

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 121**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G06F 19/12 (2011.01)

G16H 50/20 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2013 PCT/EP2013/070576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053564**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2013 E 13771159 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2904397**

54 Título: **Medios y procedimientos de diagnóstico de la reaparición de cáncer de próstata después de prostatectomía**

30 Prioridad:

02.10.2012 EP 12187029

02.10.2012 US 201261708686 P

02.07.2013 EP 13174777

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2018

73 Titular/es:

METANOMICS HEALTH GMBH (50.0%)

Tegeler Weg 33

10589 Berlin, DE y

CHARITE - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

(50.0%)

72 Inventor/es:

RESZKA, REGINA;

KAMLAGE, BEATE;

BETHAN, BIANCA;

JUNG, KLAUS;

LEIN, MICHAEL;

KRISTIANSEN, GLEN y

STEPHAN, CARSTEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 121 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

Medios y procedimientos de diagnóstico de la reaparición de cáncer de próstata después de prostatectomía

La presente invención se refiere a medios y procedimientos para el diagnóstico de cáncer y, en particular, diagnóstico de cáncer de próstata. Específicamente, se refiere a un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 2 en una muestra de prueba de un sujeto después de prostatectomía, y comparar la cantidad determinada con una referencia, por el cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de la prostatectomía. Procedimientos adicionales proporcionados según la presente invención se refieren a diferenciar entre un tejido maligno de carcinoma de próstata y un tejido no maligno y diagnosticar carcinoma de próstata metastatizante en un sujeto. También se proporcionan dispositivos para llevar a cabo los procedimientos anteriormente mencionados.

El cáncer de próstata (CP) es un crecimiento incontrolado (maligno) de células en la próstata y el tumor maligno más común en los países industrializados. La causa del cáncer de próstata no se entiende completamente actualmente. En 2008 se diagnosticados en los EE.UU. más de 180.000 nuevos casos de pacientes con CP. La prevalencia esperada para los EE.UU. será 2.175.699 pacientes con cáncer de próstata en 2010. Hay varias pruebas usadas para diagnosticar cáncer de próstata que incluyen tacto rectal (DRE), ultrasonido transrectal (TRUS), antígeno prostático específico (PSA) libre y total, derivados de PSA como el porcentaje de PSA libre (% de PSAI), valores de PSA específicos de la edad, densidad de PSA, velocidad de PSA, prueba de fosfatasa ácida prostática (PAP), biopsia de próstata, tomografía computerizada (TAC), gammagrafía ósea y/o IRM.

La prueba en plasma del antígeno prostático específico (PSA) ha sido un factor importante en aumentar la percepción y el mejor tratamiento de CP de los pacientes, pero su ausencia de especificidad limita su uso en el diagnóstico y lo hace adecuado para la detección precoz de CP. El PSA es específico de órgano, pero no de cáncer. Esto conduce a un alto número de resultados positivos falsos. El diagnóstico de CP se puede confirmar solo por una biopsia. Se hicieron cada año en los EE.UU. más de 800.000 de este procedimiento invasivo y caro, aunque sigue existiendo controversia sobre el cribado de CP (Wilson 2004, Clin. Prostate Cancer 3: 21-25, Crawford 2005, Lancet 365: 1447-1449). La detección precoz de CP es probable (Schröder 2009; N Engl J Med. Mar 26;360(13):1320-1328; Andriole 2009, N Engl J Med Mar 26;360(13):1310-1319

Es actualmente un objetivo el uso de metabolómica para generar biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de cáncer y su evaluación terapéutica (Spratlin 2009, Clin Cancer Res 15(2): 431-440). Otros habían publicado concentraciones absolutas de los metabolitos citrato, mioinositol y espermina en secreciones prostáticas expresadas (EPS) humanas como marcadores de CP independientes de la edad (Serkova 2008, The Prostate 68: 620-628). Recientemente, se ensayaron perfiles metabolómicos de muestras de plasma tisular y de orina posterior al tacto rectal de pacientes con CP positivo por biopsia e individuos de control negativos por biopsia (Sreekumar 2009, Nature 457(12): 910-914). Se sugirió la sarcosina como un posible biomarcador para la progresión de cáncer de próstata. El perfilado de metabolitos reveló además metabolitos para el diagnóstico y la estadificación de cáncer de próstata (documento WO2010/139711 A1).

Sin embargo, todavía se desean sumamente biomarcadores metabólicos que proporcionen información de diagnóstico diferencial o adicional. Por ejemplo, la salud y el tratamiento terapéutico de pacientes se beneficiarían de la identificación de pacientes que están en riesgo de desarrollar cáncer de próstata recurrente después de prostatectomía. Además, la identificación de cánceres de próstata metastatizantes también sería beneficiosa para el cuidado clínico de los pacientes. Finalmente, en vista del alto número de diagnósticos positivos falsos o negativos falsos de carcinoma de próstata, todavía existe una alta necesidad de biomarcadores que permitan un diagnóstico o pronóstico fiable y eficiente de carcinoma de próstata.

El problema técnico que subyace a la presente invención se puede observar como la provisión de medios y procedimientos para cumplir las necesidades anteriormente mencionadas. El problema técnico se resuelve por las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y en el presente documento más adelante.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

- (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 2 en una muestra de prueba de un sujeto después de prostatectomía; y
- (b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por el cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

El procedimiento anteriormente mencionado y los otros procedimientos referidos en el presente documento pueden comprender etapas, además de las explícitamente mencionadas. Dichas etapas pueden ser etapas de pretratamiento de muestras o evaluación de datos, como también se especifica en cualquier parte en el presente documento con detalle. Además, los procedimientos se pueden ayudar por automatización. Por ejemplo, la determinación de la cantidad referida en la etapa a) se puede llevar a cabo por un dispositivo detector que se suministra con las muestras por un dispositivo robótico adecuado. La comparación se puede llevar a cabo por un

algoritmo adecuado implementado en un procesador de datos tal como un ordenador y así se podría llevar a cabo en un modo implementado por ordenador.

El término "diagnosticar", como se usa en el presente documento, se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad o afección o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección. Por consiguiente, el procedimiento proporciona una ayuda para el diagnóstico, puesto que podría ser necesario reforzar o confirmar adicionalmente dicho diagnóstico por, por ejemplo, un profesional médico. En particular, como se entenderá por aquellos expertos en la técnica, dicha evaluación, aunque se prefiere, normalmente puede no ser correcta para el 100 % de los sujetos que se diagnostican. El término, sin embargo, requiere que se pueda identificar una porción estadísticamente significativa de sujetos que padecen la enfermedad o que tienen una predisposición para la misma. Si una porción es estadísticamente significativa o no se puede determinar sin más por el experto en la técnica usando diversas herramientas de evaluación estadística muy conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores de p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York 1983. Intervalos de confianza preferidos son al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %. Los valores de p son, preferentemente, 0,2, 0,1, 0,05. Se entenderá, además, que los procedimientos de la presente invención proporcionan esencialmente una ayuda para el diagnóstico y se pueden incluir en o complementar otras medidas de diagnóstico. El diagnóstico según la presente invención incluye la monitorización, confirmación y clasificación de la enfermedad relevante o sus síntomas. La monitorización se refiere a hacer un seguimiento de una enfermedad ya diagnosticada, o una complicación, por ejemplo para analizar la progresión o regresión de la enfermedad, la influencia de un tratamiento particular sobre la progresión de la enfermedad o complicaciones que surgen durante el periodo de enfermedad o después del tratamiento satisfactorio de la enfermedad. La confirmación se refiere al refuerzo o confirmación de un diagnóstico ya realizado usando otros indicadores o marcadores. La clasificación se refiere a asignar el diagnóstico según la intensidad o tipo de síntomas en diferentes clases, por ejemplo los estadios para carcinomas de próstata como se exponen en cualquier parte en la descripción. El estar en riesgo como se usa en el presente documento significa que un sujeto todavía no ha desarrollado la enfermedad o afección pero, sin embargo, la desarrollará en el futuro con una cierta probabilidad. Dicha probabilidad debe diferenciarse significativamente de la probabilidad de aparición estadística de la enfermedad o afección. Preferentemente, la probabilidad de desarrollar un carcinoma de próstata es al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de una predisposición diagnosticada. El diagnóstico de una predisposición se puede denominar algunas veces la predicción de la probabilidad de que un sujeto desarrollará la enfermedad.

El término "carcinoma de próstata", como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor maligno desarrollado a partir de células de la próstata. Dichas células puede metastatizar desde la próstata hasta otros tejidos u órganos, especialmente hasta los huesos y ganglios linfáticos. Los carcinomas de próstata tempranos normalmente no causan síntomas. Los carcinomas de próstata en estadios avanzados pueden causar dolor, dificultad para orinar, problemas durante las relaciones sexuales y disfunción eréctil. Se conocen en la técnica síntomas adicionales de los carcinomas de próstata, que incluyen polaquiuria, aumento de la micción por la noche, dificultad para empezar y mantener un corriente de orina constante, sangre en la orina y dolor al orinar y se describen en los libros de textos estándares de medicina, tales como Stedman o Pschyrembl. Se usa el sistema de puntuación de Gleason para clasificar los tumores de próstata de 2 a 10, por el cual una puntuación de Gleason de 10 indica la mayoría de las anomalías.

El término "al menos un metabolito", como se usa en el presente documento, se refiere a un único metabolito o a una pluralidad de metabolitos, es decir, preferentemente al menos 2, 3, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 o 10.000 metabolitos. Se debe entender que "metabolito", como se usa en el presente documento, puede ser al menos una molécula de dicho metabolito hasta una pluralidad de moléculas del metabolito y que una pluralidad de metabolitos significa una pluralidad de moléculas químicamente diferentes en las que para cada metabolito puede estar presente al menos una molécula hasta una pluralidad de moléculas. Un metabolito según la presente invención engloba todas las clases de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos, que incluyen los que están comprendidos por material biológico tal como organismos. Preferentemente, el metabolito según la presente invención es un compuesto de molécula pequeña. Más preferentemente, en caso de que se prevea una pluralidad de metabolitos, dicha pluralidad de metabolitos representa un metaboloma, es decir, el conjunto de metabolitos que está comprendido por un organismo, un órgano, un tejido o una célula en un momento específico y en condiciones específicas. Cada uno de los metabolitos de las tablas de más adelante es un biomarcador adecuado por sí mismo para las enfermedades referidas en el presente documento. Sin embargo, más preferentemente, se va a determinar un grupo de biomarcadores por el procedimiento de la presente invención. Un grupo de biomarcadores comprende o consiste, preferentemente, en al menos dos, al menos tres, al menos cuatro y, preferentemente, hasta todos los biomarcadores anteriormente mencionados.

Como al menos un metabolito que se va a determinar como un biomarcador según la presente invención se prefiere particularmente el ácido aminoacético, ácido glucónico, o maltotriosa. Además, como al menos un metabolito que se va a determinar como un biomarcador según la presente invención también es preferible el ácido tricosanoico, glicerofosfoetanolamina y ácido cerebrónico (véase la Figura 2).

Los metabolitos son compuestos de molécula pequeña, tales como sustratos para enzimas de las vías metabólicas,

productos intermedios de tales vías o los productos obtenidos por una vía metabólica. Se conocen bien en la técnica las vías metabólicas y pueden variar entre especies. Preferentemente, dichas vías incluyen al menos ciclo de ácido cítrico, cadena respiratoria, fotosíntesis, fotorrespiración, glicólisis, gluconeogénesis, vía de monofosfato de hexosa, vía oxidativa de fosfato de pentosa, producción y β -oxidación de ácidos grasos, ciclo de la urea, vías de biosíntesis de aminoácidos, vías de degradación de proteínas tales como degradación del proteasoma, vías de degradación de aminoácidos, biosíntesis o degradación de: lípidos, policétidos (incluyendo, por ejemplo, flavonoides e iso-flavonoides), isoprenoides (incluyendo, por ejemplo, terpenos, esteroides, carotenoides, xantófilas), hidratos de carbono, fenilpropanoides y derivados, alcaloides, bencenoides, indoles, compuestos de indol-azufre, porfirinas, antocianos, hormonas, vitaminas, cofactores tales como grupos prostéticos o portadores de electrones, lignina, glucosinolatos, purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótidos y moléculas relacionadas tales como ARNt, microARN (miARN) o ARNm. Por consiguiente, los metabolitos de compuestos de molécula pequeña se componen preferentemente de las siguientes clases de compuestos: alcoholes, alcanos, alquenos, alquinos, compuestos aromáticos, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas, iminas, amidas, cianuros, aminoácidos, péptidos, tioles, tioésteres, ésteres de fosfato, ésteres de sulfato, sulfóxidos, éteres, o combinaciones o derivados de los compuestos anteriormente mencionados. Las moléculas pequeñas entre los metabolitos pueden ser metabolitos primarios que se requieren para la función celular normal, función de órganos o crecimiento animal, desarrollo o salud. Además, los metabolitos de molécula pequeña comprenden además metabolitos secundarios que tienen función ecológica esencial, por ejemplo, metabolitos que permiten que un organismo se adapte a su entorno. Además, los metabolitos no se limitan a dichos metabolitos primarios y secundarios y engloban además compuestos de molécula pequeña artificiales. Dichos compuestos de molécula pequeña artificiales derivan de moléculas pequeñas exógenamente proporcionadas que se administran o se absorben por un organismo, pero no son metabolitos primarios o secundarios como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, los compuestos de molécula pequeña artificiales pueden ser productos metabólicos obtenidos de fármacos por vías metabólicas del animal. Además, los metabolitos incluyen además péptidos, oligopéptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos, tales como ARN o ADN. Más preferentemente, un metabolito tiene un peso molecular de 50 Da (dáltones) a 30.000 Da, más preferentemente inferior a 30.000 Da, inferior a 20.000 Da, inferior a 15.000 Da, inferior a 10.000 Da, inferior a 8.000 Da, inferior a 7.000 Da, inferior a 6.000 Da, inferior a 5.000 Da, inferior a 4.000 Da, inferior a 3.000 Da, inferior a 2.000 Da, inferior a 1.000 Da, inferior a 500 Da, inferior a 300 Da, inferior a 200 Da, inferior a 100 Da. Preferentemente, un metabolito tiene, sin embargo, un peso molecular de al menos 50 Da. Más preferentemente, un metabolito según la presente invención tiene un peso molecular de 50 Da hasta 1.500 Da.

Se entenderá que además de los metabolitos o grupos de metabolitos anteriormente mencionados, también se puede determinar un biomarcador adicional o un grupo de biomarcadores adicionales por el procedimiento de la presente invención. Dichos biomarcadores adicionales incluyen ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos u otros parámetros clínicos que se conoce que se asocian con carcinomas de próstata o predisposición para el mismo. Preferentemente, dicho biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en: tacto rectal (DRE), ultrasonido transrectal (TRUS), pruebas de PSA y PAP, antígeno específico de próstata (PSA), PSA libre y total (también conocido como PSA II), PSA específico de la edad, prueba de fosfatasa ácida prostática (PAP), biopsia tumoral, tomografía computerizada (TAC), gammagrafía ósea e IRM.

Los metabolitos complementarios referidos antes también se compararán, preferentemente, con resultados de referencia adecuados como se especifica en cualquier parte en el presente documento. El resultado de dicha comparación será más complementaria para el resultado en cuanto a si el sujeto padecerá carcinomas de próstata o no o tendrá una predisposición para los mismos o no. Resultados de referencia preferidos, valores de cambios de las cantidades relativas e indicaciones del tipo de regulación se van a encontrar en los ejemplos adjuntos, más adelante.

El término "muestra de prueba", como se usa en el presente documento, se refiere a muestras que se van a usar para el diagnóstico de carcinomas de próstata o una predisposición para los mismos por el procedimiento de la presente invención. Dicha muestra de prueba es una muestra biológica. Las muestras de fuentes biológicas (es decir, muestras biológicas) normalmente comprenden una pluralidad de metabolitos. Las muestras biológicas preferidas que se van a usar en el procedimiento de la presente invención son muestras de líquidos corporales, preferentemente, sangre, plasma, suero, linfa u orina, o muestras derivadas, por ejemplo, por biopsia, de células, tejidos u órganos, preferentemente tejido de próstata sospechoso de incluir o esencialmente consistir en células de carcinoma de próstata. Éstas también engloban muestras que comprenden compartimentos subcelulares u orgánulos, tales como las mitocondrias, red de Golgi o peroxisomas. Las muestras biológicas pueden derivar de un sujeto como se especifica en cualquier parte en el presente documento. Se conocen muy bien en la técnica las técnicas para obtener los diferentes tipos de muestras biológicas anteriormente mencionadas. Por ejemplo, se pueden obtener muestras de sangre sacando sangre, mientras que las muestras de tejido u órgano se tienen que obtener, por ejemplo, por biopsia.

