

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 877**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12Q 1/44 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2010 PCT/IB2010/052073**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10131195**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010 E 10726251 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2430191**

54 Título: **Fosfodiesterasa 4D7 como marcador de cáncer de próstata**

30 Prioridad:

12.05.2009 EP 09159960

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

19.02.2019

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE PHILIPS N.V. (50.0%)
High Tech Campus 5
5656 AE Eindhoven, NL y
UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF
GLASGOW (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, RALF;
HOUSLAY, MILES, D. y
HENDERSON, DAVID, J., P.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 700 877 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

Fosfodiesterasa 4D7 como marcador de cáncer de próstata

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para usar como marcador para el cáncer de próstata, y al uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata. La presente invención también se refiere a una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata, un método correspondiente e inmunoensayo, un método para diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata resistente a hormonas vs. cáncer de próstata sensible a hormonas, un inmunoensayo correspondiente, un método de adquisición de datos, un inmunoensayo para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata, un método para identificar a un individuo o elegibilidad para el tratamiento del cáncer de próstata, un inmunoensayo para estratificar a un individuo o cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer de próstata, y un inmunoensayo para estratificar a un individuo con cáncer de próstata.

Antecedentes de la invención

20 El cáncer es una clase de enfermedades en las que un grupo de células muestra un crecimiento descontrolado, invasión y, en ocasiones, metástasis. Estas tres propiedades malignas de los cánceres los diferencian de los tumores benignos, que son autolimitados, no invaden ni generan metástasis. Entre los hombres, los tres cánceres más comúnmente diagnosticados son el cáncer de próstata, pulmón y colorrectal, en los países desarrollados. En particular, el cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común en los hombres europeos. En 2002, en Europa, aproximadamente 225.000 hombres fueron diagnosticados recientemente con cáncer de próstata y aproximadamente 83.000 murieron a causa de esta enfermedad.

Ciertas fosfodiesterasas se han asociado con el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que la fosfodiesterasa PDE7 está vinculada a la leucemia linfocítica crónica (Zhang L et al., PNAS, 2008, 105(49): 19532-7). Sin embargo, para muchos tipos de cáncer o formas de progresión del cáncer no existe una molécula marcadora adecuada disponible.

El cáncer de próstata, por ejemplo, se diagnostica tradicionalmente a través del nivel sérico de antígeno prostático específico (PSA). Sin embargo, el PSA no es específico del cáncer de próstata y puede producirse en otras circunstancias, lo que lleva a un gran número de falsos positivos (el cáncer no se encuentra en aproximadamente el 70% de los hombres con niveles elevados de PSA que se someten a una biopsia). Además, habrá un número impredecible de falsos negativos que luego desarrollarán cáncer de próstata en presencia de una prueba de PSA "normal".

40 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una perspectiva de diagnóstico alternativa nueva y eficaz para la detección, el seguimiento y el pronóstico del cáncer de próstata.

La publicación internacional WO 2003044170 A2 describe isoformas de fosfodiesterasa PDE4D7 de humanos, ratones y ratas. La clonación de longitud completa de la PDE4D7 humana se produjo por reacción en cadena de la polimerasa utilizando el ADNc del hipocampo humano. Los homólogos de ratas y ratones también se clonaron a partir de ARNm de hipocampo o ADNc cerebral, respectivamente. Se describe que las isoformas específicas muestran especificidad de tejido y que la proteína de PDE4D7 se expresa altamente en el riñón, los testículos y el tejido cerebral, pero no se expresa mucho en corazón, pulmón, hígado, bazo, timo o páncreas. No se describe si la PDE4D7 se expresa en la próstata.

La fosfodiesterasa PDE4D se describe como un factor promotor de la proliferación en el cáncer de próstata (Rahrmann EP et al., Cancer Res., 2009, 69(10): 4388-97). Se describe que los estudios de perfiles de expresión generalmente no observaron cambios en la expresión del ARNm de PDE4D o una disminución en la expresión con el aumento del grado patológico del cáncer de próstata. Sin embargo, el producto RLM-5'-RACE predominante obtenido del ARN de adenocarcinoma prostático agrupado identificó un ADNc con un primer exón que comenzó en el par de bases 349 de la secuencia depositada de Genebank para la isoforma PDE4D5. Por lo tanto, en la metodología experimental que permite la amplificación de todas las isoformas PDE4D conocidas, la PDE4D5 se identificó como la isoforma PDE4D predominantemente expresada en el cáncer de próstata, lo que sugiere que es la isoforma PDE4D5 la que puede estar asociada con el cáncer de próstata.

60 Resumen de la invención

La presente invención aborda esta necesidad y proporciona medios y métodos que permiten el diagnóstico y la detección del cáncer de próstata.

El objetivo anterior se logra mediante la fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para su uso como marcador de cáncer de próstata.

Los inventores de la presente invención demuestran que la fosfodiesterasa 4D7 es subregulada en líneas celulares de cáncer de próstata y tejido de próstata derivado del paciente. La PDE4D7 es considerada, por lo tanto, como un biomarcador para la predicción del cáncer de próstata y una herramienta de decisión para la estratificación de ciertos regímenes de vigilancia del cáncer, así como el pronóstico y monitorización de la progresión del cáncer de próstata. En particular, los presentes inventores demostraron que la PDE4D7 es subregulada a la baja en líneas celulares de próstata derivadas de seres humanos, resistentes a hormonas, así como en las muestras de tejido humano correspondientes. Los métodos de diagnóstico y los usos basados en PDE4D7 como marcador de cáncer de próstata pueden, por lo tanto, ser empleados ventajosamente para (i) detectar y diagnosticar formas de cáncer de próstata que ponen en peligro la vida, (ii) pronosticar formas de cáncer de próstata que ponen en peligro la vida, (iii) monitorizar la progresión del cáncer hacia formas de cáncer de próstata que amenazan la vida, y (iv) la distinguir entre formas de cáncer indolentes y amenazantes para la vida.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata, que comprende un ligando de afinidad de ácidos nucleicos y/o un ligando de afinidad de péptidos para el producto de expresión o proteína PDE4D7.

En una realización preferida de la presente invención, dicha composición comprende un ligando de afinidad de ácidos nucleicos o un ligando de afinidad de péptidos que se modifica para funcionar como un agente de contraste.

En una realización preferida adicional de la presente invención, dicha composición comprende un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, un aptámero específico para el producto o proteína de expresión de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, controlar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata que comprende la etapa de determinar el nivel de PDE4D7.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar, monitorizar o pronosticar un cáncer de próstata resistente a hormonas o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión hacia un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho método discrimina entre cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas, que comprende los pasos de

(a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;

(b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;

(c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y

comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado elegido para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte está entre aproximadamente 1 y 7, de preferencia aproximadamente 5.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de adquisición de datos para diagnosticar, detectar, vigilar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos las etapas de:

(a) probar en un individuo la expresión de PDE4D7; y

(b) comparar la expresión determinada en el paso (a) con un nivel de control.

