquímica (IHC), en combinación con los reordenamientos génicos específicos detectados mediante un ensayo FISH. Con este fin, se detectaron sondas específicas para los reordenamientos génicos de ERG incluyendo ERG 3' y 5' con los bioconjugados de puntos cuánticos (Life Technologies, OR). También se evaluaron los fijadores comúnmente usados en la conservación de las biopsias con aguja, así como los tiempos de fijación. Las señales FISH específicas se deconvolucionaron usando un interferómetro y programa informático de imágenes espectrales.

En la literatura se describen procedimientos específicos para la realización de FISH espectral en tejidos fijados en formol incluidos en parafina con puntos cuánticos. En resumen, se capturaron cubos de imágenes espectrales que contenían información de intensidad de longitud de onda de alta resolución en cada píxel usando un sistema de adquisición y análisis SpectraView (ASI, Applied Spectral Imaging, Israel) modificado. El sistema modificado comprende una estación de trabajo informática, un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61), una luz guía acoplada y una fuente de excitación de haluro metálico estabilizada (Exfo Exacte, Exfo, Ontario, CA, EE. UU.), con una salida espectral desde un cabezal óptico de interferómetro a una Sony ICX285 digital CCD.20-23. Los filtros de excitación/emisión para imágenes espectrales (Semrock, EE. UU.) fueron los siguientes: longitud de onda céntrica de 377 nm con ancho de banda de 50 nm para la excitación; divisor de haz dicróico con banda de reflexión por debajo de 410 nm y un filtro de paso largo con una transición de bloqueo profunda a 409 nm. Todos los cubos de imágenes espectrales se capturaron con un objetivo Plan-Fluor 40X (apertura numérica 0,75) y montura 1Xc. Los datos se recogieron a través de una serie de exposiciones de 100 ms para construir el cubo de imágenes interferométricas para el procesamiento espectral. El intervalo de longitud de onda representado por cubos de imagen capturados en estas condiciones cubrió las longitudes de onda visibles entre 410 y 900 nm a una resolución de toma de muestras de longitud de onda de 10 nm. Se realizó división espectral para separar las señales correspondientes a la autofluorescencia del tejido, DAPI, punto cuántico 565 y punto cuántico 655 usando los espectros de referencia apropiados y los algoritmos de división lineales implementados en el programa informático de análisis espectral de datos SpectraView.

La estrecha distribución de longitud de onda gaussiana distintiva y las ubicaciones de pico discretas de los espectros de emisión QD permitieron la separación fiable de las señales individuales de la sonda. Las capas de intensidad de señal DAPI y FISH monocromáticas individuales se colorearon y se combinaron para proporcionar imágenes de superposición para la visualización de las localizaciones relativas de las sondas.

Los resultados mostraron una detección sensible y específica de los reordenamientos génicos con este procedimiento de prueba en los modelos de xenoinjerto VCaP, H660 y LNCap, así como en muestras de biopsias con aguja de próstata y prostatectomías radicales. En una cohorte de muestras de tejidos de próstata, el IHC de ERG fue diagnóstico de NIP de bajo grado que no se detectó en el examen inicial mediante tinción con H y E (n = 4/10 o 40 % de las muestras de NIP-BG; tabla 1). Significativamente, aunque la asociación de NIP-BG con el cáncer fue relativamente infrecuente (solo en un 10 %, o 6 de 60 muestras se observó que tenían NIP-BG proximal al cáncer); la frecuencia de NIP-BG proximal al cáncer cuando ERG está reordenado es de un 75 % (es decir, 3 de 4 muestras de NIP-BG positivas para ERG fueron proximales al cáncer, solo 1 muestra de NIP-BG positiva a ERG no era inmediatamente proximal al cáncer (tabla 1).

Del mismo modo para NIP-AG, aunque la frecuencia de asociación con el cáncer fue relativamente baja a un 25 % (15 de 60), cuando ERG se expresa en NIP-AG, la proximidad del cáncer es de un 100 % (4 de 4 casos); es decir, todos los casos de NIP-AG positivos a ERG se asociaron con cáncer proximal (tabla 1).