Las muestras anteriormente mencionadas se pretratan, preferentemente, antes de usarse para el procedimiento de la presente invención. Como se describe con más detalle más adelante, dicho pretratamiento puede incluir tratamientos requeridos para liberar o separar los compuestos o para eliminar material o residuo excesivo. Técnicas adecuadas comprenden centrifugación, extracción, fraccionamiento, purificación y/o enriquecimiento de los compuestos. Además, se llevan a cabo otros pretratamientos con el fin de proporcionar los compuestos en una forma o concentración adecuada para el análisis de compuestos. En particular, las muestras se pueden pretratar por

agentes de anticoagulación tales como tampones EDTA, heparinato de amonio o litio, ácido-citrato-dextrosa (ACD), oxalato o citrato si la muestra es una muestra de plasma sanguíneo, o con activadores de la coagulación si la muestra es una muestra de suero. Las muestras de tejido se pueden pretratar por incorporación en parafina, o por agentes de fijación o medidas tales como nitrógeno líquido, liofilización o soluciones de formaldehído. Además, por ejemplo, si se usa espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases en el procedimiento de la presente invención, se requerirá derivatizar los compuestos antes de dicha cromatografía de gases. Pretratamientos adecuados y necesarios dependen de los medios usados para llevar a cabo el procedimiento de la invención y se conocen bien por el experto en la materia. Las muestras pretratadas como se describen antes también están comprendidas por el término "muestra" como se usa según la presente invención.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a animales, preferentemente a mamíferos tales como ratones, ratas, ovejas, perros, gatos, caballos, monos o vacas y, también, preferentemente, a seres humanos. Se debe entender que el sujeto que se va a probar comprende tejido de próstata. Así, el sujeto debe ser un sujeto masculino, un particular un varón. Otros animales que se puede diagnosticar aplicando el procedimiento de la presente invención son aves o reptiles. Preferentemente, el sujeto se somete a prostatectomía antes de llevar a cabo el procedimiento anteriormente mencionado de la invención. Después de la prostatectomía, el sujeto no debe mostrar, preferentemente, síntomas o signos clínicos indicativos de carcinomas de próstata.

El término "determinar dicho al menos un metabolito", como se usa en el presente documento, se refiere a determinar al menos un rasgo característico del al menos un metabolito comprendido por la muestra referida en el presente documento. Los rasgos característicos según la presente invención son características que caracterizan las propiedades físicas y/o químicas que incluyen propiedades bioquímicas de un metabolito. Tales propiedades incluyen, por ejemplo, peso molecular, viscosidad, densidad, carga eléctrica, espín, actividad óptica, color, fluorescencia, quimioluminiscencia, composición elemental, estructura química, capacidad para reaccionar con otros compuestos, capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador) y similares. Los valores para dichas propiedades pueden servir de rasgos característicos y se pueden determinar por técnicas muy conocidas en la técnica. Además, el rasgo característico puede ser cualquier característica que derive de los valores de las propiedades físicas y/o químicas de un metabolito por operaciones estándares, por ejemplo, cálculos matemáticos tales como multiplicación, división o cálculo logarítmico. Más preferentemente, el al menos un rasgo característico permite la determinación y/o identificación química de dicho al menos un metabolito.

El al menos un metabolito comprendido por una muestra de prueba se puede determinar según la presente invención cuantitativa o cualitativamente. Para la determinación cualitativa, la presencia o ausencia del metabolito se determinará por una técnica adecuada. Además, la determinación cualitativa puede incluir, preferentemente, la determinación de la estructura química o composición del metabolito. Para la determinación cuantitativa, se determinará cualquiera de la cantidad precisa del al menos un metabolito presente en la muestra o se determinará la cantidad relativa del al menos un metabolito basándose, preferentemente, en el valor determinado para el (los) rasgo(s) característico(s) referido(s) en el presente documento anteriormente. La cantidad relativa se puede determinar en un caso en el que no se puede o debe determinar la cantidad precisa de un metabolito. En tal caso, se puede determinar si la cantidad en la que el metabolito está presente se amplía o reduce con respecto a una segunda muestra que comprende dicho metabolito en una segunda cantidad. Así, el analizar cuantitativamente un metabolito también incluye lo que algunas veces se denomina análisis semicuantitativo de un metabolito.

Además, determinar, como se usa en el procedimiento según la presente invención, incluye, preferentemente, usar una etapa de separación de compuesto antes de la etapa de análisis referida antes. Preferentemente, dicha etapa de separación de compuesto da una separación resuelta en el tiempo de los metabolitos comprendidos por la muestra. Las técnicas adecuadas para la separación que se va a usar preferentemente según la presente invención, por tanto, incluyen todas las técnicas cromatográficas de separación tales como cromatografía de líquidos (CL), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa fina, cromatografía por exclusión de tamaño o de afinidad. Estas técnicas son muy conocidas en la técnica y se pueden aplicar sin más por el experto en la materia. Más preferentemente, la CL y/o CG son técnicas cromatográficas que se prevén por el procedimiento de la presente invención. Se conocen bien en la técnica los dispositivos adecuados para dicha determinación de metabolitos. Preferentemente, se usa espectrometría de masas, en particular cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM), espectrometría de masas por infusión directa o espectrometría de masas de resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier (EM-ICR-TF), electroforesis capilar-espectrometría de masas (EC-EM), espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos de alto rendimiento (EM-HPLC), espectrometría de masas de cuadrupolo, cualquier espectrometría de masas secuencialmente acoplada, tal como EM-EM o EM-EM-EM, espectrometría de masas por plasma inductivamente acoplado (EM-ICP), espectrometría de masas por pirólisis (EM-Pi), espectrometría de masas de movilidad iónica o espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF). Más preferentemente, se usan CL-EM y/o CG-EM como se describe con detalle más adelante. Dichas técnicas se desvelan en, por ejemplo, Niessen, Journal of Chromatography A, 703, 1995: 37-57, documentos US 4.540.884 o US 5.397.894, cuyo contenido de la divulgación se incorpora por este documento como referencia. Como alternativa o además de las técnicas de espectrometría de masas, se pueden usar las siguientes técnicas para la determinación de compuestos: resonancia magnética nuclear (RMN), imagen por resonancia magnética (IRM), análisis de infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de ultravioleta (UV), índice de refracción (RI),

detección fluorescente, detección radioquímica, detección electroquímica, dispersión de la luz (LS), espectroscopía Raman dispersiva o detección de ionización de llama (FID). Estas técnicas se conocen bien por el experto en la materia y se pueden aplicar sin más. El procedimiento de la presente invención se debe ayudar, preferentemente, por automatización. Por ejemplo, se puede automatizar por robótica el procesamiento o pretratamiento de muestras. El procesamiento y la comparación de datos se ayudan, preferentemente, por programas informáticos y bases de datos adecuados. La automatización, como se describe antes en el presente documento, permite usar el procedimiento de la presente invención en enfoques de alto rendimiento.

Además, el al menos un metabolito también se puede determinar por un ensayo químico o biológico específico. Dicho ensayo debe comprender medios que permitan detectar específicamente el al menos un metabolito en la muestra. Preferentemente, dichos medios pueden reconocer específicamente la estructura química del metabolito o pueden identificar específicamente el metabolito basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos o su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico (por ejemplo, inducción de un gen indicador). Los medios que pueden reconocer específicamente la estructura química de un metabolito son, preferentemente, anticuerpos u otras proteínas que interactúan específicamente con estructuras químicas, tales como receptores o enzimas. Los anticuerpos específicos, por ejemplo, se pueden obtener usando el metabolito como antígeno por procedimientos muy conocidos en la técnica. Los anticuerpos, como se refiere en el presente documento, incluyen tanto anticuerpos policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)₂ que se pueden unir al antígeno o hapteno. La presente invención también incluye anticuerpos híbridos humanizados en los que las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo humano no donante que presenta una especificidad por antígeno deseada se combinan con las secuencias de un anticuerpo aceptor humano. Además, se engloban anticuerpos monocatenarios. Las secuencias donantes incluirán normalmente al menos los restos de aminoácidos de unión al antígeno del donante, pero también pueden comprender otros restos de aminoácidos estructuralmente y/o funcionalmente relevantes del anticuerpo donante. Tales híbridos se pueden preparar por varios procedimientos muy conocidos en la técnica. Las proteínas adecuadas que pueden reconocer específicamente el metabolito son, preferentemente, enzimas que participan en la conversión metabólica de dicho metabolito. Dichas enzimas pueden o bien usar el metabolito como un sustrato, o bien pueden convertir un sustrato en el metabolito. Además, dichos anticuerpos se pueden usar como base para generar oligopéptidos que reconocen específicamente el metabolito. Estos oligopéptidos deben, por ejemplo, comprender los dominios de unión a enzima o sitios para dicho metabolito. Los ensayos adecuados basados en anticuerpos y/o enzimas pueden ser RIA (radioinmunoensayo), ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), enzimoinmunoanálisis de tipo sándwich, inmunoensayos de electroquimioluminiscencia de tipo sándwich (ECLIA), fluoroinmunoanálisis de disociación aumentada por lantánidos (DELFLIA) o inmunoanálisis en fase sólida. Además, el metabolito también se puede identificar basándose en su capacidad para reaccionar con otros compuestos, es decir, por una reacción química específica. Se conocen bien en la técnica las reacciones adecuadas y, preferentemente engloban reacciones enzimáticas (por ejemplo, para manosa Pitkanen E, Pitkanen O, Uotila L.; Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997 Oct;35(10):761-6; o ácido ascórbico Winnie Lee, Susan M. Roberts y Robert F. Labbe; Clinical Chemistry 43: 154-157, 1997), procedimientos espectrofotométricos enzimáticos (BN La Du, RR Howell, PJ Michael and EK Sober; Pediatrics, Jan 1963, 39-46, Vol 31, Nº 1), procedimientos espectrofluorimétricos (Sumi T, Umeda Y, Kishi Y, Takahashi K, Kakimoto F.; Clin Chim Acta. 1976 Dec 1;73(2):233-9) y fluorescencia; quimioluminiscencia (J.J. Thiele, H.J. Freisleben, J. Fuchs y F.R. Ochsendorf; Human Reproduction, Vol. 10, Nº 1, pp. 110-115, 1995). Se pueden usar procedimientos de detección adicionales tales como electroforesis capilar (Hubert A. Carchon y Jaak Jaeken; 47: 1319-1321, 2001) y procedimientos colorimétricos (Kyaw A; Clin Chim Acta. 1978 Jun;86(2):153-7). Además, el metabolito se puede determinar en una muestra debido a su capacidad para provocar una respuesta en un sistema de lectura biológico. La respuesta biológica se debe detectar como lectura, que indica la presencia y/o la cantidad del metabolito comprendida por la muestra. La respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la inducción de expresión génica o una respuesta fenotípica de una célula o un organismo.

Además, se debe entender que dependiendo de la técnica usada para determinar dicho al menos un metabolito, el analito que se detectará podría ser uno derivado del metabolito que existe fisiológicamente, es decir, el metabolito presente dentro de un sujeto. Dichos analitos se pueden generar como resultado de la preparación de muestras o medios de detección. Se considera que los compuestos referidos en el presente documento son analitos. Sin embargo, como se expone anteriormente, estos analitos representarán los metabolitos de una forma cualitativa y cuantitativa. Además, se debe entender que para una pluralidad de metabolitos, el metabolito será idéntico al analito. Un metabolito o analito, como se refiere según la presente invención, se refiere a una especie molecular que sirve de indicador para una enfermedad o efecto como se refiere en esta memoria descriptiva. Dichas especies moleculares pueden ser un propio metabolito que se encuentra en una muestra de un sujeto. Además, el biomarcador también puede ser una especie molecular que deriva de dicho metabolito. En tal caso, el metabolito real se modificará químicamente en la muestra o durante el proceso de determinación y, como resultado de dicha modificación, una especie molecular químicamente diferente, es decir, el analito, será la especie molecular determinada. Se debe entender que en tal caso el analito representa el metabolito real y tiene el mismo potencial que un indicador para la afección médica respectiva. Además, un biomarcador según la presente invención no es necesariamente correspondiente a una especie molecular. Más bien, el biomarcador puede comprender estereoisómeros o enantiómeros de un compuesto. Además, un biomarcador también puede representar la suma de isómeros de una clase biológica de moléculas isoméricas. Dichos isómeros deben presentar características analíticas idénticas en algunos casos y, por tanto, no se distinguen por los diversos procedimientos analíticos que

incluyen los aplicados en los ejemplos adjuntos descritos más adelante. Sin embargo, los isómeros compartirán al menos parámetros idénticos de la fórmula aditiva y, así, en el caso de, por ejemplo, lípidos una longitud de cadena idéntica y números idénticos de dobles enlaces en el ácido graso y/o los restos de esfingobase.

5 El término "referencia" se refiere a cantidades o valores que los representan, es decir, datos de rasgos característicos del al menos un metabolito, que se pueden correlacionar con la presencia o ausencia de una enfermedad o afección referida en el presente documento. Dicha referencia se obtiene, preferentemente, a partir de una muestra de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que está en riesgo de recaída de carcinoma de próstata después de prostatectomía. La referencia puede, por ejemplo, ser el promedio o la media obtenida de un grupo de dichas muestras. Si la referencia se debe obtener de una o más muestra(s) de tejido de biopsia, dicha(s) muestra(s) 10 deben comprender o consistir esencialmente en tejido de carcinoma de próstata o tejido que se sospecha que es tejido de carcinoma de próstata. El último tejido sospechoso de ser tejido de carcinoma de próstata puede parecer histológicamente como tejido de carcinoma de próstata normal, pero puede derivar de áreas ubicadas en la proximidad al primer carcinoma de próstata que se extirpó por prostatectomía. La referencia se puede obtener aplicando el procedimiento de la presente invención.

15 Alternativamente, pero sin embargo también preferido, los resultados de referencia se pueden obtener de la muestra de un sujeto o un grupo de sujetos que se conoce que no están en riesgo de recaída de carcinoma de próstata después de prostatectomía. Asimismo, si la referencia se debe obtener de una muestra de tejido de biopsia, dicha muestra debe consistir esencialmente en tejido de próstata aparentemente sano. La referencia también puede ser el promedio o la media obtenida de un grupo de dichas muestras. Preferentemente, si se prevén muestras de tejidos 20 de biopsia, la muestra que subyace a la referencia y la muestra de prueba se pueden obtener del mismo sujeto, es decir, de áreas que están evidentemente afectadas por carcinoma de próstata y de áreas que se sospecha que están afectadas por carcinoma de próstata.

Además, la referencia también podría ser preferentemente una referencia calculada, más preferentemente el promedio o la mediana, para la cantidad relativa o absoluta de un metabolito de una población representativa de 25 individuos que están evidentemente sanos o padecen carcinoma de próstata, en la que los sujetos que padecen carcinoma de próstata están dentro de la prevalencia para la enfermedad en una población dada, preferentemente, la población estadounidense, asiática o europea. Las cantidades absolutas o relativas de los metabolitos de dichos individuos de la población se pueden determinar como se especifica en cualquier parte en el presente documento. Se conoce bien en la técnica cómo calcular un valor de referencia adecuado, preferentemente, el promedio o 30 la mediana. La población de sujetos referida antes debe comprender una pluralidad de sujetos, preferentemente, al menos 5, 10, 50, 100, 1.000 o 10.000 sujetos. Se debe entender que el sujeto que se va a diagnosticar por el procedimiento de la presente invención y los sujetos de dicha pluralidad de sujetos son de la misma especie.