En una realización preferida adicional de la presente invención, el diagnóstico, la detección, el seguimiento del pronóstico o la adquisición de datos se llevarán a cabo en una muestra obtenida de un individuo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos las etapas de:

(a) probar en una muestra la expresión de PDE4D7,

(b) probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7,

(c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de los pasos (a) y (b); y

5 (d) decidir la presencia o el estadio del cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en función de los resultados obtenidos en el paso (c),

en donde dichos pasos de prueba se basan en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a PDE4D7.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para discriminar entre un cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas, que comprende las etapas de:

(a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;

15 (b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;

(c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y

20 (d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte está entre aproximadamente 1 y 7, preferiblemente alrededor de 5.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar a un individuo para elegibilidad para la terapia del cáncer de próstata que comprende:

(a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;

30 (b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;

(c) clasificar los niveles de expresión del paso (a) en relación con los niveles en las muestras de control de PDE4D7 del paso (b); y

35 (d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia para el cáncer de próstata donde la muestra del individuo se clasifica como de un nivel reducido de expresión de PDE4D7.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para estratificar un individuo o cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer de próstata que comprende:

40 (a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;

45 (b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;

(c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de la etapa (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b); y

50 (d) estratificar un individuo o cohorte de individuos para el tratamiento del cáncer de próstata según los resultados obtenidos en el paso (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel reducido de expresión de PDE4D7.

En una realización preferida adicional de la presente invención, dicha prueba o determinación de la expresión se realiza, o se realiza adicionalmente, mediante la medición de los niveles de ácidos nucleicos o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7, o del gen de referencia.

55 En una realización preferida adicional de la presente invención, dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de comparar los niveles medidos de ácidos nucleicos o proteína o la actividad biológica medida con un nivel de control.

60 En una realización preferida adicional de la presente invención, dicho gen de referencia es un gen de mantenimiento, GAPDH o PBGD particularmente preferido, o una fosfodiesterasa diferente, prefiriéndose particularmente la PDE4D5.

En una realización preferida adicional de la presente invención, dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de determinar el nivel de antígeno prostático específico (PSA).

65

En una realización preferida adicional de la presente invención, la muestra cómo se menciona anteriormente es una muestra de tejido, una muestra de orina, una muestra de sedimento de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de semen, una muestra que comprende células tumorales circulantes o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata.

5 En aun otra realización preferida de la presente invención, dicho cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a hormonas.

10 Estas y otras características, rasgos y objetivos de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con las figuras y ejemplos adjuntos, que demuestran a modo de ilustración los principios de la invención.

La descripción se proporciona únicamente a modo de ejemplo, sin limitar el alcance de la invención.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ofrece una visión general de las muestras analizadas en los niveles de expresión. AD significa "dependiente de andrógenos", AS significa "sensible a andrógenos" y AI significa "independiente de andrógenos". Las muestras "PC346P xenoinjerto" a "346Flu2" son líneas celulares, las muestras "PC295" a "PC374" son xenoinjertos.

20 La Figura 2 representa la expresión relativa del ARNm de PDE4D7 en varias líneas celulares de cáncer de próstata y xenoinjertos normalizados a GAPDH en comparación con LNCaP. La figura proporciona una descripción general de todas las muestras investigadas, incluidas las líneas celulares y el material de xenoinjerto.

25 La Figura 3 representa la expresión relativa de ARNm de PDE4D7 en líneas celulares de cáncer de próstata normalizada a GAPDH en comparación con LNCaP.

La Figura 4 representa la expresión relativa de ARNm de PDE4D7 en xenoinjertos de cáncer de próstata normalizada a GAPDH en comparación con LNCaP.

30 La Figura 5 muestra el contenido de PDE4D7 expresado como un porcentaje del ARNm de PDE4D total en líneas celulares de cáncer de próstata y xenoinjertos. La figura proporciona una visión general de todas las muestras investigadas, incluidas las líneas celulares y el material de xenoinjerto.

35 La Figura 6 muestra el contenido de PDE4D7 expresado como un porcentaje del ARNm de PDE4D total en líneas celulares de cáncer de próstata.

La Figura 7 muestra el contenido de PDE4D7 expresado como porcentaje del ARNm de PDE4D total en xenoinjertos de cáncer de próstata.

40 La Figura 8 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 humana en muestras de tejido de pacientes humanos. La información se deriva de 16 muestras diferentes en total, como se muestra en la Tabla 1 (incluidos los tejidos resecados de ganglios linfáticos). El grupo de muestra "1=no" se define como los tumores de próstata primarios sensibles a hormonas, el grupo de muestra "2=sí" se define como los tumores de próstata resistentes a hormonas. Se indican los valores de expresión relativos individuales para PDE4D7 humana en tejidos de próstata humanos. Los resultados se normalizaron a la expresión de GAPDH y PBGD. La mediana de las mediciones de datos relativos a los datos se indica para cada grupo de pacientes.

45 La Figura 9 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 humana en muestras de tejido de pacientes humanos. La información se deriva de 16 muestras diferentes en total, como se muestra en la Tabla 1 (incluidos los tejidos resecados de ganglios linfáticos). El grupo de muestra "1" se define como tumores de próstata primarios sensibles a hormonas, el grupo de muestra "2" se define como tumores de próstata resistentes a hormonas. Los resultados se normalizaron a la expresión de GAPDH y PBGD. La figura muestra un diagrama de caja de las mediciones de expresión relativa de datos individuales para PDE4D7 humana, donde la caja incluye el 75% de todas las mediciones. El valor de la expresión relativa mediana se indica como la frontera entre los dos cuadros de color.

50 La Figura 10 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 humana en muestras de tejido de pacientes humanos. La información se deriva de 12 muestras diferentes en total, como se muestra en la Tabla 1 (excluyendo los tejidos resecados de ganglios linfáticos). El grupo de muestra "1=no" se define como los tumores de próstata primarios sensibles a hormonas, el grupo de muestra "2=sí" se define como los tumores de próstata resistentes a hormonas. Los resultados se normalizaron a la expresión de GAPDH y PBGD. Se indican los valores de expresión relativos individuales para PDE4D7 humana en tejidos de próstata humanos. Se da la mediana de las mediciones de datos relativos a los datos para cada grupo de pacientes.

65 La Figura 11 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 humana en muestras de tejido de pacientes humanos. La información se deriva de 12 muestras diferentes en total representadas en la Tabla 1 (excluyendo los tejidos

resecados de ganglios linfáticos). El grupo de muestra "1" se define como tumores de próstata primarios sensibles a hormonas, el grupo de muestra "2" se define como tumores de próstata resistentes a hormonas. Los resultados se normalizaron a la expresión de GAPDH y PBGD. La figura muestra un diagrama de caja de las mediciones de expresión relativa de datos individuales para PDE4D7 humana, donde la caja incluye el 75% de todas las mediciones. El valor de la expresión relativa mediana se indica como el borde entre los dos cuadros de color.

La Figura 12 muestra el efecto de la expresión in vivo de PDE4D7 en la proliferación de células de cáncer de próstata PC3.

Descripción detallada de realizaciones

Los inventores han descubierto que la PDE4D7 es fuertemente subregulada en ciertos tipos de células asociadas al cáncer de próstata y en los tejidos de pacientes humanos y, por lo tanto, puede usarse como biomarcador para el cáncer de próstata. La PDE4D7, así como los agentes que modifican la PDE4D7 o que modifican la expresión de la PDE4D7, también pueden usarse como medicamentos, en particular para el tratamiento del cáncer de próstata.

Aunque la presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, esta descripción no debe interpretarse en un sentido limitativo.

Antes de describir en detalle realizaciones de ejemplo de la presente invención, se proporcionan definiciones importantes para comprender la presente invención.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un" y "una" también incluyen los respectivos plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

En el contexto de la presente invención, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" denotan un intervalo de precisión que una persona experta en la técnica entenderá para garantizar el efecto técnico de la característica en cuestión. El término típicamente indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferiblemente $\pm 15\%$, más preferiblemente $\pm 10\%$, e incluso más preferiblemente $\pm 5\%$.

Se debe entender que el término "que comprende" no es limitante. Para los fines de la presente invención, el término "que consiste en" se considera una realización preferida del término "que comprende". Si en lo sucesivo se define un grupo que comprende al menos un cierto número de realizaciones, se pretende que también abarque un grupo que preferiblemente consista solo en estas realizaciones.