Tabla 1. Aparición de reordenamientos de ERG en muestras de NIP, incluyendo NIP-BG y NIP-AG en una cohorte de muestras de próstata (A) todos los datos para muestras de NIP, cáncer y ausencia de cáncer, y (B) resumen para NIP-BG y (C) coaparición de NIP-AG con cáncer. (A)

	Número de casos	Negativos a ERG	Positivos a ERG
Total de casos *	89	68	21

Total con cáncer	60	40	20
Total de casos sin cáncer (incluye NIP)	29		
Total de coaparición de CA y NIP:	27	19	8
<b>Total de casos con NIP-BG</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>4</b>
Total de casos con NIP-AG	17	13	4
<b>Coaparición de cáncer y NIP-BG</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
Coaparición de cáncer y NIP-AG	15	11	4
Total de casos sin cáncer (incluye NIP)	<b>29</b>		
<b>NIP-BG sin cáncer</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
NIP-AG sin cáncer	2	2	0

\* Un caso tenía NIP-AG, NIP-BG y cáncer

(B) Coaparición de NIP-BG con cáncer

	Porcentaje	n
Frecuencia de NIP-BG en la cohorte	11,24 %	n = 10 de 89
NIP-BG asociado con cáncer	10,00 %	n = 6 de 60
NIP-BG positivo para ERG	40,00 %	2 = 4 de 10
<b>Coaparición de NIP-BG positivo para ERG con cáncer</b>	<b>75,00 %</b>	<b>n = 3 de 4</b>
NIP-BG positivo para ERG sin coaparición de cáncer	25,00 %	n = 1 de 4

5

(C) Coaparición de NIP-AG con cáncer

	Porcentaje	n
Frecuencia de NIP-AG en la cohorte	20,22 %	n = 18 de 89
NIP-AG asociado con cáncer	25,00 %	n = 15 de 60
NIP-AG positivo para ERG	23,53 %	n = 4 de 17
<b>Coaparición de NIP-AG positivo para ERG con cáncer</b>	<b>100,00 %</b>	<b>n = 4 de 4</b>
NIP-AG positivo para ERG sin coaparición de cáncer	0,00 %	n = 0 de 4

10 La sobreexpresión de ERG no se asoció significativamente con ningún tipo específico de reordenamiento génico, incluyendo inserciones o eliminaciones en la región 5' del gen ERG. Los reordenamientos evaluados por prueba FISH de ERG incluyen: sin reordenamiento (normal), translocación a través de inserción y translocación a través de eliminación.

15 La tabla 2 a continuación muestra la sobreexpresión de ERG y el reordenamiento génico en una cohorte seleccionada de muestras de tejido de próstata.

**Tabla 2:**

Diagnóstico	Identificador del caso	H y E	IHC de ERG	FISH de ERG
<b>Normal</b>	PR043	Benigno	-	-
	PR046	Benigno	-	-
	PR057	Benigno	-	-
	PR059	Benigno	-	-
	PR068	Benigno	-	-
<b>Preneoplásico</b>	PR042	NIP-BG	+	+
	PR052	NIP-BG	-	-
	EU003	NIP-AG	-	-

<b>Tumor/ sin reordenamiento</b>	PR003	Gleason 3+3	-	-
	PR004	Gleason 3+3	-	-
	PR013	Gleason 3+3	-	-
	PR024	Gleason 3+3	-	-
	PR037	Gleason 3+3	-	-
	EU018	Gleason 4+3	-	-
	*PR036	Gleason 3+3	+	-
<b>Tumor/ reordenamiento</b>	PR005	Gleason 3+3	+	+
	PR010	Gleason 3+3	+	+
	PR014	Gleason 3+4	+	+
	PR025	Gleason 3+3	+	+
	PR028	Gleason 3+4	+	+
	PR030	Gleason 3+3	+	+
	PR032	Gleason 5+5	++	+
	PR035	Gleason 4+3	+	+
	PR038	Gleason 3+3	+	+
	EU004	Gleason 3+4	+	+
	EU007	Gleason 4+3	+	+
	EU025	Gleason 4+3	+	+
	EU026	Gleason 4+4	+	+
	EU027	Gleason 3+4	+	+
	EU029	Gleason 4+3	+	+