Más preferentemente, se obtendrá una "referencia" determinando los valores para el al menos un rasgo característico para un grupo de sujetos de referencia, es decir, un grupo de sujetos que se conoce que padecen 35 carcinoma de próstata, un grupo de sujetos que se conoce que no padecen carcinoma de próstata, una población que comprende el sujeto que se va a investigar o un grupo de muestras de biopsia de tejido de carcinoma de próstata o tejido aparentemente sano y calculando la referencia por medidas estadísticas apropiadas que incluyen las referidas en cualquier parte en el presente documento, tal como mediana, promedio, cuantiles, PLS-DA, procedimientos de regresión logística, clasificación de bosque aleatoria u otras que dan un valor umbral. El valor 40 umbral debe tener en cuenta los parámetros clínicos deseados de sensibilidad y especificidad de la prueba de diagnóstico y pronóstico. Las cantidades umbrales que se van a usar como referencias se pueden determinar, preferentemente, aplicando la eficacia diagnóstica (ROC) (véase especialmente Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577). El gráfico de ROC es un gráfico de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión en todo el intervalo de datos observado. El rendimiento clínico de un procedimiento de diagnóstico depende de su exactitud, es decir, su capacidad para asignar correctamente sujetos a un cierto pronóstico o diagnóstico. El gráfico de ROC indica la superposición entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales adecuados para hacer una distinción. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos, que se define como la relación 45 entre el número de resultados de pruebas positivas verdaderas y el producto del número de resultados de pruebas positivas verdaderas y el número de pruebas negativas falsas. Esto también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de positivos falsos, o 1-especificidad, que se define como la relación entre el número de resultados positivos falsos y el producto del número de resultados negativos verdaderos y el número de positivos falsos. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos y falsos se calculan completamente por separado, usando los resultados de prueba de dos subgrupos diferentes, el gráfico de ROC es independiente de la prevalencia del acontecimiento en la cohorte. Cada punto en el gráfico de ROC representa un par de sensibilidad/-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, donde la fracción positiva verdadera es 1,0, o 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de positivos falsos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentran entre estos dos extremos. Si el gráfico de ROC se encuentra completamente por debajo de la diagonal a 45°, esto se 60

soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "superior a" a "inferior a" o viceversa. Cualitativamente, cuanto más próximo esté el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor es la exactitud global de la prueba. Dependiendo del intervalo de confianza deseado, se puede derivar un umbral de la curva de ROC que permite el diagnóstico o la predicción para un evento dado con un equilibrio apropiado de sensibilidad y especificidad, respectivamente. Por consiguiente, la referencia que se va a usar para el procedimiento anteriormente mencionado de la presente invención, es decir, un umbral que permite discriminar entre sujetos que están en riesgo elevado de mortalidad o los que tienen un riesgo normal entre una cohorte de sujetos que padecen inflamación aguda, se puede generar preferentemente estableciendo una ROC para dicha cohorte como se ha descrito anteriormente y derivando una cantidad umbral de la misma. Dependiendo de su sensibilidad y especificidad deseadas por un procedimiento de diagnóstico, el gráfico de ROC permite derivar umbrales adecuados.

Más preferentemente, los resultados de referencia, es decir, valores para al menos un rasgo característico del al menos un metabolito, se almacenarán en un medio de almacenamiento de datos adecuado tal como una base de datos y así también están disponibles para futuros diagnósticos. Esto también permite diagnosticar eficientemente la predisposición para una enfermedad o una afección debido a que se pueden identificar resultados de referencia adecuados en la base de datos una vez se ha confirmado (en el futuro) que el sujeto del que se obtuvo la muestra de referencia correspondiente desarrolló (ciertamente) carcinoma de próstata. Los resultados de referencia preferidos que están asociados con carcinoma de próstata o predisposición, por tanto, en seres humanos son los mostrados en las tablas de los ejemplos adjuntos.

El término "comparar" se refiere a evaluar si los resultados de la determinación descrita anteriormente en este documento con detalle, es decir, los resultados de la determinación cualitativa o cuantitativa del al menos un metabolito, son idénticos o similares a los resultados de referencia o se diferencian de los mismos.

En caso de que los resultados de referencia se obtengan de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que muestran la enfermedad o afección, dicha enfermedad o afección se puede diagnosticar basándose en el grado de identidad o similitud entre la cantidad de prueba obtenida de la muestra de prueba y la referencia anteriormente mencionada, es decir, basándose en una composición cualitativa o cuantitativa idéntica o similar con respecto a al menos un metabolito. Los resultados de la muestra de prueba y los resultados de referencia son idénticos si los valores para los rasgos característicos y, en el caso de la determinación cuantitativa, los valores de intensidad, son idénticos. Dichos resultados son similares si los valores de los rasgos característicos son idénticos, pero los valores de intensidad son diferentes. Dicha diferencia es, preferentemente, no significativa y se debe caracterizar porque los valores para la intensidad están dentro de al menos el intervalo entre los centiles 1 y 99, los centiles 5 y 95, los centiles 10 y 90, los centiles 20 y 80, los centiles 30 y 70, los centiles 40 y 60 del valor de referencia o los centiles 50, 60, 70, 80, 90 o 95 del valor de referencia.

En caso de que los resultados de referencia se obtengan de un sujeto o un grupo de sujetos que se conoce que no muestran la enfermedad o afección, dicha enfermedad o afección se puede diagnosticar basándose en las diferencias entre la cantidad de prueba obtenida de la muestra de prueba y la referencia anteriormente mencionada, es decir, diferencias en la composición cualitativa o cuantitativa con respecto a al menos un metabolito. Lo mismo aplica si se usa una referencia calculada como se especificó anteriormente. La diferencia puede ser un aumento en la cantidad absoluta o relativa de un metabolito (algunas veces denominado regulación por incremento del metabolito; véanse también las tablas, más adelante) o una disminución en cualquiera de dichas cantidades o la ausencia de una cantidad detectable del metabolito (algunas veces denominado regulación por disminución del metabolito; véanse también las tablas, más adelante). Preferentemente, la diferencia en la cantidad relativa o absoluta es significativa, es decir, fuera del intervalo entre los centiles 45 y 55, los centiles 40 y 60, los centiles 30 y 70, los centiles 20 y 80, los centiles 10 y 90, los centiles 5 y 95, los centiles 1 y 99 del valor de referencia.

Para los metabolitos específicos referidos en esta memoria descriptiva en cualquier parte, valores preferidos para los cambios en las cantidades relativas (es decir, cambios en la mediana) o el tipo de regulación (es decir, regulación por "incremento" o "disminución" que dan como resultado una cantidad relativa y/o absoluta más alta o más baja) se indican en las tablas, más adelante. Si se indica en dichas tablas que un metabolito dado se regula por "incremento" en un sujeto o una muestra de tejido, aumentará la cantidad relativa y/o absoluta, si se "regula por disminución", disminuirá la cantidad relativa y/o absoluta del metabolito. Además, la mediana indica el grado de aumento o disminución, por ejemplo, una mediana de 2,0 significa que la cantidad es dos veces la cantidad del metabolito en comparación con la referencia.

En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado de la invención, dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía. Más preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de que un sujeto está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

En otra realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado de la invención, dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de

5 prostatectomía. Más preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

10 La comparación se ayuda, preferentemente, por automatización. Por ejemplo, se puede usar un programa informático adecuado que comprende un algoritmo para la comparación de dos conjuntos de datos diferentes (por ejemplo, conjuntos de datos que comprenden los valores del (de los) rasgo(s) característico(s)). Se conocen bien en la técnica dichos programas informáticos y algoritmo. A pesar de lo anterior, también se puede llevar a cabo manualmente una comparación.

15 Los procedimientos anteriormente mencionados para la determinación del al menos un metabolito se pueden implementar en un dispositivo. Un dispositivo, como se usa en el presente documento, debe comprender al menos los medios anteriormente mencionados. Además, el dispositivo comprende, preferentemente, además medios para la comparación y evaluación del (de los) rasgo(s) característico(s) detectado(s) del al menos un metabolito y, también preferentemente la intensidad de señal determinada. Los medios del dispositivo se unen operativamente, preferentemente, entre sí. Cómo conectar los medios en un modo de funcionamiento dependerá del tipo de medios incluidos en el dispositivo. Por ejemplo, cuando se aplican los medios para determinar automáticamente cualita o cuantitativamente el metabolito o metabolitos, los datos obtenidos por dichos medios de funcionamiento automático se pueden procesar por, por ejemplo, un programa informático con el fin de facilitar el diagnóstico. Preferentemente, 20 los medios comprenden un único dispositivo en tal caso. Dicho dispositivo puede incluir, por consiguiente, una unidad de análisis para los metabolitos y una unidad de evaluación para procesar los datos resultantes para el diagnóstico. Alternativamente, cuando se usan medios tales como tiras reactivas para determinar los metabolitos, los medios para el diagnóstico pueden comprender tiras de control o tablas que asignan los datos de resultado determinados a los datos conocidos que se conoce que acompañan al carcinoma de próstata o una predisposición para el mismo o que son indicativos de un sujeto sano como se trata anteriormente. Los dispositivos preferidos son los que se pueden aplicar sin el conocimiento particular de un profesional clínico especializado, por ejemplo, tiras reactivas o dispositivos electrónicos que simplemente requieren la carga con una muestra.

25 Alternativamente, los procedimientos para la determinación del al menos un metabolito se pueden implementar en un sistema que comprende varios dispositivos que se unen operativamente, preferentemente, entre sí. Específicamente, los medios se deben conectar de un modo tal que permita llevar a cabo el procedimiento de la presente invención como se describe con detalle anteriormente. Por tanto, los medios se conectan operativamente, como se usa en el presente documento, preferentemente, se conectan funcionalmente. Dependiendo de los medios que se van a usar para el sistema de la presente invención, dichos medios se pueden conectar funcionalmente conectando cada medio con los otros por medios que permiten el transporte de datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra de vidrio, y otros cables para el transporte de datos de alto rendimiento. Sin embargo, también se prevé por la presente invención la transferencia de datos inalámbrica entre los medios, por ejemplo, mediante LAN (LAN inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para determinar metabolitos. Los medios para determinar los metabolitos como se usa en el presente documento engloban medios para separar metabolitos, tales como dispositivos cromatográficos, y medios para la determinación de metabolitos, tales como dispositivos de espectrometría de masas. Se han descrito con detalle anteriormente dispositivos adecuados. Los medios preferidos para la separación de compuestos que se van a usar en el sistema de la presente invención incluyen dispositivos cromatográficos, más preferentemente dispositivos para cromatografía de líquidos, HPLC y/o cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuestos comprenden dispositivos de espectrometría de masas, más preferentemente, CG-EM, CL-EM, espectrometría de masas de infusión directa, EM-ICR-TF, EC-EM, HPLC-EM, espectrometría de masas de cudrupolo, espectrometría de masas secuencialmente acoplada (que incluye EM-EM o EM-EM-EM), EM-ICP, EM-Pi o TOF. Los medios de separación y determinación se acoplan, preferentemente, entre sí. Más preferentemente, se usan CL-EM y/o CG-EM en el sistema de la presente invención como se describe con detalle en cualquier parte en la memoria descriptiva. Otros comprendidos deben ser medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos de los medios para la determinación de metabolitos. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender al menos una base de datos y un programa informático implementado para la comparación de los resultados.

30 Como se ha descrito anteriormente, en una realización preferida del procedimiento de la presente invención, dicha determinación del al menos un metabolito comprende espectrometría de masas (EM).

35 La espectrometría de masas, como se usa en el presente documento, engloba todas las técnicas que permiten la determinación del peso molecular (es decir, la masa) o una masa variable correspondiente a un compuesto, es decir, un metabolito, que se va a determinar según la presente invención. Preferentemente, la espectrometría de masas como se usa en el presente documento se refiere a CG-EM, CL-EM, espectrometría de masas de infusión directa, EM-ICR-TF, EC-EM, HPCL-EM, espectrometría de masas de cudrupolo, cualquier espectrometría de masas secuencialmente acoplada tal como EM-EM o EM-EM-EM, EM-ICP, EM-Pi, TOF o cualquier enfoque combinado usando las técnicas anteriormente mencionadas. Se conoce bien por el experto en la materia cómo aplicar estas técnicas. Además, están comercialmente disponibles dispositivos adecuados. Más preferentemente, la espectrometría de masas como se usa en el presente documento se refiere a CL-EM y/o CG-EM, es decir, a espectrometría de masas que se une operativamente a una etapa de separación cromatográfica previa. Más

preferentemente, la espectrometría de masas como se usa en el presente documento engloba EM de cuadrupolo. Más preferentemente, dicha EM de cuadrupolo se lleva a cabo del siguiente modo: a) selección de un cociente de masa/carga (m/z) de un ion creado por ionización en un primer cuadrupolo analítico del espectrómetro de masas, b) fragmentación del ion seleccionado en la etapa a) aplicando un voltaje de aceleración de un cuadrupolo posterior adicional que se llena con un gas de colisión y actúa de cámara de colisión, selección de un cociente de masa/carga de un ion creado por el proceso de fragmentación en la etapa b) en un cuadrupolo posterior adicional, por el cual las etapas a) a c) del procedimiento se llevan a cabo al menos una vez y el análisis del cociente de masa/carga de todos los iones presentes en la mezcla de sustancias como resultado del proceso de ionización, por el cual el cuadrupolo se llena con gas de colisión, pero no se aplica voltaje de aceleración durante el análisis. Detalles sobre dicha espectrometría de masas más preferida que se va a usar según la presente invención se pueden encontrar en el documento WO 03/073464.

Más preferentemente, dicha espectrometría de masas es EM-cromatografía de líquidos (CL) y/o EM-cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de líquidos como se usa en el presente documento se refiere a todas las técnicas que permiten la separación de compuestos (es decir, metabolitos) en fase líquida o supercrítica. La cromatografía de líquidos se caracteriza porque compuestos en una fase móvil pasan a través de la fase estacionaria. Cuando los compuestos pasan a través de la fase estacionaria a diferentes velocidades, se llegan a separar con el tiempo puesto que cada compuesto individual tiene su tiempo de retención específico (es decir, el tiempo que se requiere para que el compuesto pase a través del sistema). La cromatografía de líquidos como se usa en el presente documento también incluye HPLC. Los dispositivos para la cromatografía de líquidos están comercialmente disponibles, por ejemplo de Agilent Technologies, EE.UU. La cromatografía de gases como se aplica según la presente invención, en principio, funciona de forma comparable a la cromatografía de líquidos. Sin embargo, en vez de tener los compuestos (es decir, metabolitos) en una fase móvil líquida que pasa a través de la fase estacionaria, los compuestos estarán presentes en un volumen gaseoso. Los compuestos atraviesan la columna que puede contener materiales de soporte sólido como fase estacionaria o cuyas paredes pueden servir como o estar recubiertas con la fase estacionaria. Nuevamente, cada compuesto tiene un tiempo específico que se requiere para pasar a través de la columna. Además, en el caso de la cromatografía de gases se prevé preferentemente que los compuestos se derivaticen antes de la cromatografía de gases. Se conocen bien en la técnica técnicas adecuadas para la derivatización. Preferentemente, la derivatización según la presente invención se refiere a metoximación y trimetilsililación de, preferentemente, compuestos polares y transmetilación, metoximación y trimetilsililación de, preferentemente, compuestos no polares (es decir, lipófilos).

Ventajosamente, se ha encontrado según la presente invención que al menos uno o un grupo de los metabolitos anteriormente mencionados será un biomarcador adecuado para el diagnóstico del riesgo de carcinoma de próstata recurrente en pacientes después de prostatectomía. El aplicar estos metabolitos como biomarcadores permite una estratificación posquirúrgica rápida, fiable y rentable del riesgo. Así, la gestión del cuidado sanitario se debe beneficiar enormemente del procedimiento de la presente invención, en el que se pueden evaluar y estimar de forma fiable la necesidad de medidas de monitorización, así como de cuidado posquirúrgico y medidas terapéuticas.

En principio, la invención engloba el uso de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 2 o un agente de detección para el mismo para diagnosticar en una muestra de un sujeto después de prostatectomía si dicho sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía. Además, la divulgación se refiere al uso de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 2 o un agente de detección para el mismo para la fabricación de una composición de diagnóstico o farmacéutica para diagnosticar en una muestra de un sujeto después de prostatectomía si dicho sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

Las explicaciones e interpretaciones de los términos hechas anteriormente se aplican, por consiguiente, a las otras realizaciones especificadas en el presente documento más adelante, excepto si se indica de otro modo.

En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicho procedimiento comprende además la etapa de recomendar una medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente para el sujeto basándose en si se diagnostica que el sujeto está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía o como carcinoma de próstata metastatizante o no metastatizante, preferentemente, basándose en una muestra de biopsia.

El término "recomendar", como se usa en el presente documento, se refiere a hacer sugerencias de medidas terapéuticas y/o medidas de gestión sanitaria del paciente que son específicamente aplicables al paciente. Recomendar no engloba, preferentemente, la aplicación real de las medidas terapéuticas o de gestión sanitaria del paciente recomendadas.