Además, los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", etc. y similares en la descripción y en las reivindicaciones, se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos utilizados de esta manera son intercambiables en circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en este documento son capaces de funcionar en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en este documento.

En el caso de que los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", etc. se refieran a los pasos de un método o uso no existe una coherencia de tiempo o intervalo de tiempo entre los pasos, es decir, los pasos se pueden realizar simultáneamente o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre dichos pasos, a menos que se indique lo contrario en la solicitud como se establece aquí más arriba o abajo.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos, proteínas, bacterias, vectores, reactivos, etc. particulares descritos en el presente documento ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado solo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Como se ha expuesto anteriormente, la presente invención se refiere en un aspecto a la fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para uso como marcador de cáncer de próstata. El término "fosfodiesterasa 4D7" o "PDE4D7" se refiere a la variante de empalme 7 de la fosfodiesterasa PDE4D humana, es decir, el gen de la fosfodiesterasa PDE4D7 humana, preferiblemente a la secuencia definida en el número de registro del Genbank: AF536976 (versión AF536976.1, GI: 22901883 desde el 3 de marzo de 2009), más preferiblemente a la secuencia de nucleótidos como se indica en la SEQ ID NO: 1, que corresponde a la secuencia del número de acceso al Genbank indicado anteriormente del transcrito PDE4D7, y también se relaciona con la secuencia de aminoácidos correspondiente como lo establecido en la SEQ ID NO: 2, que corresponde a la secuencia del número de acceso al Genbank indicado anteriormente del polipéptido PDE4D7 codificado por el transcrito de PDE4D7. El término también comprende secuencias de nucleótidos que muestran un alto grado de homología con PDE4D7, por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos son al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a la secuencia establecida sucesivamente en la SEQ ID NO: 1, o secuencias de aminoácidos que son al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, o secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, o secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácidos nucleicos que son al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1.

El término "gen de la fosfodiesterasa PDE4D7 humana", "gen de la PDE4D7" o "gen marcador de la PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere al gen que codifica la fosfodiesterasa 4D. Preferiblemente, el término se refiere a un gen que expresa fosfodiesterasa 4D como variante de empalme 7, por ejemplo, la combinación específica de exones como se define en el Genbank Número de Acceso: AF536976 (versión AF536976.1, GI: 22901883 a partir del 3 de marzo de 2009) o como se establece en la SEQ ID NO: 1. El término también se relaciona con las moléculas de ADN derivadas de transcripciones de ARNm que codifican fosfodiesterasa 4D en empalme como variante 7, preferiblemente moléculas de ADNc.

El término "marcador" o "marcador PDE4D7", como se usa en el presente documento, se refiere a un gen, unidad genética o secuencia (una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos o proteínas) tal como se define en el presente documento anteriormente, cuyo nivel de expresión se modifica, preferiblemente disminuye, en una célula cancerosa o en tejido canceroso o en cualquier tipo de muestra que comprenda células cancerosas o tejidos cancerosos o porciones o fragmentos de los mismos, en comparación con un nivel o estado de control. El término también se refiere a cualquier producto de expresión de dicha unidad o secuencia genética, en particular a un transcrito de ARNm de PDE4D7, un polipéptido codificado por el transcrito de PDE4D7 o variantes o fragmentos de los mismos, así como a derivados homólogos del mismo como se describió más arriba en este documento. El término "nivel de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de transcrito de PDE4D7 y/o proteína de PDE4D7 derivable de un número definido de células o una porción de tejido definida, preferiblemente a la cantidad de transcripción de PDE4D7 y/o proteína de PDE4D7 obtenible en un ácido nucleico estándar (por ejemplo, ARN) o procedimiento de extracción de proteínas. Los expertos en la técnica conocen métodos de extracción adecuados.

El término "nivel de control" (o "estado de control"), como se usa en el presente documento, se relaciona con un nivel de expresión que puede determinarse al mismo tiempo y/o en condiciones similares o comparables a las de la muestra de prueba utilizando (a) muestras previamente recolectadas y almacenadas de un sujeto/sujetos cuyos estados de enfermedad, por ejemplo, no cancerosos, son conocidos. El término "estado de enfermedad" o "estado de enfermedad cancerosa" se relaciona con cualquier estado o tipo de condición celular o molecular entre un estado celular no canceroso y (incluido) un estado celular canceroso terminal. Preferiblemente, el término incluye diferentes etapas de proliferación/desarrollo cancerosos o niveles de desarrollo tumoral en el organismo entre (y excluyendo) un estado celular no canceroso y (incluyendo) un estado celular canceroso terminal. Dichas etapas de desarrollo pueden incluir todas las etapas del sistema de clasificación TNM (Tumor, Nodo, Metástasis) de tumores malignos, según lo define la UICC, por ejemplo, etapas 0 y I a IV. El término también incluye etapas antes de la etapa 0 de TNM, por ejemplo, etapas de desarrollo en las que los biomarcadores del cáncer conocidos por los expertos en la técnica muestran una expresión modificada o un patrón de expresión.

El nivel de expresión como se mencionó anteriormente puede ser preferiblemente el nivel de expresión de PDE4D7 como se definió aquí más arriba. Alternativa o adicionalmente, el nivel de expresión también puede ser el nivel de expresión de cualquier otro gen o elemento genético adecuado expresado en una célula, preferiblemente en el contexto de PDE4D7, por ejemplo, el nivel de expresión de otra fosfodiesterasa, el nivel de expresión de un gen de mantenimiento, por ejemplo, GAPDH o PBGD.

El término "canceroso" se refiere en el contexto de la presente invención a un estado de enfermedad cancerosa como se define anteriormente en el presente documento. Un nivel de control preferido en el contexto de los controles cancerosos es la expresión de PDE4D7 en tumores malignos sensibles a hormonas.

El término "no canceroso" se refiere en el contexto de la presente invención a una afección en donde no se puede detectar proliferación ni benigna ni maligna. Los medios adecuados para dicha detección son conocidos en la técnica. Un nivel de control preferido en el contexto de los controles no cancerosos es la expresión de PDE4D7 en un tejido normal, es decir, sano o no canceroso, o la expresión de PDE4D7 en tejido tumoral de próstata benigno. El término "tumor de próstata benigno", como se usa en el presente documento, se refiere a un tumor de próstata que carece de las tres propiedades malignas de un cáncer, es decir, no crece de forma agresiva, no invade los tejidos circundantes y no hace metástasis. Por lo general, un tumor benigno de próstata implica una neoplasia prostática leve y no progresiva o una enfermedad inflamatoria que carece de las propiedades invasivas de un cáncer. Además, los tumores de próstata benignos están típicamente encapsulados y, por lo tanto, inhiben su capacidad para comportarse de manera maligna. Un tumor benigno o una condición sana pueden determinarse mediante cualquier método molecular, histológico o fisiológico independiente, adecuado, conocido por el experto en la materia.

Alternativamente, el nivel de control puede determinarse mediante un método estadístico basado en los resultados obtenidos al analizar los niveles de expresión previamente determinados del gen marcador PDE4D7 de la presente invención en muestras de sujetos cuyo estado de enfermedad es conocido. Además, el nivel de control puede derivarse de una base de datos de patrones de expresión de sujetos o células previamente probados. Además, el nivel de

expresión de los genes marcadores de la presente invención en una muestra biológica por analizar puede compararse con múltiples niveles de control, niveles de control que se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere usar un nivel de control determinado a partir de una muestra de referencia derivada de un tipo de tejido similar al de la muestra biológica derivada del paciente. Se prefiere particularmente el uso de muestras derivadas de un sujeto/sujetos cuyo estado de enfermedad no es canceroso como se definió aquí más arriba, es decir, que presentan un estado de salud en donde no se puede detectar proliferación ni benigna ni maligna. En otra realización de la presente invención, el nivel de control puede determinarse a partir de una muestra de referencia derivada de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata, por ejemplo, de cáncer de próstata independiente de hormonas o resistente a hormonas.