\*Ejemplo de sobreexpresión de ERG y reordenamiento génico discordante

- En resumen, los datos señalan que un ensayo de inmunohistoquímica anti-ERG acoplado con un FISH de puntos cuánticos de ERG proporciona un formato de análisis condicionado sensible y específico que puede tener utilidad, después de la tinción inicial de H y E, en la detección de biomarcadores clínicamente relevantes en lesiones de NIP. La identificación de reordenamientos génicos y la sobreexpresión de proteínas ERG en NIP de bajo grado puede ayudar a definir una nueva clase de enfermedad prostática más agresiva. Este formato de prueba puede ayudar a identificar a los hombres que se deben tener en consideración para un seguimiento más agresivo, por ejemplo, mediante nueva biopsia, detección de PSA activo, DRE y exámenes de resonancia magnética. Los estudios señalan que esta estrategia de prueba proporciona valor pronóstico en la evaluación de la progresión del cáncer de próstata asociada con la incidencia de NIP-BG en las cohortes seleccionadas de cáncer de próstata y de biopsia.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para el diagnóstico en estadio temprano de cáncer de próstata en un sujeto, que comprende determinar la presencia de neoplasia intraepitelial prostática de bajo grado (NIP-BG) en dicho sujeto, que comprende:
  - (a) proporcionar una muestra del sujeto, habiéndose considerado previamente el sujeto negativo para cáncer de próstata;
  - (b) detectar la presencia o ausencia en la muestra de una fusión génica que tiene una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' de un gen ERG mediante la detección de reordenamientos cromosómicos de ADN genómico usando una técnica de hibridación de ácido nucleico, y
  - (c) detectar el nivel de expresión de proteína ERG usando un ensayo de inmunohistoquímica en el que la presencia en la muestra tanto de la fusión génica detectada en la etapa (b) como de la sobreexpresión de ERG detectada en la etapa (c) es indicativa de NIP de bajo grado en el sujeto.
  
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de células prostáticas, y en el que en la etapa (b) se realiza un ensayo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), comprendiendo además el procedimiento:
  - (d) comparar el nivel de expresión de la proteína ERG detectada en la etapa (c) con el nivel de expresión de la proteína ERG en una muestra de control, y
  - (e) determinar que dichas células prostáticas se volverán cancerosas o son indicativas de células cancerosas adyacentes al sitio de la muestra en dicho sujeto si el nivel de expresión de ERG en las células prostáticas en dicha muestra de ensayo es mayor que el de la muestra de control y hay una presencia de fusión génica de una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' del gen ERG determinada en la etapa (b).
  
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el gen regulado por andrógeno se puede seleccionar del grupo que incluye TMPRSS2, NDRG1, SLC45A3 y PSA.
  
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende detectar reordenamientos cromosómicos de ADN genómico usando una técnica de hibridación de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en hibridación *in situ*, micromatriz y técnica de Southern, o en el que la etapa (b) comprende detectar transcritos de ARNm quiméricos que tienen una porción 5' de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción 3' de ERG.
  
5. El procedimiento de la reivindicación 2 o 4, en el que dicha hibridación *in situ* es hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando una sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda 5p desarrollada a partir de RP11-95121 y CTD-2506J13 y se localiza en el cromosoma 21q22.3 y una sonda ERG 3p desarrollada a partir de RP11-476D17 y RP11-24A11 y se localiza en el cromosoma 21q22.3.
  
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende detectar una proteína ERG truncada en el extremo amino resultante de una fusión de una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno a un gen ERG, o en el que la etapa (c) comprende detectar una proteína quimérica que tiene una porción amino-terminal codificada por una región reguladora de la transcripción de un gen regulado por andrógeno y una porción carboxi-terminal del gen ERG.
  