El término "medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a medidas terapéuticas que tienen como objetivo curar o mejorar el cáncer de próstata o que tienen como objetivo prevenir el cáncer de próstata recurrente, así como medidas de gestión sanitaria del paciente tales como monitorización que incluyen la selección de medidas de monitorización y frecuencia de monitorización y hospitalización. Preferentemente, dicha medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente se selecciona del grupo que consiste en: cirugía de próstata, administración de fármacos antineoplásicos, monitorización del paciente, actitud expectante, espera vigilante y hospitalización. Las terapias adecuadas para el carcinoma de próstata incluyen cirugía, irradiación de baja y alta dosis, terapia hormonal y quimioterapia sistémica, por ejemplo, citostáticos, solos o en combinación con otros fármacos, tales como docetaxel en combinación con prednisolona como terapia de

primera línea, docetaxel combinado con terapia hormonal o con citostáticos como vinorelbina, epirubicina, capecitabina o calcitriol. Se entenderá que el procedimiento también se puede aplicar a determinar si un sujeto se beneficiará o no de o está en necesidad o no de una terapia contra un carcinoma de próstata en progresión. Dicho procedimiento se puede aplicar en enfoques terapéuticos como la "actitud expectante". En este enfoque, un sujeto que padece carcinoma de próstata menos avanzado se somete a un procedimiento de diagnóstico de carcinoma de próstata en progresión como se expone anteriormente en una base regular corta con el fin de detectar la aparición temprana de la progresión. Solo después de que la progresión llegue a ser detectable, el sujeto se tratará por una terapia adecuada, tal como cirugía o radiación. Así, la "actitud expectante" previene los efectos secundarios perjudiciales de una terapia en sujetos que - aunque padecen carcinoma de próstata - no están en necesidad inmediata de una terapia. Evitando la terapia en este estadio, se entenderá que se pueden evitar también los efectos secundarios perjudiciales de la terapia. El enfoque de "actitud expectante" se pone normalmente en práctica con sujetos más jóvenes (Kim S 2nd, Dall'Era MA, Evans CP Curr Opin Urol. 2012; 22(3):247-53. Economic analysis of active surveillance for localized prostate cancer). El enfoque de "espera vigilante" se basa en una terapia hormonal y monitorización aplicando los procedimientos de la presente invención en una base regular prolongada. Si no son evidentes signos de progresión del carcinoma de próstata, se pueden evitar medidas terapéuticas adicionales tales como cirugía o radiación y sus efectos secundarios (Dall'Era MA, Carroll PR. Curr Opin Urol. 2009 May;19(3):258-62, "Outcomes and follow-up strategies for patients on active surveillance"

En una realización más preferida del procedimiento de la presente invención, dicho procedimiento también comprende la etapa de aplicar dichas medidas terapéuticas o de gestión sanitaria del paciente como se identificaron por el procedimiento anteriormente mencionado al sujeto.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

- (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 2 o ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo o 7-metilguanina en una muestra de prueba de un sujeto antes de la prostatectomía; y
- (b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por el cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, en el que dicho al menos un metabolito comprende 7-metilguanina, y en el que dicha muestra de prueba es una biopsia tomada antes una prostatectomía planificada o el propio tejido extraído durante la prostatectomía.

Preferentemente, dicha muestra se ha obtenido del sujeto (por ejemplo, por biopsia) antes de la prostatectomía, sin embargo, en un momento en el que el cáncer de próstata ya es clínicamente evidente. Más preferentemente, el cáncer de próstata en este contexto es clínicamente evidente si se cumplen los criterios mencionados en los ejemplos adjuntos como criterios de inclusión preoperatorios.

Si se va a usar una muestra obtenida antes de la prostatectomía, el procedimiento se puede usar, por tanto, preferentemente, para decidir si se debe llevar a cabo en un paciente, o no, la prostatectomía. Ventajosamente, se ha encontrado según la presente invención que al menos uno o un grupo de los metabolitos anteriormente mencionados será un biomarcador adecuado para el diagnóstico del riesgo de carcinoma de próstata recurrente en pacientes antes de la prostatectomía.

Los nueve metabolitos que se van a usar según el procedimiento anteriormente mencionado de la presente invención pertenecen a diferentes clases metabólicas. Cuatro de los siete metabolitos regulados por incremento, concretamente, ácido cerebrónico, ácido hidroxibehénico, ácido tricosanoico y glicerofosfoetanolamina, son componentes de lípidos complejos. Los tres ácidos grasos dan una indicación de la probable causa de esta alteración. Por ejemplo, los α -hidroxiácidos grasos de cadena larga (ácido hidroxibehénico, ácido cerebrónico) no se pueden metabolizar por β -oxidación, sino solo por α -oxidación, que están localizado en peroxisomas (Singh 1997, Mol Cell Biochem 167: 1-29). El ácido cerebrónico, como un constituyente importante de los cerebrosidos, se descarboxila por α -oxidación dando ácido tricosanoico y CO₂ (Sandhir 2000, Lipids 35:1127-33). La acumulación de estos ácidos grasos en tejido de cáncer de próstata indica la participación de la α -oxidación peroxisomal en estos cambios (Zha 2005, Prostate 63:316-323). Ya se han descrito niveles elevados de glicerofosfoetanolamina en muestras de cáncer de próstata (Swanson 2008, Magn Reson Med 60: 33-40). Con respecto a los otros tres metabolitos elevados, se debe observar que el pirofosfato de isopentenilo como producto intermedio en la vía de síntesis esteroidea se forma a partir de acetil-CoA en la vía de mevalonato, y su aumento refleja el aumento de los valores de colesterol en tejido de cáncer de próstata (Lombard 2011, Mol Biol Evol 28: 87-99; Thysell 2010, PLoS One 5:e14175). El ácido aminoadípico es un producto final de la oxidación de lisina (Sell 2007, Biochem J 404: 269-277). Solo recientemente se encontró que la captación de lisina y la secreción de ácido aminoadípico aumentaba en experimentos de cultivo celular con células deficientes en KLF4 supresoras de tumor (Bellance 2012, Biochim Biophys Acta 1817: 2060-71). Se alteró en consecuencia el metabolismo del ácido aminoadípico del cambio del metabolismo de lisina que forma acetil-CoA para la elevada síntesis de ácidos grasos. Por tanto, los autores sugirieron el ácido aminoadípico como un posible biomarcador en cáncer que indica expresión diferencial de KLF4 que actúa como factor de transcripción (Bellance 2012, loc cit). A este respecto, es de interés que la expresión de KLF4 en tejido de cáncer de próstata generalmente es reducida y tiene valor pronóstico para predecir metástasis (Wang 2010, Cancer Res 70: 10182-91). Así, se explican entre sí los resultados del ácido aminoadípico como pronosticador de recaída bioquímica según los estudios que subyacen a la invención, la relación entre ácido aminoadípico y KLF4, y los datos de bibliografía del valor pronóstico de KLF4 en cáncer de próstata. La 7-

metilguanina es un producto de reparación del daño por metilación al ADN (Ames 1989, Mutat Res 214: 41-6). También se han encontrado niveles elevados de metilguanina en otros tumores. Se ha sugerido una reducida defensa contra las especies reactivas de oxígeno intracelulares, ya sea debido a deficiencias enzimáticas o basadas en cinc, como la causa de la elevada manifestación de metilguanina (Saad 2006, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15: 740-3; Newberne 1997, Pathobiology 65: 253-63). Los dos metabolitos regulados por disminución, ácido glucónico y maltotriosa, se relacionan con el metabolismo de los hidratos de carbono. El ácido glucónico conecta las vías de glucosa y fosfato de pentosa, y se han encontrado concentraciones cambiadas en condiciones de estrés oxidativo (Liu 2010, Burns 36: 992-8). Se descubrió recientemente que la maltotriosa, que se conoce hasta ahora solo como un producto intermedio de la degradación del almidón ingerido por la enzima digestiva amilasa, se sintetiza en células de coriocarcinoma que presentan actividades inmunorreguladoras distintas (Zhu 2011, Am J Reprod Immunol 65: 54-64). También se mostró que la maltotriosa representa uno de los motivos esenciales de secuencia señal de localización nuclear (Niikura 2008, ChemBiochem 9: 2623-7). Estas moléculas señal gobiernan el transporte de proteínas entre los compartimentos nuclear y citoplásmico por el denominado ciclo de importación de proteínas nucleares con el fin de mantener su composición distintiva.

El aplicar los metabolitos anteriormente mencionados según la invención como biomarcadores permite una estratificación del riesgo rápida, fiable y rentable antes de la prostatectomía y, así, decidir sobre la utilidad de la prostatectomía en un paciente. Por consiguiente, la gestión sanitaria debe beneficiarse enormemente del procedimiento de la presente invención en el que se puede evaluar y monitorizar mejor la necesidad de medidas de cirugía, así como se puede estimar de forma fiable el cuidado preoperatorio y posoperatorio y las medidas terapéuticas.

En principio, la invención engloba el uso de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 2 o ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo o 7-metilguanina o un agente de detección para el mismo para el diagnóstico en una muestra de un sujeto antes de la prostatectomía si dicho sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía. Además, la invención se refiere al uso de al menos un biomarcador seleccionado de la Tabla 2 o ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo o 7-metilguanina o un agente de detección para el mismo para la fabricación de una composición de diagnóstico o farmacéutica para el diagnóstico en una muestra de un sujeto antes de la prostatectomía si dicho sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicho procedimiento comprende además la etapa de recomendar una medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente para el sujeto basándose en si el sujeto que se diagnostica está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

(a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 7 y/o Tabla 8 y/o Tabla 2, en una muestra de prueba de un sujeto antes de la prostatectomía; y

(b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, en el que dicho al menos un metabolito comprende 7-metilguanina, y en el que dicha muestra de prueba es una biopsia tomada antes de una prostatectomía planificada o el propio tejido extraído durante la prostatectomía.

Preferentemente, el término "muestra de prueba de un sujeto antes de prostatectomía" se refiere a una muestra obtenida antes de extirpar quirúrgicamente la próstata de un sujeto o una parte de la misma. Por consiguiente, preferentemente, una muestra de prueba puede ser una muestra de biopsia tomada antes de una prostatectomía planificada, o el propio tejido extraído durante la prostatectomía. Más preferentemente, la muestra de prueba es una muestra de biopsia tomada antes de una prostatectomía planificada.

En una realización preferida, diagnosticar si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía se refiere a diagnosticar si dicho sujeto se beneficiará de la prostatectomía. Por consiguiente, en una realización preferida, diagnosticar si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía se refiere a proporcionar una ayuda en decidir si la prostatectomía será beneficiosa para dicho sujeto, o no. Preferentemente, diagnosticar si un sujeto está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía se refiere a establecer un pronóstico de dicho sujeto después de prostatectomía, es decir, más preferentemente, estimar el riesgo de que dicho paciente tenga un mal pronóstico después de prostatectomía.

Como se apreciará por el experto, preferentemente, los procedimientos de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente permiten una predicción mejorada de dicho riesgo. Por consiguiente, se puede reducir el número de participantes en un estudio, por ejemplo para la identificación de factores que aumentan o disminuyen dicho riesgo. Así, en una realización preferida, un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente según la presente invención es parte de un procedimiento de detección de factores que aumentan o disminuyen el riesgo de carcinoma de próstata recurrente. Preferentemente, los factores que aumentan el riesgo de carcinoma de próstata recurrente son factores medioambientales o socioeconómicos que incluyen, sin limitación, toxinas, carcinógenos, nutrición, y similares. También preferentemente, los factores que disminuyen el riesgo de carcinoma de próstata recurrente incluyen, sin limitación, tratamientos médicos o factores socioeconómicos como, por ejemplo, tratamiento citostático, radioterapia, nutrición,

y similares.

En una realización preferida adicional, un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente según la presente invención es parte de un procedimiento para disminuir el número de sujetos requerido para detectar un factor que aumenta o que disminuye dicho riesgo. Además, en una realización también preferida, un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente según la presente invención es parte de un procedimiento para identificar un sujeto adecuados como sujeto de prueba en un procedimiento para identificar factores que aumentan o que disminuyen dicho riesgo. En cambio, en una realización también preferida, un procedimiento de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente según la presente invención es parte de un procedimiento para identificar un sujeto no adecuado como un sujeto de prueba en un procedimiento para identificar factores que aumentan o que disminuyen dicho riesgo.

Además, la divulgación se refiere a un procedimiento de diferenciación entre un tejido maligno de carcinoma de próstata y un tejido no maligno que comprende:

- (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 4 en una muestra de tejido de prueba de un sujeto que padece carcinoma de próstata; y
- (b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diferencia entre tejido de próstata maligno y no maligno de forma que el tejido se identifica como que es tejido maligno de carcinoma de próstata o tejido no maligno.

El término "diferenciar", como se usa en el presente documento, se refiere a identificar que una muestra de tejido de prueba es o bien tejido maligno de carcinoma de próstata o bien no maligno y, preferentemente, tejido normal de próstata. Se entenderá que la diferenciación puede no ser correcta para todas las muestras de tejido investigadas. Sin embargo, preferentemente se prevé que la identificación se pueda hacer para números de casos estadísticamente significativos. Si varios casos son estadísticamente significativos, se puede determinar por técnicas estadísticas descritas en cualquier parte en el presente documento.

El término "tejido maligno de carcinoma de próstata" se refiere a tejido de próstata que comprende células malignas de carcinoma de próstata.

El término "tejido no maligno" se refiere a tejido de próstata que no comprende células malignas de carcinoma de próstata.

En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicha referencia deriva de un tejido conocido maligno de carcinoma de próstata o varios tejidos conocidos malignos de próstata. Preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de tejido de prueba y la referencia es indicativa de un tejido maligno de carcinoma de próstata, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un tejido no maligno.

En otra realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicha referencia deriva de un tejido conocido no maligno de próstata. Preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de tejido de prueba y la referencia es indicativa de un tejido no maligno, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un tejido maligno de carcinoma de próstata.

En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicho procedimiento comprende además la etapa de recomendar una medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente para el sujeto basándose en si la muestra de tejido de prueba del sujeto se identifica como tejido maligno de carcinoma de próstata o tejido no maligno.

Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios que subyacen a la presente divulgación que los metabolitos anteriormente mencionados de la Tabla 4 son discriminantes fiables y eficientes de tejido maligno de carcinoma de próstata frente a tejido no maligno en el mismo individuo. Así, la invención puede ayudar a decidir sobre el grado de la prostatectomía durante las medidas de cirugía o se puede usar durante los enfoques de cribado de alta resolución.

En principio, la divulgación también engloba el uso de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 4 o un agente de detección para el mismo para diferenciar en una muestra de tejido de un sujeto que padece carcinoma de próstata entre un tejido maligno de carcinoma de próstata y un tejido no maligno. Se engloba además el uso de al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 4 o un agente de detección para el mismo para la fabricación de una composición de diagnóstico o farmacéutica para diferenciar en una muestra de tejido de un sujeto que padece carcinoma de próstata entre un tejido maligno de carcinoma de próstata y un tejido no maligno.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento de diagnóstico de carcinoma de próstata metastatizante que comprende

- (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito en una muestra de prueba de un sujeto que padece dicho carcinoma de próstata, en el que dicho metabolito se selecciona del grupo que consiste en: ácido aminoacético, ácido cerebrónico, ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo, 7-metilguanina, ácido tricosanoico y

glicerofosfoetanolamina, fracción polar; y

(b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diagnostica el carcinoma de próstata metastatizante.

5 En el contexto de la presente divulgación, el marcador glicerofosfoetanolamina se determina, preferentemente, en la fracción polar.

El término "carcinoma de próstata metastatizante" se refiere a carcinoma de próstata de estadio avanzado que tiene células capaces de formar metástasis fuera de la próstata. Normalmente, las metástasis de los carcinomas de próstata se esperarán preferencialmente en los ganglios linfáticos o los huesos.

10 En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que padecen carcinoma de próstata metastatizante. Preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de carcinoma de próstata metastatizante, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un carcinoma de próstata no metastatizante.

15 En otra realización preferida del procedimiento del procedimiento anteriormente mencionado, dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no padecen carcinoma de próstata metastatizante o es una referencia calculada. Preferentemente, una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de carcinoma de próstata no metastatizante, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un carcinoma de próstata metastatizante.