Alternativamente, las muestras de referencia pueden comprender material derivado de líneas celulares, por ejemplo, líneas celulares de cáncer inmortalizadas, o derivadas de xenoinjertos de tejido. Preferiblemente, el material derivado de líneas celulares de cáncer de próstata o material derivado de xenoinjertos de tejido con tejido de próstata humano, en particular con tejido de próstata humano benigno y derivado de tumor, puede estar comprendido en una muestra de referencia de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de líneas celulares de cáncer preferidas comprenden líneas celulares PC346P, PC346B, LNCaP, VCaP, DuCaP, PC346C, PC3, DU145, PC346CDD, PC346Flu1, PC346Flu2. Ejemplos de xenoinjertos preferidos comprenden PC295, PC310, PC-EW, PC82, PC133, PC135, PC324 y PC374. Preferiblemente, se puede usar un panel completo de líneas celulares y xenoinjertos, por ejemplo, el panel humano de PC346. Más preferidas son líneas celulares y xenoinjertos como se describe en Marques et al., 2006, Eur. Urol., 49(2): 245-57.

En una alternativa preferida adicional, las muestras de referencia pueden derivarse de tejidos de pacientes, o paneles de tejidos o colecciones de tejidos obtenidos en entornos clínicos. Las muestras pueden obtenerse, por ejemplo, de pacientes masculinos sometidos a cirugía. Las muestras pueden derivarse de cualquier tipo de tejido adecuado, por ejemplo, de tejido prostático o ganglios linfáticos. Ejemplos preferidos de colecciones de tejido del paciente son de procedimientos quirúrgicos de próstata (por ejemplo, prostatectomía).

Además, se prefiere usar el valor estándar de los niveles de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención en una población con un estado de enfermedad conocido. El valor estándar se puede obtener por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un rango de media ± 2 SD (desviación estándar) o media ± 3 SD como valor estándar.

Además, el nivel de control también se puede determinar al mismo tiempo y/o en condiciones similares o comparables a las de la muestra de prueba utilizando (a) muestras previamente recolectadas y almacenadas de un sujeto/sujetos cuyo estado de enfermedad es/se sabe que es canceroso, es decir, a los que se les ha diagnosticado de forma independiente que padecen cierto tipo de cáncer, por ejemplo, del cáncer de próstata, en particular el cáncer de próstata dependiente de hormonas, sensible a hormonas o resistente a hormonas.

En el contexto de la presente invención, un nivel de control determinado a partir de una muestra biológica que se sabe que no es canceroso se denomina "nivel de control normal". Si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, por ejemplo, una muestra de un sujeto para el cual se diagnosticó de manera independiente el cáncer de próstata, en particular el cáncer dependiente de hormonas, sensible a hormonas o resistente a hormonas, se puede designar como "nivel de control canceroso".

El término "cáncer de próstata" se refiere a un cáncer de la glándula prostática en el sistema reproductor masculino, que se produce cuando las células de la próstata mutan y comienzan a multiplicarse fuera de control. Por lo general, el cáncer de próstata está vinculado a un nivel elevado de antígeno prostático específico (PSA). En una realización de la presente invención, el término "cáncer de próstata" se refiere a un cáncer que muestra niveles de PSA por encima de 4.0. En otra realización, el término se refiere a cáncer que muestra niveles de PSA por encima de 2.0. El término "nivel de APS" se refiere a la concentración de antígeno prostático específico (PSA) en la sangre en ng/ml.

El término "cáncer de próstata dependiente de hormonas" significa que el crecimiento y/o la proliferación de cáncer de próstata o de líneas celulares de cáncer de próstata depende de la estimulación de la hormona sexual masculina.

El término "cáncer de próstata sensible a hormonas" significa que el crecimiento y la proliferación de cáncer de próstata o de líneas celulares de cáncer de próstata es sensible a la estimulación de la hormona sexual masculina. El término "sensible" se refiere a situaciones en las que el cáncer de próstata o la línea celular de cáncer de próstata muestra un patrón de reacción bioquímica o celular en presencia de hormonas sexuales masculinas, pero necesita una hormona sexual masculina para el crecimiento y/o la proliferación.

El término "cáncer de próstata resistente a hormonas" significa que el crecimiento y la proliferación de cáncer de próstata o de líneas celulares de cáncer de próstata es resistente a la estimulación de la hormona sexual masculina. El término también se relaciona con una etapa tardía de desarrollo del cáncer de próstata que ya no es susceptible de administración de antihormonas, preferiblemente antiandrógenos como se definió aquí más arriba. El término "hormona sexual masculina", como se usa en el presente documento, se refiere a un andrógeno, preferiblemente a testosterona, androstenediona, dihidrotestosterona, dehidroepiandrosterona, androstenodiol o androsterona.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata.

5 El término "diagnóstico de cáncer de próstata" como se usa en este documento significa que se puede considerar que un sujeto o individuo padece cáncer de próstata, cuando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención se modifica, preferiblemente se reduce o se subregula, en comparación con un nivel de control como se definió aquí más arriba, preferiblemente si se compara con el nivel de control normal como se definió aquí más arriba. El término "diagnóstico" también se refiere a la conclusión alcanzada a través de ese proceso de comparación.

10 El término "modificado" o "nivel de expresión modificado" en el contexto de la presente invención denota, por lo tanto, un cambio en el nivel de expresión. Los niveles de expresión se consideran "cambiados" cuando la expresión del gen PDE4D7, por ejemplo, en una muestra para analizar, difiere, por ejemplo, en 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más del 50% de un nivel de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces o más en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser un nivel de control normal o un nivel de control canceroso como se definió aquí más arriba. Si se va a realizar una comparación con un nivel de control canceroso, se prefiere una comparación adicional con un nivel de control normal. Tal comparación adicional permite la determinación de una tendencia de la modificación, es decir, se observa un aumento o una disminución del nivel de expresión.

20 El término "modificado" se refiere preferiblemente a una disminución o regulación negativa del nivel de expresión del marcador PDE4D7 o una inhibición completa de la expresión del marcador PDE4D7 si una muestra de prueba se compara con un nivel de control. El nivel de control puede ser un nivel de control normal o un nivel de control canceroso como se definió aquí más arriba. En una realización preferida de la presente invención, el nivel de control es un nivel de control canceroso derivado de, o asociado con tumores o tejidos de próstata dependientes de hormonas, más preferiblemente derivado de, o asociado con tumores o tejidos de próstata sensibles a hormonas. El término "nivel de expresión reducido" o "nivel de expresión subregulado" o "disminución del nivel de expresión" (que se puede usar como sinónimo) en el contexto de la presente invención denota una reducción del nivel de expresión de PDE4D7 entre una situación para ser analizado, por ejemplo una situación derivada de la muestra de un paciente, y un punto de referencia, que podría ser un nivel de control normal o un nivel de control canceroso derivado de cualquier estadio de cáncer adecuado conocido por el experto en la técnica, preferiblemente una hormona dependiente, más preferiblemente un tumor de próstata sensible a hormonas. Los niveles de expresión se consideran "reducidos" o "subregulados" cuando la expresión del gen PDE4D7 disminuye, por ejemplo, en 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más del 50% de un nivel de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, o menos de 10 veces o más en comparación con un nivel de control, preferiblemente en comparación con un control de tumor de próstata dependiente de hormonas, o con un control de tumor de próstata sensible a hormonas.