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fusión génica es una fusión de un gen regulado por andrógeno y el gen ERG, y en el que el procedimiento comprende además la etapa de caracterizar las células prostáticas basándose en la presencia o ausencia de una eliminación genómica en la fusión génica.
  
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha eliminación genómica es una eliminación de ADN genómico entre el gen TMPRSS2 y el gen ERG en el cromosoma 21.
  
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha eliminación incluye la eliminación del exón 1 del gen ERG, o en el que dicha eliminación incluye la eliminación del exón 3 del gen TMPRSS2.
  
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha eliminación es una eliminación de entre 2,8 y 2,85 megabases de ADN genómico.
  
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha eliminación se detecta usando un ensayo FISH usando al menos una sonda marcada fluorescentemente seleccionada del grupo que consiste en RP11-95121, CTD-2506J13, RP11-476D17 y RP11-24A11.
  
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la presencia de la eliminación es indicativa de cáncer de próstata metastásico en el sujeto.

13. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además teñir las células prostáticas de dicha muestra usando tinción de hematoxilina y eosina para determinar la presencia de células lumbinales atípicas con tamaño nuclear ampliado sin nucleolos visibles en comparación con las células adyacentes normales.
- 5
14. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además determinar la presencia de antígeno prostático específico (PSA) en las células prostáticas de dicha muestra.
- 10
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es negativo para cáncer de próstata que se determina por biopsia con aguja.