20 En una realización preferida del procedimiento anteriormente mencionado, dicho procedimiento comprende además la etapa de recomendar una medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente para el sujeto basándose en si el sujeto se diagnostica con carcinoma de próstata metastatizante o no metastatizante.

25 Ventajosamente, se ha encontrado en los estudios que subyacen a la presente divulgación que pacientes que muestran una cantidad particularmente alta de uno cualquiera de los metabolitos específicos anteriormente mencionados deben padecen carcinoma de próstata metastatizante. Gracias a la presente divulgación, es posible identificar los sujetos y aplicarles medidas terapéuticas o de gestión sanitaria del paciente especiales. Por ejemplo, los pacientes se deben investigar más estrechamente para metástasis en, por ejemplo, los huesos y los ganglios linfáticos.

30 La presente divulgación, en principio, también se refiere al uso de al menos un biomarcador o un agente de detección para el mismo para diagnosticar carcinoma de próstata metastatizante en una muestra de un sujeto que se sospecha que lo padece, en la que dicho al menos un metabolito se selecciona del grupo que consiste en: ácido aminoadípico, ácido cerebrónico, ácido 2-hidroxihehénico, pirofosfato de isopentenilo, 7-metilguanina, ácido tricosanoico y glicerofosfoetanolamina (preferentemente, determinados en la fracción polar). Se engloba además el uso de al menos un biomarcador o un agente de detección para el mismo para la fabricación de una composición de diagnóstico o farmacéutica para diagnosticar carcinoma de próstata metastatizante en una muestra de un sujeto que se sospecha que lo padece, en la que dicho al menos un metabolito se selecciona del grupo que consiste en: ácido aminoadípico, ácido cerebrónico, ácido 2-hidroxihehénico, pirofosfato de isopentenilo, 7-metilguanina, ácido tricosanoico y glicerofosfoetanolamina (preferentemente, determinados en la fracción polar).

40 La presente divulgación proporciona un dispositivo para diagnosticar si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección para al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 2 o ácido 2-hidroxihehénico, pirofosfato de isopentenilo o 7-metilguanina, dispuesta, preferentemente, con un detector de forma que se pueda determinar la cantidad de dicho al menos un metabolito en una muestra de tejido; y

45 b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos y una base de datos con una referencia guardada, preferentemente, como se han definido anteriormente, en el que la unidad de evaluación ha incorporado tangiblemente un algoritmo que lleva a cabo una comparación como se ha definido anteriormente entre la cantidad determinada para el al menos un metabolito recibido de la unidad de análisis y la referencia guardada.

50 Un dispositivo, como se usa en el presente documento, debe comprender al menos las unidades anteriormente mencionadas. Las unidades del dispositivo se unen operativamente entre sí. Cómo conectar los medios en un modo de funcionamiento dependerá del tipo de unidades incluidas en el dispositivo. Por ejemplo, cuando el detector permite la determinación cualitativa o cuantitativa automática del biomarcador, los datos obtenidos por dicha unidad de análisis de funcionamiento automático se pueden procesar por, por ejemplo, un programa informático con el fin de facilitar la evaluación en la unidad de evaluación. Preferentemente, las unidades comprenden un único dispositivo

55 en tal caso. Dicho dispositivo puede incluir, por consiguiente, una unidad de análisis para el biomarcador y un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos como unidad de evaluación para procesar los datos resultantes para la evaluación y para guardar la información de salida. Los dispositivos preferidos son los que se pueden aplicar

sin el conocimiento particular de un profesional clínico especializado, por ejemplo, dispositivos electrónicos que simplemente requieren la carga con una muestra. La información de salida del dispositivo es, preferentemente, un valor numérico que permite sacar conclusiones sobre la presencia o ausencia de una enfermedad o afección y así es una ayuda para el diagnóstico. Más preferentemente, la información de salida es un diagnóstico preliminar o una ayuda para el diagnóstico basada en el valor numérico anteriormente mencionado, es decir, un clasificador que indica si el sujeto muestra una enfermedad o afección, o no. Dicho diagnóstico preliminar puede necesitar la evaluación de información adicional que se puede proporcionar en el dispositivo de la invención que incluye un sistema de base de datos de conocimiento experto.

Una referencia preferida que se van a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente invención es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía. En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

Otra referencia preferida que se va a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente invención es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía. En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

Se entenderá que el dispositivo anteriormente mencionado se puede usar para muestras que se han obtenido antes o después de prostatectomía. Si se va a analizar una muestra obtenida antes de la prostatectomía, preferentemente, la referencia es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos como se especificó anteriormente que también se encontró antes de la prostatectomía en dicho sujeto o grupo de sujetos. Si se va a analizar una muestra obtenida después de prostatectomía, preferentemente, la referencia es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos como se especificó anteriormente que también se encontró después de prostatectomía en dicho sujeto o grupo de sujetos.

Si se va a usar una muestra obtenida antes de la prostatectomía, el dispositivo también se puede usar para decidir si la prostatectomía se debe llevar a cabo en un paciente, o no.

Las unidades del dispositivo se pueden implementar, también preferentemente, en un sistema que comprende varios dispositivos que se unen operativamente entre sí. Dependiendo de las unidades que se van a usar para el sistema de la presente invención, dichos medios se pueden unir funcionalmente conectando cada medio con el otro por medios que permiten el transporte de datos entre dichos medios, por ejemplo, cables de fibra de vidrio, y otros cables para el transporte de datos de alto rendimiento. Sin embargo, también se prevé por la presente invención la transferencia de datos inalámbrica entre los medios, por ejemplo, mediante LAN (LAN inalámbrica, W-LAN). Un sistema preferido comprende medios para determinar biomarcadores. Los medios para determinar los biomarcadores, como se usa en el presente documento, engloban medios para separar biomarcadores, tales como dispositivos cromatográficos, y medios para la determinación de metabolitos, tales como dispositivos de espectrometría de masas. Se han descrito con detalle anteriormente dispositivos adecuados. Los medios preferidos para la separación de compuestos que se van a usar en el sistema de la presente invención incluyen dispositivos cromatográficos, más preferentemente dispositivos para cromatografía de líquidos, HPLC y/o cromatografía de gases. Los dispositivos preferidos para la determinación de compuestos comprenden dispositivos de espectrometría de masas, más preferentemente, CG-EM, CL-EM, espectrometría de masas de infusión directa, EM-ICR-TF, EC-EM, HPCL-EM, espectrometría de masas de cuadrupolo, espectrometría de masas secuencialmente acoplada (que incluye EM-EM o EM-EM-EM), EM-ICP, EM-Pi o TOF. Los medios de separación y determinación se acoplan, preferentemente, entre sí. Más preferentemente, se usan CL-EM y/o CG-EM en el sistema de la presente invención como se describe con detalle en cualquier parte en la memoria descriptiva. Otros comprendidos deben ser medios para comparar y/o analizar los resultados obtenidos de los medios para la determinación de biomarcadores. Los medios para comparar y/o analizar los resultados pueden comprender al menos una base de datos y un programa informático implementado para la comparación de los resultados. Las realizaciones preferidas de los sistemas y dispositivos anteriormente mencionados también se describen con detalle a continuación.

La divulgación proporciona además un dispositivo para diferenciar entre un tejido maligno de carcinoma de próstata y un tejido no maligno que comprende:

- a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección para al menos un metabolito seleccionado de la Tabla 4, dispuesta, preferentemente, con un detector de forma que se pueda determinar la cantidad del dicho al menos un metabolito en una muestra de tejido; y
- b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos y una base de datos con una referencia

guardada, preferentemente, como se ha definido anteriormente, en el que la unidad de evaluación tiene tangiblemente incorporada un algoritmo que lleva a cabo una comparación como se ha definido anteriormente entre la cantidad determinada para el al menos un metabolito recibido de la unidad de análisis y la referencia guardada.

5 Una referencia preferida que se va a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente invención es una cantidad derivada de un tejido no maligno conocido. En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de tejido de prueba y la referencia es indicativa de un tejido no maligno, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un tejido maligno de carcinoma de próstata.

10 Otra referencia preferida que se va a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente divulgación es una cantidad derivada de un tejido maligno de carcinoma de próstata conocido.

En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de tejido de prueba y la referencia es indicativa de un tejido maligno de carcinoma de próstata, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un tejido no maligno

15 Además, se proporciona un dispositivo para diagnosticar carcinoma de próstata metastatizante que comprende:

20 a) una unidad de análisis que comprende un agente de detección para al menos un metabolito seleccionado del grupo que consiste en: ácido aminoadípico, ácido cerebrónico, ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo, 7-metilguanina, ácido tricosanoico y glicerofosfoetanolamina, preferentemente determinado en la fracción polar, dispuesto con un detector de forma que se pueda determinar la cantidad del dicho al menos un metabolito en una muestra de tejido; y

25 b) una unidad de evaluación que comprende un procesador de datos y una base de datos con una referencia guardada, preferentemente, como se define en cualquier parte en el presente documento, en el que la unidad de evaluación tiene tangiblemente incorporada un algoritmo que lleva a cabo una comparación como se expone en cualquier parte en el presente documento entre la cantidad determinada para el al menos un metabolito recibido de la unidad de análisis y la referencia guardada.

30 Una referencia preferida que se va a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente divulgación es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que padecen carcinoma de próstata metastatizante. En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de carcinoma de próstata metastatizante, mientras que una cantidad en la muestra de tejido de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un carcinoma de próstata no metastatizante.

35 Otra referencia preferida que se va a usar como referencia guardada según el dispositivo de la presente invención es una cantidad derivada de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no padecen carcinoma de próstata metastatizante o es una referencia calculada. En tal caso, el algoritmo tangiblemente incorporado compara, preferentemente, la cantidad determinada para el al menos un biomarcador con la referencia, en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de carcinoma de próstata no metastatizante, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un carcinoma de próstata metastatizante.

40 A continuación, se detallan algunas realizaciones adicionales de la invención que incluyen también realizaciones preferidas de las anteriores.

45 La presente divulgación se refiere en general a un conjunto de datos que comprende valores característicos de al menos un metabolito que es indicativo de una enfermedad o afección referida en el presente documento.

El término "conjunto de datos" se refiere a un conjunto de datos que se pueden agrupar juntos física y/o lógicamente. Por consiguiente, el conjunto de datos se puede implementar en un único medio de almacenamiento de datos o en medios de almacenamiento de datos físicamente separados que se unen operativamente entre sí. Preferentemente, el conjunto de datos se implementa por medio de una base de datos. Así, una base de datos como se usa en el presente documento comprende el conjunto de datos en un medio de almacenamiento adecuado. Además, la base de datos comprende, preferentemente, además un sistema de gestión de la base de datos. El sistema de gestión de la base de datos es, preferentemente, un sistema de gestión de la base de datos basado en red, jerárquico y orientado a objetos. Además, la base de datos puede ser una base de datos federal o integrada. Más preferentemente, la base de datos se implementará como un sistema distribuido (federal), por ejemplo, como un sistema cliente-servidor. Más preferentemente, la base de datos se estructura para permitir que un algoritmo de búsqueda compare un conjunto de datos de prueba con los conjuntos de datos comprendidos por el conjunto de datos. Específicamente, usando dicho algoritmo, se pueden buscar en la base de datos conjuntos de datos similares o idénticos que son indicativos de carcinoma de próstata o una predisposición para el mismo (por ejemplo, una búsqueda de consultas). Así, si se puede identificar un conjunto de datos idéntico o similar en el conjunto de datos, el conjunto de datos de prueba se asociará con carcinomas de próstata o una predisposición para los mismos o la

progresión de carcinoma de próstata. Por consiguiente, la información obtenida del conjunto de datos se puede usar para el diagnóstico de carcinomas de próstata o una predisposición para los mismos basándose en un conjunto de datos de prueba obtenido de un sujeto. Más preferentemente, el conjunto de datos comprende valores característicos de todos los metabolitos comprendidos por uno cualquiera de los grupos citados anteriormente.

5 En vista de lo anterior, la presente divulgación engloba un medio de almacenamiento de datos que comprende el conjunto de datos anteriormente mencionado.

El término "medio de almacenamiento de datos", como se usa en el presente documento, engloba medios de almacenamiento de datos que se basan en entidades físicas individuales tales como un CD, un CD-ROM, un disco duro, medios de almacenamiento óptico, o un disquete. Además, el término incluye además medios de almacenamiento de datos que consisten en entidades físicamente separadas que se unen operativamente entre sí de un modo para proporcionar el conjunto de datos anteriormente mencionado, preferentemente, en una forma adecuada para una búsqueda de consultas.

La presente divulgación también se refiere a un sistema que comprende:

- 15 (a) medios para comparar valores característicos de metabolitos de una muestra operativamente unida a
(b) un medio de almacenamiento de datos como se ha descrito anteriormente.

El término "sistema", como se usa en el presente documento, se refiere a diferentes medios que se unen operativamente entre sí. Dichos medios se pueden implementar en un único dispositivo o pueden ser dispositivos físicamente separados que se unen operativamente entre sí. Los medios para comparar valores característicos de metabolitos funcionan, preferentemente, basándose en un algoritmo para la comparación como se mencionó antes. El medio de almacenamiento de datos comprende, preferentemente, el conjunto de datos o base de datos anteriormente mencionado, en el que cada uno de los conjuntos de datos almacenados es indicativo de carcinomas de próstata o una predisposición para los mismos. Así, el sistema de la presente divulgación permite identificar si un conjunto de datos de prueba está comprendido por el conjunto de datos guardado en el medio de almacenamiento de datos. Por consiguiente, el sistema de la presente divulgación se puede aplicar como medios de diagnóstico en el diagnóstico de carcinomas de próstata o una predisposición o progresión de los mismos.

En una realización preferida del sistema, están comprendidos medios para determinar valores característicos de metabolitos de una muestra.

El término "medios para determinar valores característicos de metabolitos" se refiere preferentemente a los dispositivos anteriormente mencionados para la determinación de metabolitos, tales como dispositivos de espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos.

Además, la presente divulgación se refiere a un medio de diagnóstico que comprende medios para la determinación de al menos un metabolito seleccionado de uno cualquiera de los grupos referidos anteriormente. El término "medio de diagnóstico" se refiere, preferentemente, a un dispositivo de diagnóstico, sistema o ensayo biológico o químico como se especifica en cualquier parte en la descripción con detalle.

La expresión "medios para la determinación de al menos un metabolito" se refiere a dispositivos o agentes que pueden reconocer específicamente el metabolito. Los dispositivos adecuados pueden ser dispositivos espectrométricos tales como espectrometría de masas, dispositivos de RMN o dispositivos para llevar a cabo ensayos químicos o biológicos para los metabolitos. Los agentes adecuados pueden ser compuestos que detectan específicamente los metabolitos. La detección, como se usa en el presente documento, puede ser un proceso de dos etapas, es decir, el compuesto se puede unir primero específicamente al metabolito que va a detectarse y posteriormente generar una señal detectable, por ejemplo, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radiactivas y similares. Para la generación de la señal detectable se pueden requerir compuestos adicionales que están todos comprendidos por el término "medios para la determinación del al menos un metabolito". Los compuestos que se unen específicamente al metabolito se describen en cualquier parte en la memoria descriptiva con detalle e incluyen, preferentemente, enzimas, anticuerpos, ligandos, receptores u otras moléculas biológicas o sustancias químicas que se unen específicamente a los metabolitos. En una realización preferida, la señal detectable también representa una señal cuantificable, que significa que la intensidad relativa del al menos un metabolito es proporcional a la intensidad relativa de la señal detectable.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición de diagnóstico que comprende al menos un metabolito seleccionado de uno cualquiera de los grupos referidos anteriormente.

Además, la presente divulgación se refiere a una composición de diagnóstico que comprende al menos un agente de detección para al menos un metabolito seleccionado de uno cualquiera de los grupos referidos anteriormente. El al menos un metabolito seleccionado de cualquiera de los grupos anteriormente mencionados servirá de biomarcador, es decir, una molécula indicadora para una afección patológica o predisposición en el sujeto, es decir, carcinomas de próstata o una predisposición para los mismos. Así, los propios metabolitos pueden servir de composiciones de diagnóstico, preferentemente, tras la visualización o detección por los medios referidos en el presente documento. Así, una composición de diagnóstico que indica la presencia de un metabolito según la presente invención también puede comprender dicho biomarcador físicamente, por ejemplo, un complejo de un anticuerpo y el metabolito que va

a detectarse puede servir de composición de diagnóstico. Por consiguiente, la composición de diagnóstico puede comprender además medios para la detección de los metabolitos como se especifica en cualquier parte en esta descripción. Alternativamente, si se usan medios de detección tales como las técnicas basadas en EM o RMN, la especie molecular que sirve de indicador para la afección patológica será el al menos un metabolito comprendido por la muestra de prueba que se va a investigar. Así, el al menos un metabolito referido según la presente divulgación debe servir él mismo de composición de diagnóstico debido a su identificación como biomarcador.