40 En una realización adicional, una similitud adicional en el patrón de expresión génica global entre una muestra obtenida de un sujeto y una referencia como se definió aquí más arriba, que es cancerosa, indica que el sujeto padece un cáncer. En otra realización de la presente invención, el diagnóstico puede combinarse con la elucidación de niveles de expresión de biomarcadores de cáncer adicionales. Por ejemplo, puede probarse la expresión de biomarcadores como PSA.

45 Se puede considerar que un cáncer, en particular un cáncer de próstata, se diagnostica cuando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención se modifica, preferiblemente se reduce o subregula, en comparación con un nivel de control como se definió aquí más arriba, por ejemplo, el nivel de control normal como se definió aquí más arriba.

50 En una realización particularmente preferida, se puede considerar que se diagnostica un cáncer de próstata si el nivel de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, disminuye en un valor de entre 20% a 80%, preferiblemente en un valor de 30%, 40%, 50%, 60% o 70% en una muestra de prueba en comparación con un nivel de control, preferiblemente en comparación con un nivel de expresión de control derivado de un control de tumor dependiente de hormonas o un control de tumor de próstata sensible a hormonas. En una realización preferida adicional, se puede considerar que se diagnostica un cáncer de próstata resistente a hormonas si el nivel de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, disminuye en un valor de entre 20% a 90%, preferiblemente en un valor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% en una muestra de prueba en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser un nivel de control normal o un nivel de control canceroso, preferiblemente derivado de un cáncer de próstata dependiente de hormonas o sensible a hormonas.

60 El término "detección de cáncer de próstata" como se usa en este documento significa que se puede determinar la presencia de una enfermedad o trastorno canceroso en un organismo o que se puede identificar un trastorno o enfermedad cancerosa en un organismo. La determinación o identificación de una enfermedad o trastorno canceroso se puede lograr mediante una comparación del nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención y el nivel de control normal como se definió aquí más arriba. Un cáncer, en particular un cáncer de próstata, puede detectarse cuando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 es similar a un nivel de control canceroso como se definió aquí más arriba. En una realización preferida de la presente invención, se puede detectar un cáncer de próstata

si el nivel de expresión del marcador PDE4D7 es similar a un nivel de control canceroso de una célula o línea de cáncer de próstata establecida, por ejemplo, una línea celular de cáncer de próstata como se mencionó anteriormente en este documento.

5 El término "monitorizar el cáncer de próstata", como se usa en el presente documento, se relaciona con el
acompañamiento de una enfermedad o trastorno canceroso diagnosticado o detectado, por ejemplo, durante un
procedimiento de tratamiento o durante un cierto período de tiempo, generalmente durante 2 meses, 3 meses, 4
10 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años, o cualquier otro período de tiempo. El término
"acompañamiento" significa que los estados de enfermedad como se definen anteriormente en este documento y, en
particular, los cambios de estos estados de enfermedad se pueden detectar comparando el nivel de expresión del
marcador PDE4D7 de la presente invención en una muestra con un normal o un canceroso nivel de control como se
definió aquí más arriba, preferiblemente un nivel de expresión de control derivado de un control de tumor dependiente
de hormonas o un control de tumor de próstata sensible a hormonas en cualquier tipo de segmento de tiempo
15 periódico, por ejemplo cada semana, cada 2 semanas, cada mes, cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, cada
1.5 año, cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años, durante cualquier período de tiempo, por ejemplo, durante 2 semanas, 3
semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 años, respectivamente. El
nivel de control canceroso puede derivarse de muestras correspondientes a diferentes etapas del desarrollo del
cáncer, por ejemplo, etapas 0 y I a IV del sistema de clasificación TNM. En una realización preferida de la presente
20 invención, el término se refiere al acompañamiento de un cáncer de próstata diagnosticado, más preferiblemente de
un cáncer de próstata dependiente de hormonas y uno sensible a hormonas. En una realización adicional, la
monitorización también puede usarse para el acompañamiento de cáncer de próstata resistente a hormonas, por
ejemplo, durante un procedimiento de tratamiento. La monitorización también puede incluir la detección de la expresión
de genes o elementos genéticos adicionales, por ejemplo, genes de mantenimiento como GAPDH o PBGD, u otras
fosfodiesterasas, preferiblemente PDE4D5.

25 El término " pronosticar cáncer de próstata " como se usa en este documento se refiere a la predicción del curso o
resultado de una enfermedad cancerosa diagnosticada o detectada, por ejemplo, durante un cierto período de tiempo,
durante un tratamiento o después de un tratamiento. El término también se refiere a una determinación de la posibilidad
de supervivencia o recuperación de una enfermedad, así como a una predicción del tiempo de supervivencia esperado
30 de un sujeto. Un pronóstico puede, específicamente, implicar establecer la probabilidad de supervivencia de un sujeto
durante un período de tiempo en el futuro, como 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años o cualquier otro
período de tiempo.

35 El término "progresión del cáncer de próstata", como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio entre
las diferentes etapas del desarrollo del cáncer de próstata, por ejemplo, estadios 0 y I a IV de la clasificación TNM, o
cualquier otra etapa o subestadio, desde una condición saludable hasta un escenario de cáncer terminal. Típicamente,
tales interruptores están acompañados por una modificación del nivel de expresión de PDE4D7, preferiblemente una
disminución, en una muestra de prueba en comparación con una muestra de prueba previa del mismo individuo, por
ejemplo, en comparación con una muestra derivada de un tumor de próstata dependiente de hormonas o un control
40 de tumores o un tumor de próstata sensible a hormonas o un control de tumores. Una progresión del cáncer de próstata
se puede considerar como detectada o diagnosticada si el nivel de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más
arriba, se reduce en un valor de entre 3% a 50%, preferiblemente en un valor de 10%, 15%, 20% o 25% en una
muestra de prueba en comparación con una muestra de prueba anterior de la misma persona. La modificación se
puede detectar durante cualquier período de tiempo, preferiblemente durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses,
45 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 años, esto es, el valor indicado anteriormente puede calcularse comparando el
nivel de expresión de PDE4D7 en un primer punto en el tiempo y en un segundo punto en el tiempo después del
período de tiempo indicado anteriormente. La progresión, en una realización específica, puede ser una progresión
hacia el cáncer de próstata resistente a hormonas.

50 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el término "progresión del cáncer de próstata"
se refiere a un cambio de un estado de cáncer de próstata dependiente de hormonas o sensible a hormonas a un
estado de cáncer de próstata resistente a hormonas.

55 Una progresión desde un estado de cáncer de próstata dependiente de hormonas o sensible a hormonas a un estado
de cáncer de próstata resistente a hormonas puede considerarse como detectada o diagnosticada si el nivel de
expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, disminuye en un valor de entre el 3% y el 50%, preferiblemente
en un valor del 10%, 15%, 20% o 25% en una muestra de prueba en comparación con una muestra de prueba previa
del mismo individuo, que ha sido diagnosticada como cáncer de próstata sensible a hormonas o dependiente de
60 hormonas. También se puede considerar que la progresión se detecta si la comparación se realiza con muestras de
prueba de otros individuos, muestras de prueba de recolecciones de tejidos, valores de bases de datos, etc.