Figura 1A

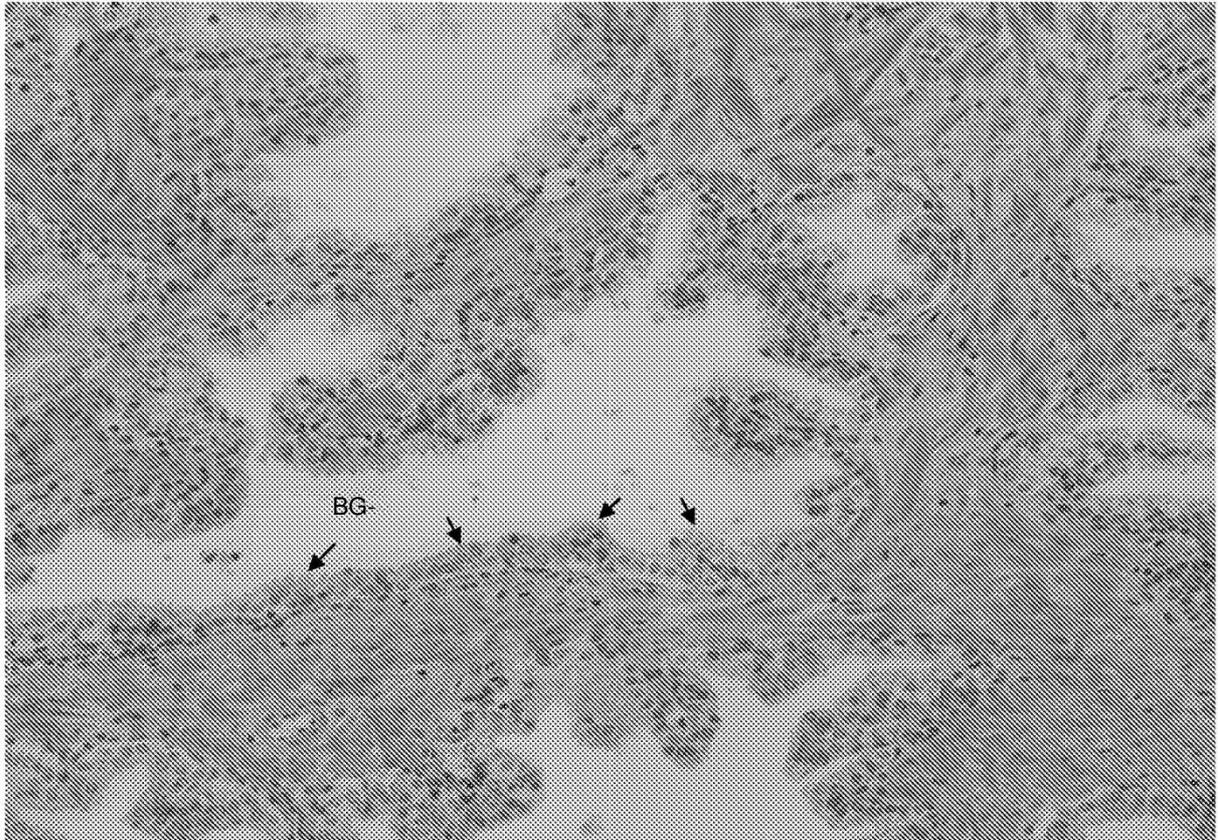


Figura 1B

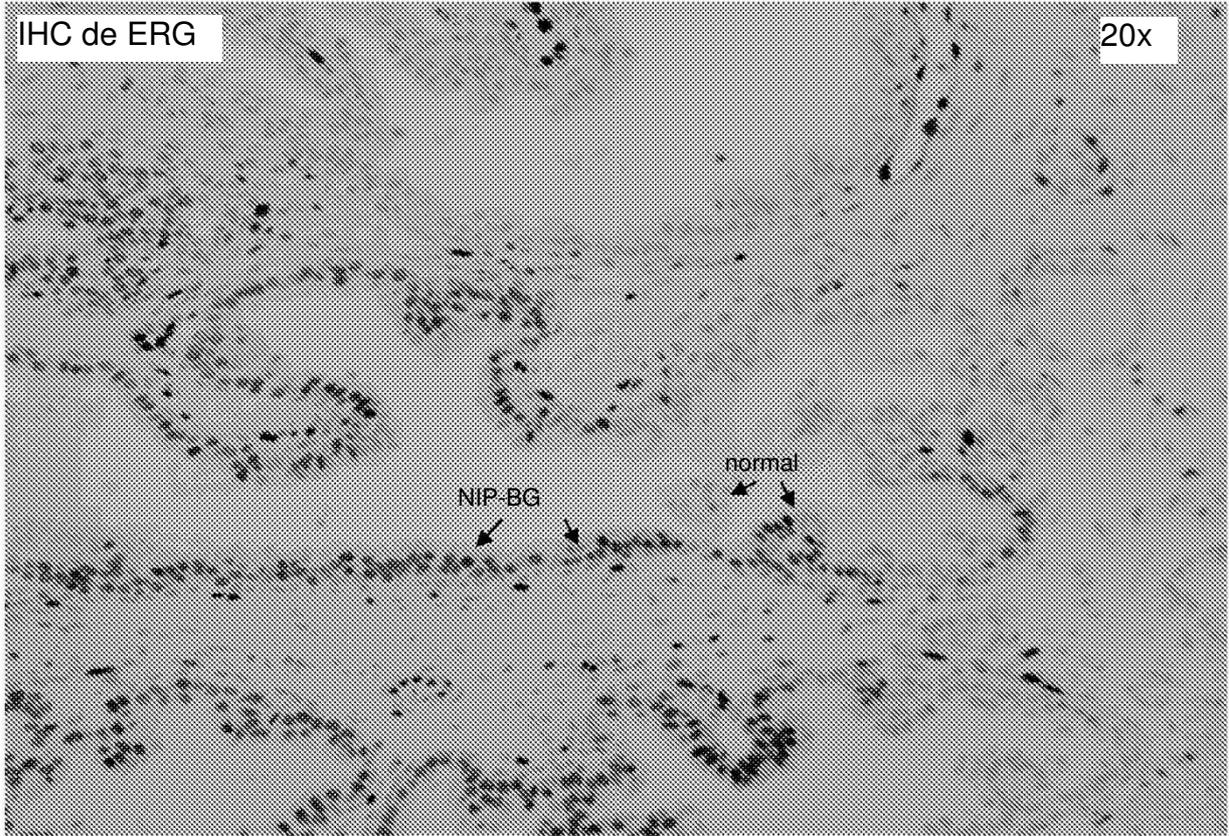