Figuras

La Fig. 1 muestra metabolitos en muestras emparejadas de prostatectomía malignas y no malignas (eje y: cantidad relativa del metabolito normalizada con un conjunto de referencia). Se probaron las diferencias por la prueba de Wilcoxon de pares emparejados. Debido a la ausencia de valores como se mencionó en el texto, hubo entre 83 y 93 pares emparejados completos de muestras de la cohorte total de 95 pacientes. Las muestras emparejadas evaluadas en realidad para cada metabolito se indican en la figura respectiva entre paréntesis.

La Fig. 2 muestra las curvas de Kaplan-Meier para el tiempo bioquímico sin recaída después de cirugía por (A) estadio patológico de tumor, (B) puntuación de Gleason, y niveles de (C) ácido aminoacético, (D) ácido glucónico, (E) maltotriosa (F) glicerofosfoetanolamina, (G) ácido tricosanoico y (H) ácido cerebrónico. La estratificación de los metabolitos correspondió a los datos dados en la Tabla 5.

Ejemplos

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos que no pretenden restringir o limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Determinación de metabolitos

Pacientes y muestras de tejido

Se tomaron tejido tumoral y tejido normal adyacente emparejado de especímenes de próstata inmediatamente crioconservados en nitrógeno líquido después de prostatectomía radical entre 2001 y 2007. Para este estudio retrospectivo, la selección de muestras de 95 hombres con carcinoma de próstata sin tratar antes de la cirugía se hizo según la disponibilidad de tejidos crioconservados y la completitud de los datos de seguimiento basándose en el cálculo del tamaño de muestra como se menciona más adelante. El estudio fue autorizado por la cámara de ética local y se obtuvo el consentimiento informado del paciente. Se describieron previamente los detalles metódicos para obtener tejido tumoral puro (>90 %) y tejido normal adyacente emparejado (véase el documento WO2010/139711). Para cada paciente, se compiló información clinicopatológica sobre la edad, volumen de próstata, PSA preoperatoria, clasificación tumoral según el sistema UICC 2002 TNM, grado del tumor de Gleason basado en el espécimen completo y concentraciones de PSA durante el seguimiento posoperatorio (Tabla 1).

Medición de metabolitos y PSA

Todos los metabolitos se midieron en el marco de un estudio global de perfilado de metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masas y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas. Se prepararon las muestras recogidas como se describe en el capítulo previo y se sometieron a perfilado de metabolitos por análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM/EM). Se extrajo material de tejido liofilizado con disolventes polares (agua) y no polares (etanol/diclorometano/acetonitrilo). El extracto se fraccionó en una fase polar acuosa (fracción polar) y una fase lipófila orgánica (fracción lipídica). Para análisis de CG-EM, la fracción lipídica se trató con metanol en condiciones ácidas para los ésteres metílicos de ácidos grasos derivados de tanto ácidos grasos libres como lípidos complejos hidrolizados. Además, se cuantificaron los componentes del esqueleto lipídico (es decir, glicerol) en la fase no polar (que lleva el término "fracción lipídica" después del nombre de metabolito). Por ejemplo, "glicerol, fracción lipídica" representa glicerol liberado de lípidos complejos - a diferencia, "glicerol, fracción polar" representa glicerol presente originalmente en la polar fase de la muestra biológica. Se derivatizaron adicionalmente las fracciones polares y lipídicas con clorhidrato de O-metil-hidroxilamina (20 mg/ml en piridina, 50 µl) para convertir los grupos oxo en O-metiloximas y posteriormente con un agente silylante (MSTFA, 50 µl) antes de CG-EM. Para los análisis de CL-EM/EM, ambas fracciones se reconstituyeron en mezclas de disolventes apropiadas. Se realizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por elución en gradiente usando metanol/agua/ácido fórmico sobre columnas de separación de fase inversa. Se aplicó tecnología de detección espectrométrica de masas como se describe en la patente US 7196323, que permite el perfilado por "Monitorización de reacciones múltiples" de sensibilidad dirigida y alta en paralelo al análisis de cribado completo. Se analizaron las muestras de tejido en diseño de secuencia analítica semi-aleatorizado (las muestras de cada sujeto se analizaron en ranuras posteriores, sujetos y secuencia de tejido aleatorizado) con muestras reunidas (= "conjunto") generadas de muestras adicionales proporcionadas para este fin. Los datos de picos sin procesar se normalizaron a la mediana del conjunto por secuencia analítica para explicar la variabilidad del proceso (denominadas "relaciones frente a conjunto"). Esta unidad arbitraria calculada se relacionó con el peso de tejido y dio como resultado la unidad arbitraria de especificación/mg de peso húmedo de tejido. Se realizó un control de calidad riguroso al nivel de pico, analito y muestra. Dentro de cada secuencia analítica, se representaron las señales de los patrones internos en diagramas de control. Se invalidaron

las muestras que presentaron >30 % de desviación estándar de uno de los patrones internos. Se identificaron los picos de valores atípicos al nivel de grupo (tejido de carcinoma, tejido de control) por análisis de diagrama de cajas, se comprobaron manualmente para la correcta anotación e integración y, si fuera necesario, se corrigieron manualmente. Picos con abundancia de metabolito muy baja que no permitieron la integración fiable de picos o que no cumplieron los requisitos del índice de tiempo de retención se convirtieron en valores ausentes. Este procedimiento explica los diferentes valores ausentes para los diversos analitos en las 95 muestras evaluadas en este estudio. Se normalizaron los valores de metabolitos al peso de cada muestra, así como a la mediana de muestras de referencia derivadas de un conjunto generado de muestras de tejido de próstata separadas. Así, todos los datos de metabolitos se presentaron como unidades arbitrarias relacionadas con estas muestras de referencia.

10 Se realizaron determinaciones de PSA en un analizador Elecsys (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Evaluación de resultados

15 Se evaluó la validez diagnóstica de los metabolitos con respecto a su capacidad para discriminar entre tumor y tejido normal. Se aplicaron análisis de eficacia diagnóstica (ROC) y regresión logística binaria, y se calcularon las áreas bajo las curvas (ABC), sensibilidad, especificidad y tasas de clasificación correcta total. Se evaluó el potencial pronóstico de los metabolitos para predecir la recaída tumoral después de cirugía. El criterio de valoración primario fue la supervivencia sin recaída, como se mide desde la fecha de la cirugía hasta el último seguimiento o el primer valor de PSA posoperatorio de >0,2 ng/ml, confirmado por posteriores valores ascendentes tras un nivel de PSA indetectable (<0,04 ng/ml) después de la cirugía.

Análisis estadísticos

20 Se usaron los paquetes de software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.), SPSS Statistics 19 (IBM, Chicago, IL, EE.UU.) y MedCalc 12.3.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Se realizaron la prueba de la U de Mann-Whitney, la prueba de Wilcoxon de pares emparejados, la correlación de rangos de Spearman, la prueba de la chi al cuadrado, los análisis de Kaplan-Meier, regresiones de Cox univariante y multivariante y análisis de ROC. Se usó el módulo de muestreo con reposición de SPSS. Se usó el módulo de "valor ausente" de SPSS para analizar la estructura de valores ausentes usando la prueba de MCAR de Little.

Ejemplo 2: Evaluación de los biomarcadores en pacientes

Características de pacientes

30 Se investigaron noventa y cinco pacientes con CP en este estudio (Tabla 1). Dentro de una mediana de seguimiento de 52 meses, 74 hombres estuvieron libres de recaída y 21 sufrieron recaída del tumor. Hubo algunos valores ausentes de metabolitos debido a motivos técnicos (Tabla 2). La prueba de MCAR de Little demostró que los valores ausentes fueron completamente al azar ($p=0,140$). Esta condición permite cálculos con un análisis de casos completos de datos o aplicación de procedimientos de imputación únicos para sustituir valores ausentes. Los presentes inventores usaron ambos enfoques y los mencionan en los sitios apropiados.

Tabla 1: Características clínicas del grupo de estudio.^a

Características	Total	Sin recaída	Recaída	valor de p
Número	95	74	21	
Edad, años				0,559 ^b
Mediana (IC del 95 %)	64 (62,5-65)	64 (62,1-65)	64 (61,6-65)	
Intervalo	46-73	46-73	46-71	
PSA preoperatorio, ng/ml				0,701 ^b
Mediana (IC del 95 %)	7,5 (6,7-8,6)	7,5 (6,5-9,0)	7,5 (5,9-12,4)	
Intervalo	1,7-41,9	1,8-41,9	1,7-34,9	
% de PSAI preoperatorio				0,472 ^b
Mediana (IC del 95 %)	8,6 (7,4-10,0)	8,2 (7,0-10,3)	9,1 (7,3-13,9)	
Intervalo	2,8-45,3	2,8-45,3	3,2-18,3	
Volumen de próstata, cm ³				0,879 ^b

35

Características	(continuación)			valor de p
	Total	Sin recaída	Recaída	
Mediana (IC del 95 %)	32 (30-35)	32 (28-35)	35 (25-40)	
Intervalo	13-98	15-98	13-92	
Nº de estadio patológico (%)				<0,0003 ^c
pT2a	4 (4)	4 (5)		
pT2b	15 (16)	12 (16)	3 (14)	
pT2c	42 (44)	40 (54)	2 (10)	
pT3a	28 (29)	15 (20)	13 (62)	
pT3b	6 (6)	3(4)	3 (14)	
Nº de puntuación de Gleason (%)				<0,0001 ^c
5	6 (6)	6 (8)	-	
6	24 (25)	23 (31)	1 (5)	
7	41 (43)	35 (47)	6 (28)	
8	13 (14)	5 (7)	8 (38)	
9	10 (11)	5(7)	5(24)	
10	1 (1)	-	1 (5)	
Seguimiento, meses				<0,0001 ^b
Mediana (IC del 95 %)	52,1 (46,1-56,8)	55,5 (50,4-66,2)	23,4 (10,9-42,3)	
Intervalo	0,6-114	8,3-114	0,6-105,2	

IC: intervalo de confianza; PSA: antígeno prostático específico; % de PSAI: porcentaje de relación de PSA libre con respecto a total.

^a Se dan valores como medianas con IC del 95 % entre paréntesis e intervalos o números de pacientes con porcentajes en paréntesis.

^b Significancias entre sin recaída y recaída probada por la prueba de la *U* de Mann-Whitney .

^c Significancias entre sin recaída y recaída probada por la prueba de la chi al cuadrado.

Tabla 2: Datos disponibles de metabolito en los subgrupos de pacientes sin y con recaída tras la prostatectomía radical

Metabolito	Número de pacientes con datos disponibles de metabolitos		
	Grupo total	Pacientes sin recaída	Pacientes con recaída
	n=95 (100 %)	n=74 (100 %)	n=21 (100 %)
Ácido aminoadípico	93 (97,9)	72 (97,3)	21 (100)
	n=95 (100 %)	n=74 (100 %)	n=21 (100 %)
Ácido cerebrónico	87 (91,6)	68 (91,9)	19 (90,5)
Ácido glucónico	92 (96,8)	72 (97,3)	20 (95,2)
Glicerofosfoetanolamina	93 (97,9)	72 (97,3)	21 (100)
Maltotriosa	92 (96,8)	71 (95,9)	21 (100)

(continuación)

Número de pacientes con datos disponibles de metabolitos			
Ácido tricosanoico	86 (90,5)	67 (90,5)	19 (90,5)

Metabolitos en tejido de próstata maligno y no maligno

- 5 Se estableció el estudio de perfilado de metabolitos global en 107 muestras de tejido de par emparejado. Se detectaron un gran número de 822 analitos; se clasificaron 566 como "cualitativos" y se pudieron cuantificar 256 (161 conocidos, 95 desconocidos). Se excluyeron doce pacientes con seguimientos incompletos de este estudio de perfilado inicial de la evaluación posterior de datos. Para nueve de los principales metabolitos que pertenecen a diferentes clases metabólicas, concretamente ácido aminoadípico, ácido cerebrónico, ácido glucónico, glicerofosfo-etanolamina, ácido 2-hidroxi behénico, pirofosfato de isopentenilo, maltotriosa, 7-metilguanina y ácido tricosanoico, se encontraron diferencias significativas entre muestras de tejido no malignas y malignas, con concentraciones más altas en muestras tumorales, excepto el ácido glucónico y la maltotriosa, que tuvieron niveles más bajos en tumores (Figura 1). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los metabolitos dependientes de la puntuación de Gleason (<7 frente a ≥ 7 ; $p=0,089$ a $0,979$) o estadio de tumor (pT2 frente a pT3; $p=0,150$ a $0,887$) excepto por ácido glucónico ($p=0,021$; Tabla 3). La edad, PSA preoperatorio, el volumen de próstata, el estadio de tumor y la puntuación de Gleason no se correlacionaron significativamente ($p>0,05$) con ninguno de los metabolitos en las muestras tumorales.

Tabla 3A: Metabolitos en muestras de carcinoma dependiendo de la puntuación de Gleason.^a

Variable	Pacientes con puntuación de Gleason <7 ^b	Pacientes con puntuación de Gleason ≥ 7 ^b	valor de p^c
Ácido aminoadípico	1,20 (0,61 - 7,87) n=28	1,34 (0,22 - 8,56) n=65	0,802
Ácido cerebrónico	3,35 (0,65 - 18,3) n=26	6,14 (0,36 - 33,8) n=61	0,089
Ácido glucónico	0,81 (0,12 - 4,84) n=28	0,49 (0,09 - 6,44) n=64	0,157
Glicerofosfoetanolamina	1,68 (0,17 - 3,99) n=28	1,73 (0,11 - 9,31) n=65	0,782
Ácido 2-hidroxi behénico	4,45 (0,68 - 17,2) n=24	6,78 (0,14 - 38,2) n=59	0,178
Pirofosfato de isopentenilo	1,22 (0,35 - 2,65) n=30	1,18 (0,37 - 6,41) n=62	0,934
Maltotriosa	0,31 (0,04 - 5,08) n=28	0,21 (0,01 - 3,64) n=64	0,338
7-Metilguanina	1,47 (0,51 - 3,04) n=27	1,30 (0,50 - 5,88) n=62	0,979
Ácido tricosanoico	2,35 (0,76 - 5,65) n=25	2,99 (0,36 - 7,06) n=61	0,534

^a Los resultados de metabolitos se presentan como medianas (unidades arbitrarias) con IC 95 entre paréntesis.

^b El número de pacientes con datos de metabolitos disponibles se indican por n en la fila correspondiente.

^c Las significancias se probaron por la prueba de la U de Mann-Whitney.

20 Tabla 3B: Metabolitos en muestras de carcinoma dependiendo del estadio patológico.^a

Variable	Pacientes con pT2 ^b	Pacientes con pT3 ^b	valor de p^c
Ácido aminoadípico	1,23 (0,22 - 7,87) n=58	1,44 (0,29 - 8,56) n=35	0,247
Ácido cerebrónico	4,28 (0,36 - 33,8) n=52	6,14 (0,87 - 29,3) n=35	0,174
Ácido glucónico	0,81 (0,09 - 4,84) n=58	0,38 (0,12 - 6,44) n=34	0,021
Glicerofosfoetanolamina	1,70 (0,12 - 5,13) n=58	1,75 (0,11 - 9,31) n=35	0,887

(continuación)

Variable	Pacientes con pT2b	Pacientes con pT3b	valor de pc
Ácido 2 -hidroxibehénico	5,06 (0,14 - 38,2) n=50	6,85 (0,91 - 34,0) n=33	0,434
Pirofosfato de isopentenilo	1,11 (0,35 - 4,49) n=57	1,34 (0,37 - 6,41) n=35	0,269
Maltotriosa	0,29 (0,02 - 5,08) n=58	0,20 (0,01 - 1,86) n=34	0,150
7-Metilguanina	1,32 (0,50 - 5,56) n=55	1,41 (0,61 - 5,88) n=34	0,303
Ácido tricosanoico	2,65 (0,36 - 7,06) n=52	3,28 (0,63 - 6,71) n=34	0,268

^a Los resultados de metabolitos se presentan como medianas (unidades arbitrarias) con IC del 95 % entre paréntesis.