La modificación se puede detectar durante cualquier período de tiempo, preferiblemente durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,
9, 10, 11, 12 meses, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o 20 años, es decir, el valor indicado anteriormente se puede
65 calcular comparando el nivel de expresión de PDE4D7 en un primer punto en el tiempo y en un segundo punto en el
tiempo después del período de tiempo indicado anteriormente.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al diagnóstico y detección de una predisposición para desarrollar cáncer de próstata, más preferiblemente cáncer de próstata resistente a hormonas. Una "predisposición para desarrollar cáncer de próstata" y en particular una "predisposición para desarrollar cáncer de próstata resistente a hormonas" en el contexto de la presente invención es un estado de riesgo de desarrollar cáncer de próstata, en particular cáncer de próstata resistente a hormonas. Preferiblemente, una predisposición para desarrollar cáncer de próstata resistente a hormonas puede estar presente en los casos en que el nivel de expresión de PDE4D7 como se definió aquí más arriba esté por debajo de un nivel de control canceroso como se definió aquí más arriba, por ejemplo, un nivel de expresión de referencia derivado de tejidos o muestras de un sujeto que evidentemente sufre de cáncer de próstata sensible a hormonas. El término "por debajo de", como se usa en este documento, significa que el nivel de expresión de PDE4D7 se reduce en aproximadamente un 40% a 80% en comparación con un nivel de control canceroso, preferiblemente disminuido en aproximadamente un 50%.

Alternativamente, una predisposición para desarrollar cáncer, en el contexto de la presente invención, puede estar presente en situaciones en las que se proporciona el nivel de expresión de PDE4D7 como se define anteriormente en el presente documento y en donde, además, se ofrecen marcadores alternativos de cáncer, por ejemplo, PSA, no muestra ninguna modificación del nivel de expresión o el patrón de expresión. Otros marcadores de cáncer adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

Por lo tanto, una predisposición para el cáncer de próstata, en particular el cáncer de próstata resistente a hormonas, puede considerarse como diagnosticada o detectada si se observa una de las situaciones descritas anteriormente.

La diferencia entre los niveles de expresión de una muestra biológica de prueba y un nivel de control puede normalizarse al nivel de expresión de otros ácidos nucleicos de control, por ejemplo, los genes de mantenimiento cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren según el estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes de control de ejemplo incluyen, entre otros, β -actina, glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), porfobilinógeno desaminasa (PBGD) y proteína ribosómica P1. La normalización también se puede llevar a cabo con otras fosfodiesterasas, preferiblemente con una fosfodiesterasa humana que muestra un patrón de expresión inalterado en diferentes estadios de tumores. Una fosfodiesterasa preferida es PDE4D5 o cualquier otra isoforma de la familia PDE4D, por ejemplo, PDE4D1, PDE4D2, PDE4D3, PDE4D4, PDE4D6, PDE4D8 o PDE4D9.

En el contexto de la presente invención, los términos "diagnóstico" y "pronóstico" también pretenden abarcar predicciones y análisis de probabilidad. Por lo tanto, la PDE4D7 como marcador se puede usar clínicamente para tomar decisiones relacionadas con las modalidades de tratamiento, incluida la intervención terapéutica o los criterios de diagnóstico, como la vigilancia de la enfermedad. De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un resultado intermedio para examinar la condición de un sujeto. Dicho resultado intermedio puede combinarse con información adicional para ayudar a un médico, enfermera u otro profesional a diagnosticar que un sujeto padece la enfermedad. Alternativamente, la presente invención puede usarse para detectar células cancerosas en un tejido derivado del sujeto, y proporcionar al médico información útil para diagnosticar que el sujeto padece la enfermedad.

Un sujeto o individuo que va a ser diagnosticado, monitorizado o en el cual debe detectarse o pronosticarse un cáncer de próstata, una progresión de cáncer de próstata o predisposición para el cáncer de próstata, de acuerdo con la presente invención es un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

En particular, se prefiere el uso de herramientas de formación de imágenes moleculares conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo. Tecnología de imágenes por resonancia magnética (IRM) y/o imágenes por resonancia magnética de fotones (MPI) en el contexto del uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata de la progresión del cáncer de próstata. Por ejemplo, la PDE4D7 se puede usar como un marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en metodologías como la MRI o MPI que permite la detección en línea del marcador de diagnóstico dentro de un sujeto humano.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición para diagnosticar, detectar, vigilar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición para el cáncer de próstata en un individuo. La composición de acuerdo con la presente invención puede comprender un ligando de afinidad de ácidos nucleicos o péptidos para el producto o proteína de expresión de PDE4D7.

El término "ligando de afinidad de ácidos nucleicos para el producto de expresión de PDE4D7" como se usa en este documento se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que puede unirse específicamente a un transcrito de PDE4D7 o una molécula de ADN derivada de la variante de empalme 7 de PDE4D, incluso más preferiblemente la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de ADN complementaria de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o una molécula de ARN correspondiente. El ligando de afinidad de ácidos nucleicos también se puede unir específicamente a una secuencia de ADN al menos al 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o a cualquier fragmento de dichas secuencias.

El término "ligando de afinidad de péptidos para la proteína de PDE4D7", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula peptídica que puede unirse específicamente a la proteína de PDE4D7. La molécula peptídica puede preferiblemente unirse específicamente a una proteína o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2. El ligando de afinidad del péptido también puede unirse específicamente a una proteína o polipéptido que comprende un aminoácido secuencia codificada por una secuencia de ADN que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la como se indica en la SEQ ID NO: 1 o en una proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o a cualquier fragmento de dichas secuencias. El término "péptido" se refiere a cualquier tipo de secuencia de aminoácidos que comprende más de 2 aminoácidos, por ejemplo, estructuras polipeptídicas, estructuras proteicas o derivados funcionales de las mismas. Además, el péptido se puede combinar con otras unidades estructurales o funcionalidades químicas.

El término "producto de expresión" como se usa en este documento se refiere a un transcrito de PDE4D7 o una molécula de ARNm generada por la expresión del gen PDE4D. Más preferiblemente, el término se refiere a una transcripción de PDE4D procesada como se definió aquí más arriba, por ejemplo, a través de la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida de la presente invención, la composición de la presente invención comprende ligandos de afinidad de ácidos nucleicos y péptidos seleccionados del grupo que consiste en un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.

La composición de la presente invención puede comprender, por ejemplo, un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7 y/o una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7. El término "oligonucleótido específico para el producto de expresión de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena en sentido o antisentido de la variante de empalme 7 de PDE4D. Preferiblemente, el oligonucleótido es complementario a la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o a la secuencia de ADN complementaria de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de oligonucleótidos también puede ser complementaria a una secuencia de ADN que sea al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 2.

El oligonucleótido puede tener cualquier longitud adecuada y secuencia conocida por el experto en la materia, como derivado de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o su complemento. Típicamente, el oligonucleótido puede tener una longitud de entre 8 y 60 nucleótidos, preferiblemente de entre 10 y 35 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 nucleótidos. Las secuencias de oligonucleótidos específicas para el producto de expresión de PDE4D7 se pueden definir con la ayuda de herramientas de software conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización adicional de la presente invención, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser complementarias de secuencias localizadas en el exón 1 o el exón 2 del gen PDE4D7, a secuencias localizadas en el límite entre el exón 1 y el exón 2 del gen PDE4D7 o secuencias localizadas en el exón 2 del gen PDE4D7 únicamente, preferiblemente en un tramo de 271 nucleótidos únicos de PDE4D7, es decir, 42 nucleótidos en el extremo 3' del exón 1 y 229 nucleótidos 5'-terminales del exón 2 de PDE4D. Por ejemplo, un oligonucleótido utilizable como cebador directo puede localizarse en el límite entre el exón 1 y el exón 2 del gen PDE4D7 y el oligonucleótido utilizable como cebador inverso puede localizarse en el exón 2 del gen PDE4D7.