Figura 1C

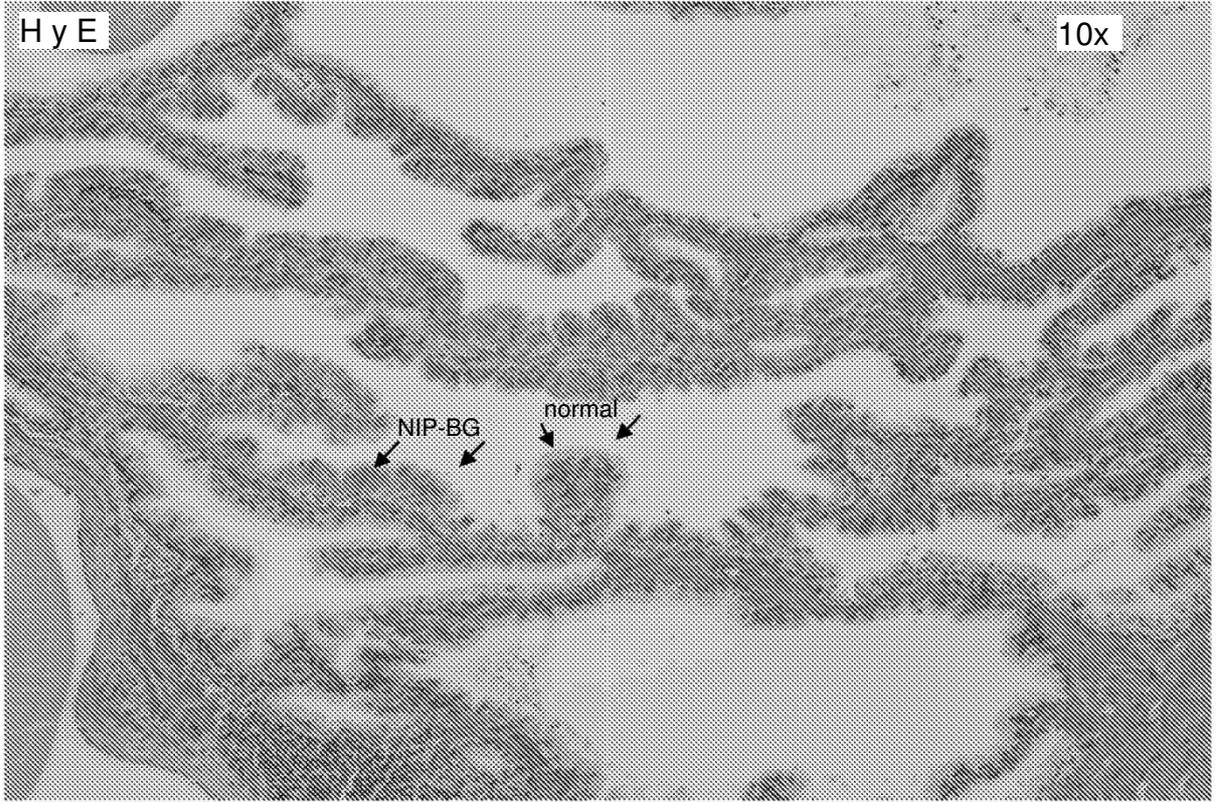


Figura 1D

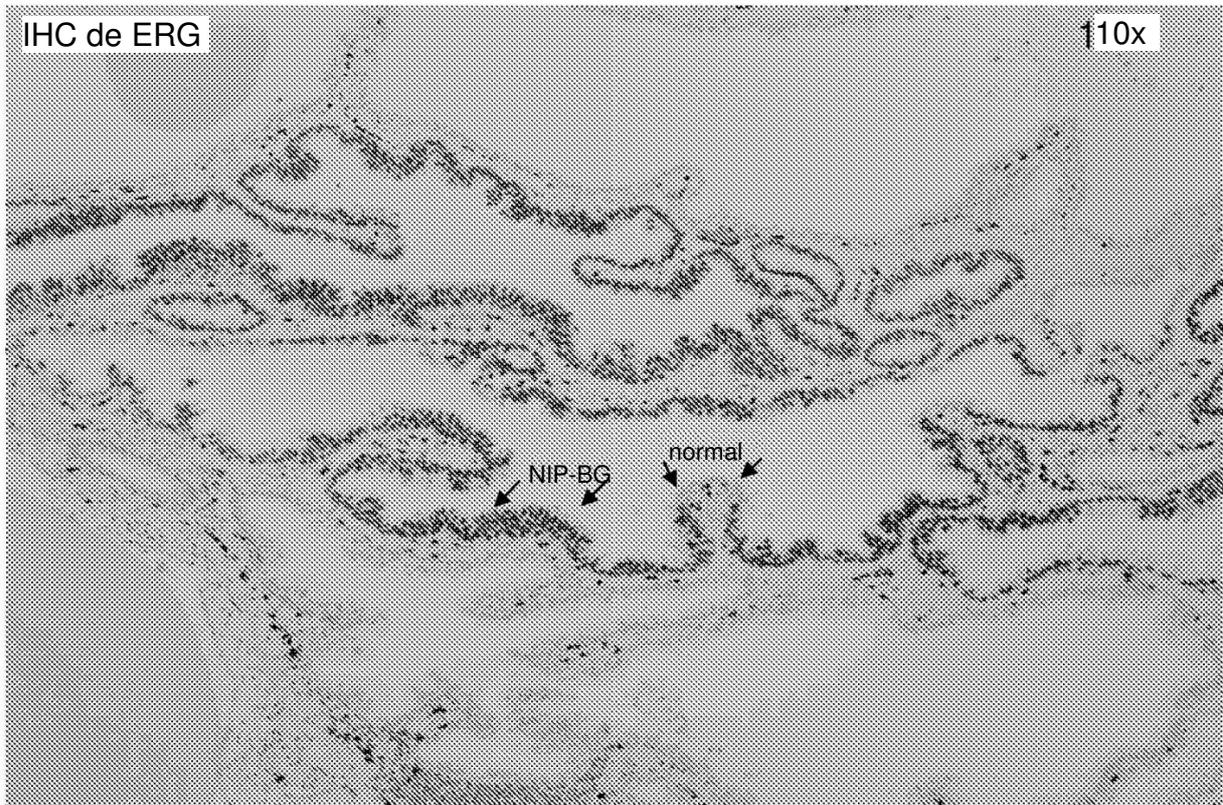
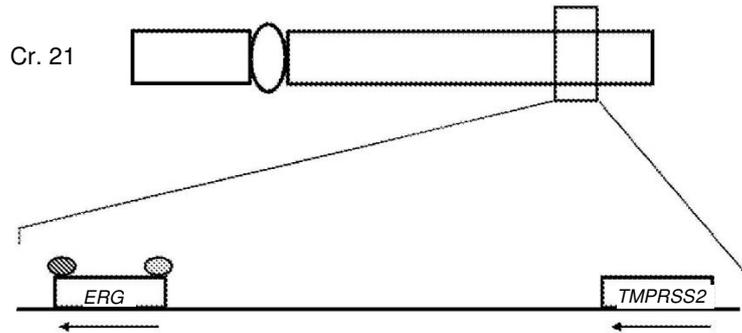


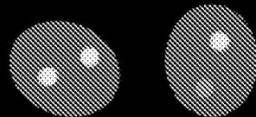
Figura 2.