^b El número de pacientes con datos de metabolitos disponibles se indican por n en la fila correspondiente.

^c La significancias se probaron por la prueba de la *U* de Mann-Whitney.

Potencial discriminatorio de metabolitos entre tejido maligno y no maligno

5 Las ABC de los análisis de ROC y las tasas de clasificación correcta determinaron, en correspondencia con los datos en la Figura 1A-H, el rendimiento de discriminación de todos los metabolitos para distinguir tejido maligno de no maligno (Tabla 4). Seis metabolitos mostraron ABC superiores a 0,75.

Tabla 4: Rendimiento de discriminación de metabolitos entre muestras de tejido maligno y no malignas de cáncer de próstata.

Metabolito ^a	ABC (IC del 95 %) ^b	Clasificación correcta (%)		
		No malignas	Malignas	Global
Ácido aminoadípico	0,69 (0,62 - 0,77)***	80	50	65
Ácido cerebrónico	0,84 (0,78 - 0,90)***	89	63	76
Ácido glucónico	0,61 (0,53 - 0,69)**	51	63	57
Glicerofosfoetanol-amina	0,76 (0,69 - 0,83)***	75	61	68
Ácido 2-hidroxibehénico	0,85 (0,80 - 0,91)***	86	66	76
Pirofosfato de isopentenilo	0,76 (0,70 - 0,83)***	84	60	72
Maltotriosa	0,66 (0,52 - 0,81)*	40	76	58
7-Metilguanina	0,77 (0,69 - 0,84)***	79	59	69
Ácido tricosanoico	0,86 (0,81 - 0,92)***	87	67	77
Combinaciones				
Todos los metabolitos ^c	0,88 (0,82 - 0,93)***	90	70	80
Ácido tricosanoico ^d	0,86 (0,81 - 0,92)***	87	67	77

ABC: área bajo la curva de eficacia diagnóstica; IC: intervalo de confianza.

^a Los análisis se realizaron con los conjuntos de datos disponibles para cada metabolito individual como se da en la Tabla 2 y solo con casos después del análisis de datos completos de casos con datos incompletos si se realizó regresión logística binaria.

^b Significativamente diferentes de ABC = 0,5: **p*<0,05; ***p*<0,001; ****p*<0,0001.

^c Predichos por regresión logística completa.

^d Predichos por regresión logística escalonada (eliminación directa o inversa; *p* de entrada =0,05, eliminación *p*=0,10).

Potencial pronóstico de metabolitos que predicen recaída tumoral

Los diferentes perfiles de metabolitos condujeron a los presentes inventores a evaluar sus posibilidades de predicción de recaída tumoral definida como recaída bioquímica tras la posterior prostatectomía radical. Primero, se calcularon curvas de Kaplan-Meier (Figura 2A-H). El intervalo libre de recaída fue significativamente más corto con el estadio de tumor creciente y la puntuación de Gleason; esta asociación demostró que el grupo de estudio de los presentes inventores era representativo (Figura 2A, B). Los análisis de Kaplan-Meier también fueron significativos para ácido aminoadípico, ácido glucónico y maltotriosa (Figura 2C-E, $p=0,004-0,030$) y para ácido tricosanoico, glicerofosfoetanolamina y ácido cerebrónico (Figura 2F-H, $p=0,079-0,168$), mientras que los otros tres metabolitos no se asociaron a recaída bioquímica ($p=0,252-0,806$). A continuación, se evaluaron los cinco factores clínico-patológicos y los metabolitos con respecto a su información de pronóstico en las regresiones de Cox (Tabla 5). Las razones de riesgos de los metabolitos en los análisis de regresión de Cox univariantes reflejaron los resultados de las curvas de Kaplan-Meier. Entonces, tanto los factores patológicos significativos (estadio de tumor, puntuación de Gleason) y los metabolitos (ácido aminoadípico, ácido glucónico y maltotriosa) de los análisis univariantes (Tabla 5) se evaluaron en los análisis de regresión de Cox multivariantes usando modelos completos y reducidos

Tabla 5: Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariantes y multivariantes del estadio de tumor, puntuación de Gleason y metabolitos de tejido en pacientes con cáncer de próstata con respecto al intervalo sin recaída después de prostatectomía radical.

Variable ^a	Razón de riesgos (IC del 95 %)	p
<u>Análisis univariante^b</u>		
Estadio de tumor (pT2 / pT3)	8,20 (2,77-24,3)	0,0002
Puntuación de Gleason (5+6/7/8+9+10)	4,63 (2,21-9,65)	0,0001
Edad (<65/≥65 años)	0,82 (0,34-1,96)	0,652
Antígeno específico de próstata (<11,7≥ ng/ml)	1,64 (0,65-4,10)	0,297
Ácido aminoadípico (<1,85≥); n=93	2,58 (1,10-6,09)	0,031
Ácido cerebrónico (<5,27≥); n=87	1,98 (0,75-5,21)	0,168
Ácido glucónico (<0,403≥); n=92	0,38 (0,16-0,94)	0,036
Glicerofosfoetanolamina (<1,15≥); n=93	2,20 (0,74-6,51)	0,157
Ácido 2-hidroxibehénico (<5,79≥); n=83	1,44 (0,57-3,66)	0,441
Pirofosfato de isopentenilo (<1,21≥); n=92	1,11 (0,47-2,63)	0,806
Maltotriosa (<0,129≥); n=92	0,29 (0,13-0,71)	0,006
7-Metilguanina (<1,00≥); n=89	1,80 (0,66-4,88)	0,252
Ácido tricosanoico (<4,14≥); n=86	2,31 (0,91-5,85)	0,079
<u>Análisis multivariante, modelo completo^c</u>		
Estadio de tumor	3,99 (1,10-14,5)	0,036
Puntuación de Gleason	2,25 (0,93-5,40)	0,071
Ácido aminoadípico	2,37 (0,93-6,02)	0,071
Ácido glucónico	0,81 (0,28-2,35)	0,704
Maltotriosa	0,62 (0,21-1,81)	0,384

^a Los criterios de clasificación se dan entre paréntesis. Se dicotomizaron los metabolitos usando sus valores (dados en unidades arbitrarias) obtenidos en el análisis de ROC como el punto de exactitud máxima para discriminar entre recaída/no recaída.

^b Se hicieron análisis univariantes usando los metabolitos con los datos disponibles para el metabolito respectivo indicado por "n" (véase también la Tabla 2), mientras que para las otras variables estuvieron disponibles datos completos para los 95 casos.

^c Modelo completo con variables individuales significativas de los análisis univariantes ($p < 0,05$). Se usó el enfoque de excluir casos con valores ausentes, el análisis de casos completos, con el resultado de que el análisis se realizó con el conjunto de datos completo de 92 pacientes como se indica en la Tabla 2.

Tabla 6: Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariantes y multivariantes usando casos con solo datos completos y con valores ausentes sustituidos por la imputación basada en regresión de valores.^a

Variable ^b	Análisis de casos con datos completos Razón de riesgos (IC del 95 %)	ρ	Análisis con valores ausentes sustituidos por imputación Razón de riesgos (IC del 95 %)	ρ
<u>Análisis univariante^c</u>				
Ácido aminoadípico (<1,85≥); n=93	2,58 (1,10-6,09)	0,031	3,06 (1,30-7,22)	0,011
Ácido cerebrónico (<5,27≥); n=87	1,98 (0,75-5,21)	0,168	1,95 (0,79-4,83)	0,150
Ácido glucónico (<0,403≥); n=92	0,38 (0,16-0,94)	0,036	0,39 (0,16-0,93)	0,034
Glicerofosfoetanolamina (<1,15≥); n=93	2,20 (0,74-6,51)	0,157	2,32 (0,79-6,90)	0,129
Ácido 2-hidroxi behénico (<5,79≥); n=83	1,44 (0,57-3,66)	0,441	1,55 (0,64-3,74)	0,330
Pirofosfato de isopentenilo (<1,21≥); n=92	1,11 (0,47-2,63)	0,806	1,05 (0,44-2,46)	0,918
Maltotriosa (<0,129≥); n=92	0,29 (0,13-0,71)	0,006	0,31 (0,13-0,74)	0,009
7-Metilguanina (<1,00≥); n=89	1,80 (0,66-4,88)	0,252	1,94 (0,72-5,28)	0,195
Ácido tricosanoico (<4,14≥); n=86	2,31 (0,91-5,85)	0,079	2,14 (0,87-5,29)	0,100
<u>Análisis multivariante, modelo completo^d</u>				
Estadio de tumor	3,99 (1,10-14,5)	0,036	3,65 (0,97-13,7)	0,056
Puntuación de Gleason	2,25 (0,93-5,40)	0,071	2,14 (0,89-5,17)	0,092
Ácido aminoadípico	2,37 (0,93-6,02)	0,071	2,26 (0,92-5,68)	0,077
Ácido glucónico	0,81 (0,28-2,35)	0,704	0,96 (0,32-2,91)	0,943
Maltotriosa	0,62 (0,21-1,81)	0,384	0,70 (0,23-2,17)	0,705

CI: intervalo de confianza.

^a Los valores ausentes se sustituyeron por valores imputados usando el procedimiento basado en residuos por regresión en el módulo de MVA de SPPS 19.

^b Los criterios de clasificación se dan entre paréntesis. Se dicotomizaron los metabolitos usando sus valores (dados en unidades arbitrarias) obtenidos en el análisis de ROC como el punto de exactitud máxima para discriminar entre recaída/no recaída.

^c Se hicieron análisis univariantes con los datos disponibles para el metabolito respectivo indicado por "n" (véase también la Tabla 2).

^d Modelo completo con variables individuales significativas de los análisis univariantes ($p < 0,05$). Se usó el enfoque de excluir casos con valores ausentes, el análisis de casos completos, con el resultado de que el análisis se realizó con un conjunto de datos completo de 92 pacientes como se indica en la Tabla 2.

5

Tabla 7: Metabolitos útiles en procedimientos de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente

NOMBRE_METABOLITO	Mediana de tejido con carcinoma con respecto a control	Valor de p de la prueba de la t para datos emparejados, bilateral	ABC de carcinoma frente a tejido sano
7-Metilguanina	1,55	0,0000	0,75
Ácido 2-hidroxi behénico	6,62	0,0000	0,85
Pirofosfato de isopentenilo	1,45	0,0000	0,75

Tabla 8: Metabolitos adicionales útiles en procedimientos de diagnóstico de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente

NOMBRE_METABOLITO	Mediana de tejido con carcinoma con respecto a control	Valor de p de la prueba de la t para datos emparejados bilateral	ABC de carcinoma frente a tejido sano
Ácido cerebrónico (2-OH-C24:0)	3,73	0,0000	0,82
Ácido 14-metilhexadecanoico	1,14	0,0000	0,62
Ácido 2-aminoadipínico	1,45	0,0000	0,68
Ceramida (d18:1, C24:1)	1,10	0,0011	0,60
Ácido eicosenoico (C20:cis[11]1)	1,55	0,0000	0,70
Ácido tricosanoico (C23:0)	2,99	0,0000	0,85
Ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02	1,53	0,0000	0,72
Arginina	1,18	0,0000	0,62
Ácido behénico (C22:0)	1,37	0,0000	0,69
beta-Caroteno	1,25	0,0000	0,60
Colestenol N° 02	1,33	0,0000	0,69
Citosina	1,14	0,0000	0,66
DAG (C18:1, C18:2)	1,04	0,0020	0,56
Dihidrocolesterol	1,35	0,0000	0,66
eritro-Dihidroesfingosina	1,12	0,0056	0,58
Ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6)	1,24	0,0000	0,65
Dodecanol	1,08	0,0323	0,57
Ácido eicosanoico (C20:0)	1,41	0,0000	0,68
Ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5)	1,20	0,0003	0,60
Ácido eicosatrienoico (C20:3)	1,20	0,0000	0,64
eritro-C16-Esfingosina	1,45	0,0000	0,69
Flavina adenina dinucleótido (FAD)	1,35	0,0000	0,69
gamma-Tocoferol	1,37	0,0000	0,67
Ácido glucónico	0,59	0,0002	0,62
Ácido glucurónico	0,67	0,0001	0,62
Glicerol-2-fosfato	1,48	0,0000	0,74
Ácido lignocérico (C24:0)	1,33	0,0000	0,68
Lisofosfatidilcolina (C18:2)	1,16	0,0000	0,62
Lisofosfatidilcolina (C20:4)	1,06	0,0007	0,57
Maltotriosa	0,54	0,0000	0,62

(continuación)

NOMBRE_METABOLITO	Mediana de tejido con carcinoma con respecto a control	Valor de p de la prueba de la t para datos emparejados bilateral	ABC de carcinoma frente a tejido sano
mio-Inositol, fracción lipídica	1,13	0,0007	0,63
mio-Inositol-2-fosfato, fracción lipídica (mio-inositolfosfolípidos)	1,44	0,0000	0,70
Ácido nervónico (C24:cis[15]1)	1,15	0,0002	0,62
Nicotinamida	1,13	0,0004	0,61
Pentadecanol	1,52	0,0000	0,75
Fosfatidilcolina (C18:0, C22:6)	0,88	0,0004	0,62
Fitoesfingosina	1,24	0,0002	0,64
Pseudouridina	1,10	0,0005	0,62
Piruvato	1,07	0,0004	0,60
3-O-Metilesfingosina	1,33	0,0001	0,67
treo-Esfingosina	1,33	0,0001	0,68
5-O-Metilesfingosina	1,30	0,0002	0,66
eritro-Esfingosina	1,32	0,0012	0,64
Esfingosina-1-fosfato	1,26	0,0005	0,65
Ácido treónico	1,17	0,0011	0,60
Homoserina	1,16	0,0000	0,66
Hipoxantina	1,71	0,0000	0,76
Lisina	1,29	0,0000	0,70
Ácido oleico (C18:cis[9]1)	1,33	0,0000	0,69

Tabla 9: Propiedades químicas/físicas de metabolitos seleccionados de la Tabla 8.

NOMBRE_METABOLITO	Características
5-O-Metilesfingosina	La 5-O-metilesfingosina presenta los siguientes fragmentos iónicos característicos cuando se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de la metanólisis con ácido y derivatización con 2 % de clorhidrato de O-metilhidroxilamina en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida: EM (EI, 70 eV): m/z (%): 250 (100), 73 (34), 251 (19), 354 (14), 355 (4), 442 (1).
Colestenol N° 02	El colesteno N° 02 representa un isómero de colesteno. Presenta los siguientes fragmentos iónicos característicos cuando se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de la metanólisis con ácido y derivatización con 2 % de clorhidrato de O-metilhidroxilamina en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida: EM (EI, 70 eV): m/z (%): 143 (100), 458 (91), 73 (68), 81 (62), 95 (36), 185 (23), 327 (23), 368 (20), 255 (15), 429 (15).