En una realización preferida de la presente invención, el conjunto de oligonucleótidos tiene las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4. Se prefieren más los oligonucleótidos que tienen o comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8.

El término "sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7" como se usa en este documento significa una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena en sentido o antisentido de la variante de empalme 7 de PDE4D. Preferiblemente, la sonda es complementaria a la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o a la secuencia de ADN complementaria de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de la sonda también puede ser complementaria a una secuencia de ADN que sea al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 2.

La sonda puede tener cualquier longitud adecuada y secuencia conocida por el experto en la materia, como derivable de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o su complemento. Típicamente, la sonda puede tener una longitud de entre 6 y 300 nucleótidos, preferiblemente de entre 15 y 60 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos. Las secuencias de sondas específicas para el producto de expresión de PDE4D7 se pueden definir con la ayuda de herramientas de software conocidas por los expertos en la técnica.

5 En una realización adicional de la presente invención, la secuencia de la sonda puede ser complementaria a una secuencia localizada en el exón 1 o el exón 2 del gen PDE4D7, preferiblemente a un tramo de 271 nucleótidos únicos de PDE4D7, es decir, 42 nucleótidos en el extremo 3' final del exón 1 y 229 nucleótidos 5'-terminales del exón 2 de PDE4D. Si la sonda se va a utilizar para reacciones de PCR cuantitativas, por ejemplo, PCR en tiempo real, la sonda puede diseñarse de manera que se localice en una posición entre las posiciones de unión de un cebador directo e
10 inverso. Preferiblemente, la sonda puede diseñarse de manera que se localice en la proximidad de uno de los oligonucleótidos cebadores. Más preferiblemente, puede localizarse en la proximidad del cebador directo.

En una realización preferida de la presente invención, la sonda tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 9.

15 La composición de la presente invención puede comprender adicional o alternativamente un aptámero específico para el producto o proteína de expresión de PDE4D7. El término "aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácidos nucleicos corta, por ejemplo, ARN, ADN, APN, ACN, HNA, ALN o ANA o cualquier otro formato de ácidos nucleicos adecuado conocido por el
20 experto en la materia, siendo capaz de unirse específicamente a la variante de empalme 7 de PDE4D, preferiblemente la molécula de ADN derivada de la variante de empalme 7 de PDE4D. Más preferiblemente, la molécula de aptámero de ácidos nucleicos puede unirse específicamente a una secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o un derivado de doble cadena de la misma. El aptámero de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también puede unirse a una molécula de ARN correspondiente al transcrito de PDE4D7, preferiblemente una molécula de ARN
25 correspondiente a la secuencia de ADN como se establece en la SEQ ID NO: 1.

El aptámero de ácidos nucleicos además puede ser capaz de unirse específicamente a una secuencia de ADN que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia
30 expuesta en la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o moléculas de ARN correspondientes a estas secuencias.

La especificidad del aptámero de ácidos nucleicos para empalmar la variante 7 de PDE4D puede ser conferida por una unión específica a secuencias únicamente presentes en dicha variante de empalme, por ejemplo, el exón 2 o el
35 límite del exón entre el exón 1 y el exón 2 de PDE4D. En una realización particular de la presente invención, la especificidad del aptámero de ácidos nucleicos para empalmar la variante 7 de PDE4D se puede conferir mediante una unión específica a una secuencia ubicada dentro de un tramo de 271 nucleótidos únicos de PDE4D7, es decir, 42 nucleótidos en el extremo 3' de Exón 1 y 229 nucleótidos 5'-terminales del exón 2 de PDE4D. Los aptámeros de ácidos nucleicos pueden generarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, por
40 ejemplo, por selección in vitro o métodos SELEX. Preferiblemente, los aptámeros de ácidos nucleicos pueden generarse y/o diseñarse de acuerdo con la guía proporcionada en Ellington and Szostak, 1990, Nature, 346: 818-822. Un aptámero de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención puede combinarse adicionalmente con restos adicionales, por ejemplo, con partes interactivas como la biotina o funcionalidades enzimáticas como los elementos de la ribozima.

45 El término "aptámero específico para la proteína de PDE4D7" como se usa en este documento se refiere a un péptido corto capaz de interactuar y unirse específicamente a la proteína de PDE4D7. El aptámero peptídico puede preferiblemente unirse específicamente a una proteína o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2. El aptámero peptídico también puede unirse específicamente a una proteína o
50 polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 1 o a una proteína o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. Típicamente, un péptido aptámero es un bucle peptídico variable, que comprende, por ejemplo, 10 a
55 20 aminoácidos. En el contexto de la presente invención, el péptido aptámero se puede unir preferiblemente en uno o ambos extremos a una estructura de andamio. La estructura del andamio puede ser cualquier molécula, preferiblemente una proteína, que tenga buenas propiedades de solubilidad. El experto en la materia conocerá las moléculas de armazón adecuadas. Una molécula de armazón preferida para usar en el contexto de la presente invención es la proteína bacteriana tiorredoxina-A. El bucle de péptido aptámero se puede insertar preferiblemente
60 dentro de un sitio activo reductor de la molécula de andamio. Alternativamente, la proteína A estafilocócica y sus dominios y derivados de estos dominios, como la proteína Z o lipocalinas, se pueden usar como estructuras de andamio en el contexto de la presente invención.

Los aptámeros peptídicos pueden generarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, por ejemplo, a través de metodologías dos híbridos de levadura.

En otra realización preferida de la presente invención, la composición puede comprender, o puede comprender adicionalmente, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7, preferiblemente un anticuerpo monoclonal o policlonal. También se prefieren variantes de anticuerpos o fragmentos como un anticuerpo de cadena simple, un diacuerpo, un minicuerpo, un fragmento Fv de cadena única (sc(Fv)), un anticuerpo sc(Fv)₂, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂ basado en un anticuerpo monoclonal PDE4D7 específico, un agente inmunofarmacéutico pequeño modular (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene V_{HH}, etc. El anticuerpo puede ser mono, bi-, tri- o multivalente. El anticuerpo puede ser de cualquier origen, por ejemplo, un anticuerpo murino, humano o quimérico, o un murino humanizado. En una realización específica de la presente invención, los anticuerpos anti-PDE4D7 disponibles comercialmente como NB300-652 (Novus Biologicals, Inc.) o GTX14629 (GeneTex, Inc.) pueden incluirse en la composición o pueden usarse para diagnóstico.

Los anticuerpos pueden ser producidos de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia. Pueden producirse anticuerpos policlonales mediante la inmunización de animales con el antígeno de elección, mientras que los anticuerpos monoclonales de especificidad definida pueden producirse utilizando, por ejemplo, la tecnología de hibridoma desarrollada por Köhler y Milstein (Köhler and Milstein, 1976, Eur. J. Immunol., 6: 511-519).

Un ligando de afinidad, como se describió más arriba en el presente documento, puede marcarse con diversos marcadores o puede ser detectado por un ligando de afinidad secundario, marcado con diversos marcadores, para permitir la detección, visualización y/o cuantificación. Esto se puede lograr utilizando cualquier marcador adecuado, que se pueda conjugar con el ligando de afinidad capaz de interactuar con el producto de expresión de PDE4D7 o la proteína de PDE4D7 o con cualquier ligando de afinidad secundario, utilizando cualquier técnica o método adecuado conocido por el experto en la materia. El término "ligando de afinidad secundaria" se refiere a una molécula que es capaz de unirse al ligando de afinidad como se definió aquí más arriba (es decir, un "ligando de afinidad primaria" si se usa en el contexto de un sistema con dos ligandos de afinidad que interactúan). La interacción de unión es preferiblemente una unión específica.