## Ensayo de separación: Reordenamientos de *ERG* en cáncer de próstata

VENTANA  
a member of the Roche Group

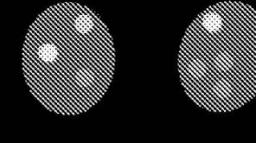


Normal



eliminación de 5p ERP

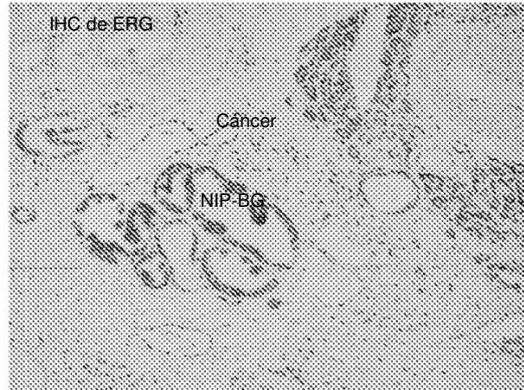
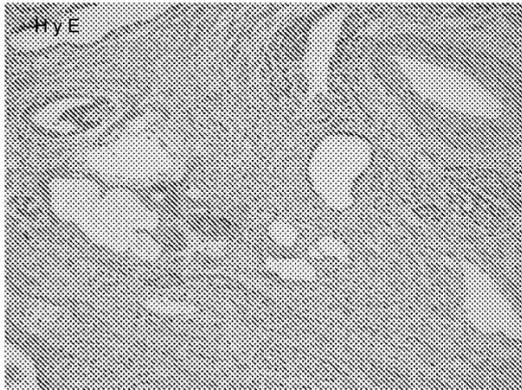
Inserción



eliminación de 5p ERG y  
duplicación de 3p ERG

Figura 3. NIP de bajo grado adyacente a cáncer de próstata evaluado por (A) H y E e IHC de ERG. (B) Vista de cerca de IHC de ERG en NIP-BG y cáncer adyacente.

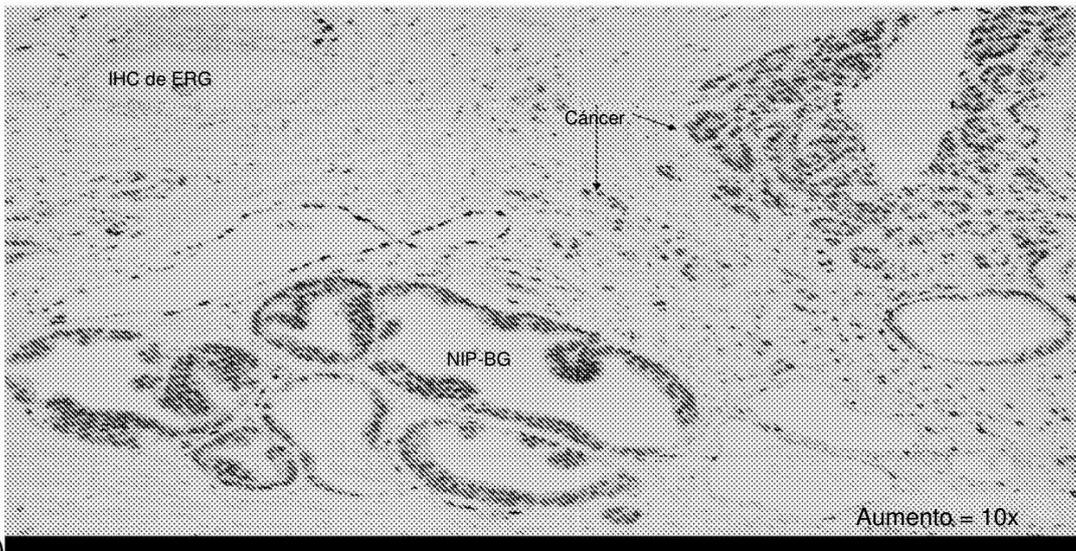
**NIP de bajo grado adyacente a cáncer de próstata  
evaluado por H y E e IHC de ERG**



Aumento = 10x

(A)

**NIP de bajo grado adyacente a cáncer de próstata  
evaluado por IHC de ERG**



Aumento = 10x

(B)