(continuación)

NOMBRE_METABOLITO	Características
3-O-Metilesfingosina	<p>La 3-O-metilesfingosina presenta los siguientes fragmentos iónicos característicos cuando se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de la metanólisis con ácido y derivatización con 2 % de clorhidrato de O-metilhidroxilamina en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida:</p> <p>EM (EI, 70 eV): m/z (%): 204 (100), 73 (18), 205 (16), 206 (7), 354 (4), 442 (1).</p>
Ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02	<p>El ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02 representa un isómero de ácido eicosadienoico. Presenta los siguientes fragmentos iónicos característicos cuando se detecta con CG/EM, aplicando espectrometría de masas de ionización por impacto electrónico (IE), después de la metanólisis con ácido y derivatización con 2 % de clorhidrato de O-metilhidroxilamina en piridina y posteriormente con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida:</p> <p>EM (EI, 70 eV): m/z (%): 81 (100), 57 (98), 43 (92), 67 (85), 41 (80), 55 (74), 82 (66), 95 (64), 110 (39), 109 (39).</p>

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

5 (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la lista que consiste en 7-metilguanina, ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo, ácido cerebrónico (2-OH-C24:0), ácido 14-metilhexadecanoico, ácido 2-aminoadipínico, ceramida (d18:1, C24:1), ácido eicosenoico (C20:cis[11]1), ácido tricosanoico (C23:0), ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02, arginina, ácido behénico (C22:0), beta-caroteno, colesteno N° 02, citosina, DAG (C18:1, C18:2), dihidrocolesterol, eritro-dihidroesfingosina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), dodecanol, ácido eicosanoico (C20:0), ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido eicosatrienoico (C20:3), eritro-C16-esfingosina, flavina adenina dinucleótido (FAD), gamma-tocoferol, ácido glucónico, ácido glucurónico, glicerol-2-fosfato, ácido lignocérico (C24:0), lisofosfatidilcolina (C18:2), lisofosfatidilcolina (C20:4), maltotriosa, mio-inositol (fracción lipídica), mio-inositol-2-fosfato (fracción lipídica, mio-inositolfosfolípidos), ácido nervónico (C24:cis[15]1), nicotinamida, pentadecanol, fosfatidilcolina (C18:0, C22:6), fitoesfingosina, pseudouridina, piruvato, 3-O-metilesfingosina, treo-esfingosina, 5-O-metilesfingosina, eritro-esfingosina, esfingosina-1-fosfato, ácido treónico, homoserina, hipoxantina, lisina, ácido oleico (C18:cis[9]1) y glicerofosfoetanolamina en una muestra de prueba de un sujeto antes de prostatectomía; y

20 (b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, en el que dicho al menos un metabolito comprende 7-metilguanina, y

21 en el que dicha muestra de prueba es una muestra de biopsia tomada antes de una prostatectomía planificada o el tejido extraído durante la propia prostatectomía.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, preferentemente en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es

25 indicativa de que un sujeto está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, preferentemente

30 en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho procedimiento comprende además la etapa de recomendar una medida terapéutica o de gestión sanitaria del paciente para el sujeto basándose en si el sujeto se diagnostica o no con que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

5. Un dispositivo que comprende una unidad de análisis y una unidad de evaluación

(i) para diagnosticar si un sujeto está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía,

40 a) en el que dicha unidad de análisis comprende un agente de detección para al menos un metabolito seleccionado de la lista que consiste en 7-metilguanina, ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo, ácido cerebrónico (2-OH-C24:0), ácido 14-metilhexadecanoico, ácido 2-aminoadipínico, ceramida (d18:1, C24:1), ácido eicosenoico (C20:cis[11]1), ácido tricosanoico (C23:0), ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02, arginina, ácido behénico (C22:0), beta-caroteno, colesteno N° 02, citosina, DAG (C18:1, C18:2), dihidrocolesterol, eritro-dihidroesfingosina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), dodecanol, ácido eicosanoico (C20:0), ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido eicosatrienoico (C20:3), eritro-C16-esfingosina, flavina adenina dinucleótido (FAD), gamma-tocoferol, ácido glucónico, ácido glucurónico, glicerol-2-fosfato, ácido lignocérico (C24:0), lisofosfatidilcolina (C18:2), lisofosfatidilcolina (C20:4), maltotriosa, mio-inositol (fracción lipídica), mio-inositol-2-fosfato (fracción lipídica, mio-inositolfosfolípidos), ácido nervónico (C24:cis[15]1), nicotinamida, pentadecanol, fosfatidilcolina (C18:0, C22:6), fitoesfingosina, pseudouridina, piruvato, 3-O-metilesfingosina, treo-esfingosina, 5-O-metilesfingosina, eritro-esfingosina, esfingosina-1-fosfato, ácido treónico, homoserina, hipoxantina, lisina, ácido oleico (C18:cis[9]1) y preferentemente, glicerofosfoetanolamina, dispuesta con un detector de forma que se pueda

55 b) en el que dicha unidad de evaluación comprende un procesador de datos y una base de datos con una referencia guardada como se define en la reivindicación 2 o 3, en el que la unidad de evaluación tiene tangiblemente incorporado un algoritmo que lleva a cabo una comparación según la reivindicación 2 o 3 entre la cantidad determinada para el al menos un metabolito recibido de la unidad de análisis y la referencia

guardada,

en el que dicho al menos un metabolito comprende 7-metilguanina.

5 6. Uso *in vitro* de al menos un biomarcador que comprende 7-metilguanina o un agente de detección para la misma para el diagnóstico en una muestra de un sujeto después o antes de la prostatectomía si dicho sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

7. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de si un sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía que comprende:

10 (a) determinar la cantidad de al menos un metabolito seleccionado de la lista que consiste en 7-metilguanina, ácido 2-hidroxibehénico, pirofosfato de isopentenilo, ácido cerebrónico (2-OH-C24:0), ácido 14-metilhexadecanoico, ácido 2-aminoadipínico, ceramida (d18:1, C24:1), ácido eicosenoico (C20:cis[11]1), ácido tricosanoico (C23:0), ácido eicosadienoico (C20:2) N° 02, arginina, ácido behénico (C22:0), beta-caroteno, colesteno N° 02, citosina, DAG (C18:1, C18:2), dihidrocolesterol, eritro-dihidroesfingosina, ácido docosahexaenoico (C22:cis[4,7,10,13,16,19]6), dodecanol, ácido eicosanoico (C20:0), ácido eicosapentaenoico (C20:cis[5,8,11,14,17]5), ácido eicosatrienoico (C20:3), eritro-C16-esfingosina, flavina adenina dinucleótido (FAD), gamma-tocoferol, ácido glucónico, ácido glucurónico, glicerol-2-fosfato, ácido lignocérico (C24:0), 15 lisofosfatidilcolina (C18:2), lisofosfatidilcolina (C20:4), maltotriosa, mio-inositol (fracción lipídica), mio-inositol-2-fosfato (fracción lipídica, mio-inositolfosfolípidos), ácido nervónico (C24:cis[15]1), nicotinamida, pentadecanol, fosfatidilcolina (C18:0, C22:6), fitoesfingosina, pseudouridina, piruvato, 3-O-metilesfingosina, treo-esfingosina, 5-O-metilesfingosina, eritro-esfingosina, esfingosina-1-fosfato, ácido treónico, homoserina, hipoxantina, lisina, ácido 20 oleico (C18:cis[9]1) y glicerofosfoetanolamina en una muestra de prueba de un sujeto después de prostatectomía; y

(b) comparar la cantidad determinada en la etapa (a) con una referencia, por lo cual se diagnostica si el sujeto está o no en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, en el que dicho al menos un metabolito comprende 7-metilguanina, y

25 en el que dicha muestra de prueba es una muestra de tejido de próstata que se sospecha que incluye o consiste esencialmente en células de carcinoma de próstata.

8. El procedimiento de la reivindicación 7,

30 (i) en el que dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, preferentemente en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía;

35 o
(ii) en el que dicha referencia deriva de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, preferentemente en el que una cantidad idéntica o similar para el al menos un metabolito en la muestra de prueba y la referencia es indicativa de un sujeto que no está en riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía, mientras que una cantidad en la muestra de prueba que se diferencia en comparación con la referencia es indicativa de un sujeto que está en 40 riesgo de carcinoma de próstata recurrente después de prostatectomía.

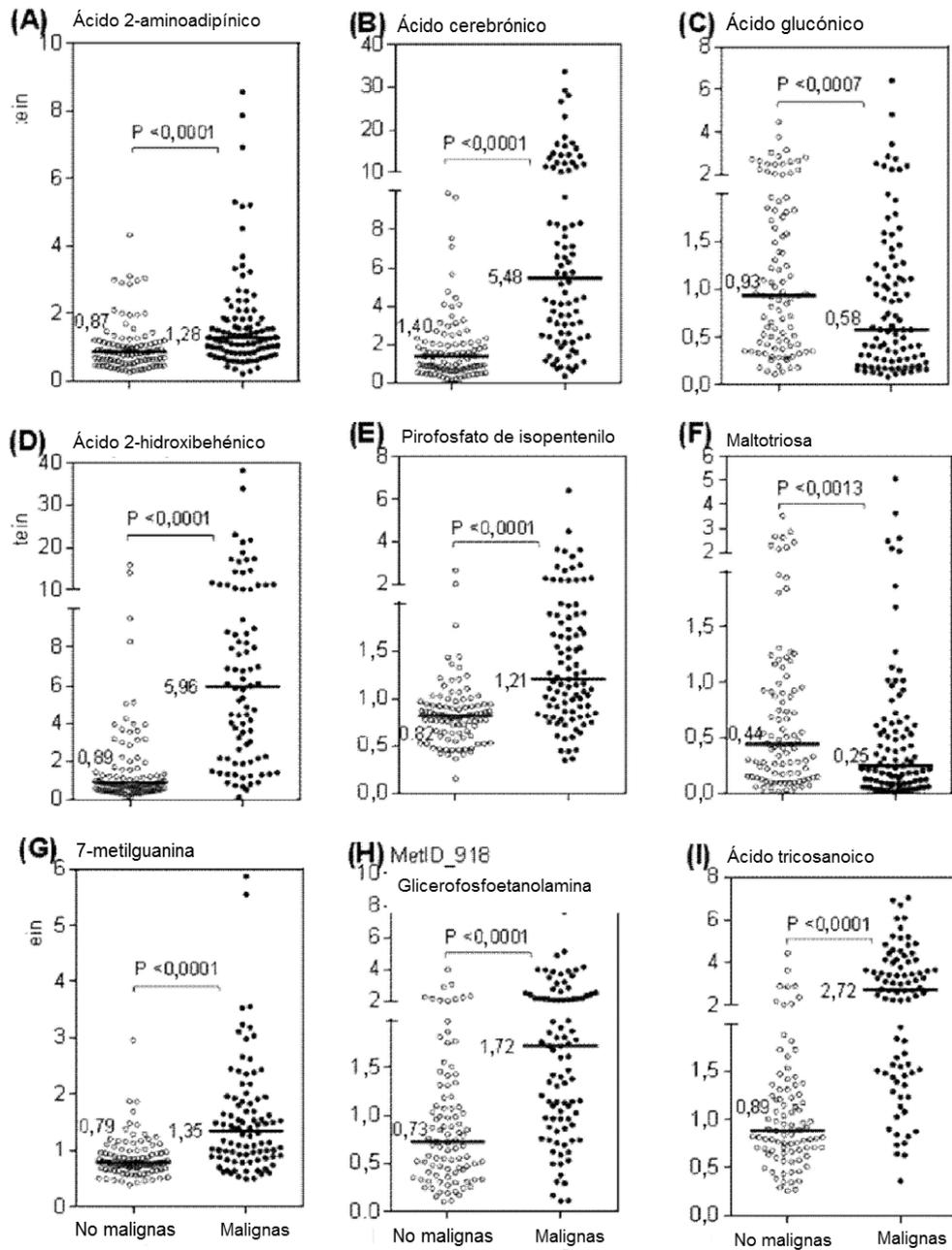


Figura 1

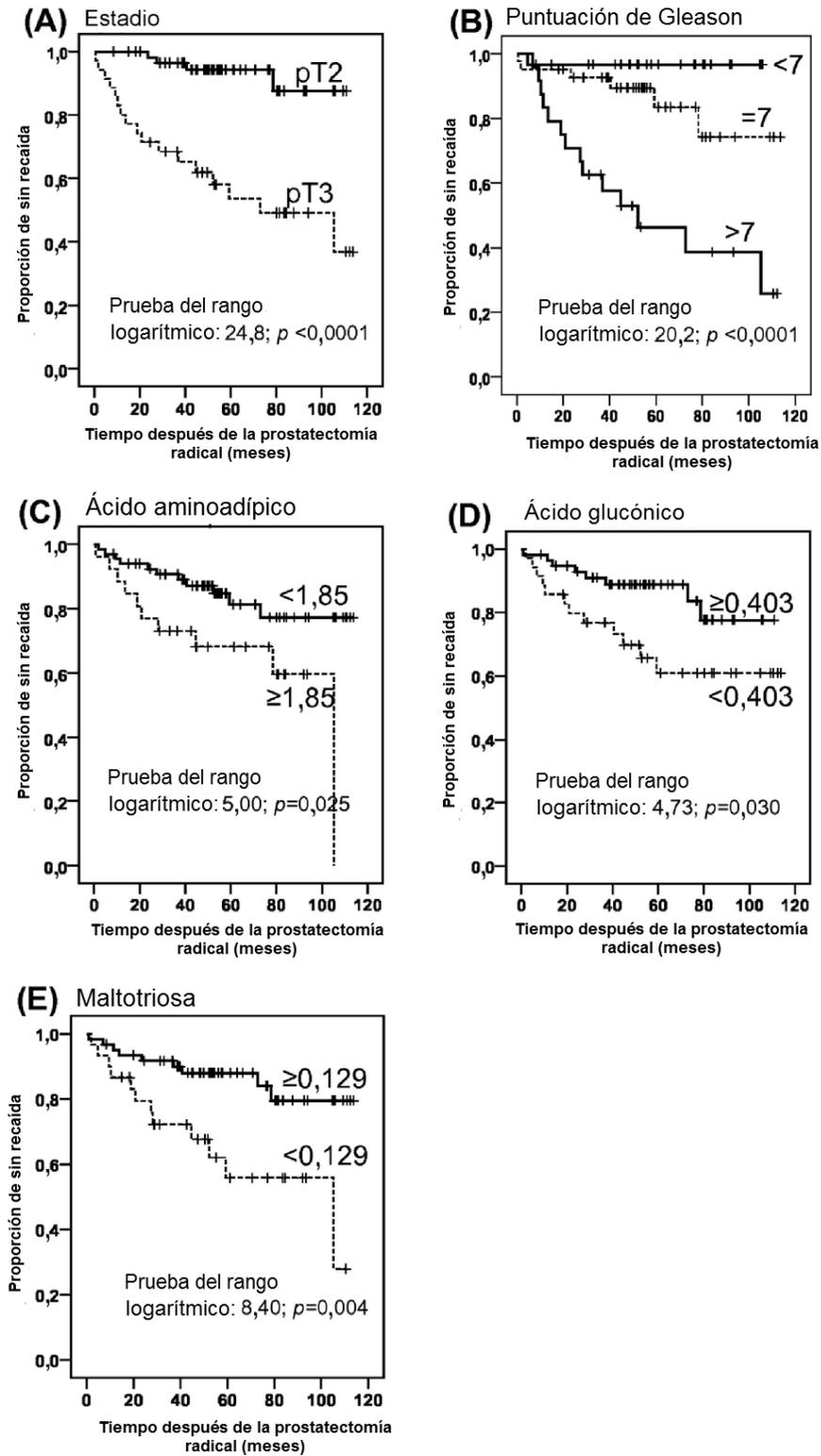
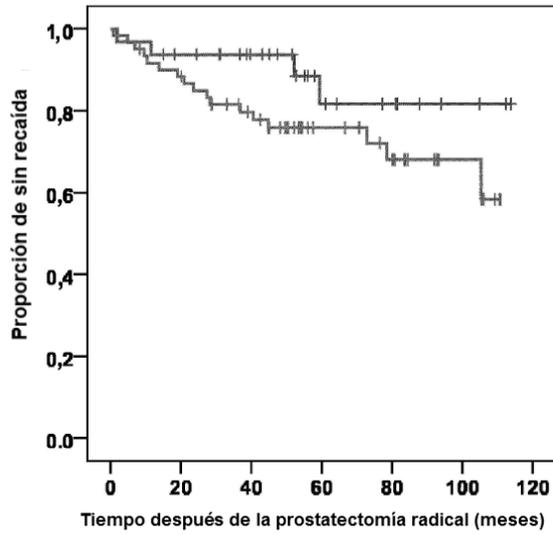


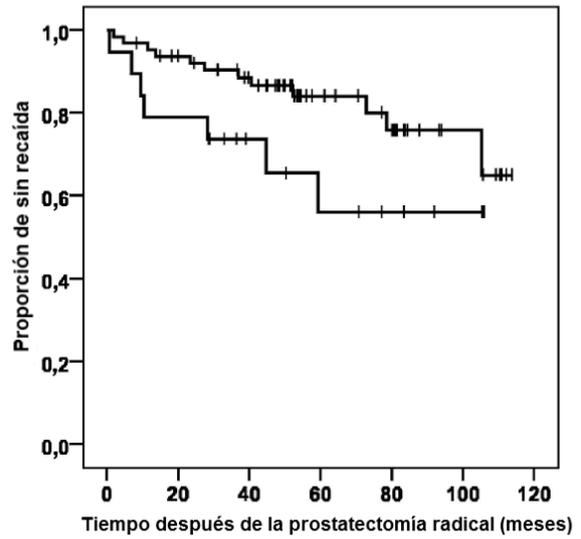
Figura 2

Figura 2, continuación

(F) Glicerofosfoetanolamina



(G) Ácido tricosanoico



(H) Ácido cerebrónico