Ejemplos de marcadores que pueden conjugarse con ligandos de afinidad primarios y/o secundarios incluyen colorantes o metales fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, fluorescamina), colorantes cromóforos (por ejemplo, rodopsina), compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, luminal, imidazol) y proteínas bioluminiscentes (por ejemplo, luciferina, luciferasa), haptenos (por ejemplo, biotina).

En una realización particularmente preferida, un ligando de afinidad para ser utilizado como una sonda, en particular una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7 como se definió aquí más arriba, puede marcarse con una etiqueta fluorescente como 6-FAM, HEX, TET, ROX, Cy3, Cy5, Texas Red o Rodamina, y/o al mismo tiempo con una etiqueta de extinción como TAMRA, Dabcyl, Black Hole Quencher, BHQ-1 o BHQ-2. en Stryer, 1968, Science, 162: 526-533 se describe una variedad de otros agentes fluorescentes y cromóforos útiles. Los ligandos de afinidad también pueden marcarse con enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-lactamasa), radioisótopos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ⁶⁴Cu, ⁶²Cu, ¹²⁴I, ⁷⁶Br, ⁸²Rb, ⁶⁸Ga o partículas ¹⁸F) (por ejemplo, oro).

Los diferentes tipos de marcadores pueden conjugarse con un ligando de afinidad utilizando diversas químicas, por ejemplo, la reacción de amina o la reacción de tiol. Sin embargo, también se pueden usar otros grupos reactivos distintos de aminas y tioles, por ejemplo, aldehídos, ácidos carboxílicos y glutamina.

En una realización preferida de la presente invención, el ligando de afinidad de ácidos nucleicos o el ligando de afinidad de péptidos de la presente invención puede modificarse para funcionar como un agente de contraste.

El término "agente de contraste", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto molecular que es capaz de interactuar específicamente con el marcador PDE4D7 y que puede ser detectado por un aparato ubicado fuera del cuerpo humano o animal. Preferiblemente, tales agentes de contraste son adecuados para uso en generación de imágenes de resonancia magnética (MRI) o imágenes de fotones magnéticos (MPI). El término "que interactúa específicamente" se refiere a la propiedad de un compuesto molecular para interactuar preferentemente con el marcador PDE4D7 en la superficie celular de las células que están presentes dentro del cuerpo humano o animal sobre otras proteínas que son expresadas por dichas células. Los agentes de contraste preferidos que también pueden designarse como composiciones de agentes de contraste serán capaces de detectar específicamente moléculas que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o derivados o variantes homólogas de la misma como se definió aquí más arriba. Los agentes de contraste preferidos son aptámeros específicos para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína de PDE4D7 como se define anteriormente en este documento, así como anticuerpos específicos para la proteína de PDE4D7 como se define anteriormente en el presente documento.

Los agentes de contraste, aparte de su propiedad de ser capaces de reconocer específicamente el marcador PDE4D7, además, típicamente comprenderán una molécula adicional que es detectable por la tecnología de detección específica utilizada. El término "modificado para funcionar" como se usa en este documento, por lo tanto, se refiere a

cualquier modificación adecuada conocida por el experto en la técnica, que puede ser necesaria para permitir el uso del agente de contraste en métodos de generación imágenes moleculares, en particular en MRI o MPI. Por ejemplo, si se utiliza la espectroscopía fluorescente como medio de detección, dichas moléculas pueden comprender fluoróforos como moléculas marcadoras detectables que pueden excitarse a una longitud de onda específica. Alternativamente, se puede emplear una etiqueta radiactiva, por ejemplo, un radioisótopo como se describe aquí más arriba. Con respecto a los agentes de contraste preferidos de acuerdo con la invención que son adecuados para MRI, los agentes de contraste tales como los anticuerpos descritos anteriormente pueden comprender una molécula marcadora que es detectable por MRI. Tales etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, USPIOS y 19Fluor.

En una realización específica de la presente invención, una composición puede comprender adicionalmente ingredientes accesorios tales como reguladores de PCR, dNTP, una polimerasa, iones como cationes bivalentes o cationes monovalentes, soluciones de hibridación, ligandos de afinidad secundaria, por ejemplo, anticuerpos secundarios, colorantes de detección y cualquier otro compuesto o líquido adecuado necesario para la realización de una detección basada en cualquiera de los ligandos de afinidad o agentes de contraste como se definió aquí más arriba, que son conocidos por los expertos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un ligando de afinidad de ácidos nucleicos o péptido para el producto o proteína de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, controlar o pronosticar el cáncer de próstata, o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición para el cáncer de próstata en un individuo, como se describió más arriba en este documento.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7 y/o una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición para el cáncer de próstata en un individuo, como se describe aquí más arriba. En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso de un aptámero específico para el producto o proteína de expresión de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición para el cáncer de próstata en un individuo, como se describe aquí más arriba.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 o una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7, como se definió aquí más arriba, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición al cáncer de próstata en un individuo, como se describió más arriba en este documento.

En una realización preferida de la presente invención, una composición como se definió aquí más arriba es una composición de diagnóstico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para detectar, diagnosticar, controlar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata o una predisposición para el cáncer de próstata, que comprende un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7 y/o un aptámero específico para el producto o proteína de expresión de PDE4D7 y/o un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.

Normalmente, el kit de diagnóstico de la presente invención contiene uno o más agentes que permiten la detección específica de PDE4D7 como se definió aquí más arriba. Los agentes o ingredientes de un kit de diagnóstico, según la presente invención, pueden estar comprendidos en uno o más contenedores o entidades separadas. La naturaleza de los agentes está determinada por el método de detección al que está destinado el kit. Cuando se pretende la detección a nivel de expresión del ARNm de PDE4D7, es decir, a través del producto de expresión de PDE4D7, los agentes que deben estar comprendidos pueden ser un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7 y/o una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7 como se definió aquí más arriba, que se puede etiquetar opcionalmente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, con las etiquetas descritas aquí arriba. Además, o alternativamente, puede incluirse un aptámero específico para la producción de expresión de PDE4D7. Cuando se pretende la detección al nivel de proteína de PDE4D7, los agentes comprendidos pueden ser anticuerpos o compuestos que contienen un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o variantes de anticuerpo específicas para la proteína de PDE4D7, como se describió más arriba en este documento. Además, o alternativamente, puede incluirse un aptámero específico para la proteína de PDE4D7. Alternativamente, un kit de diagnóstico puede comprender un agente de contraste como se definió aquí más arriba.

La presencia de proteínas específicas también se puede detectar utilizando otros compuestos que interactúan específicamente con PDE4D7, por ejemplo, sustratos o ligandos específicos.

Preferiblemente, un kit de diagnóstico de la presente invención contiene reactivos de detección para el producto de expresión de PDE4D7 o la proteína de PDE4D7. Dichos reactivos de detección comprenden, por ejemplo, soluciones reguladoras, etiquetas o líquidos de lavado, etc. Además, el kit puede comprender una cantidad de una molécula o proteína de ácidos nucleicos conocida, que se puede usar para calibrar el kit o como control interno. Típicamente, un kit de diagnóstico para la detección de productos de expresión de PDE4D7 puede comprender ingredientes accesorios como un tampón de PCR, dNTP, una polimerasa, iones como cationes bivalentes o cationes monovalentes, soluciones de hibridación, etc. Un kit de diagnóstico para la detección de proteínas PDE4D7 también puede comprender ingredientes accesorios como ligandos de afinidad secundaria, por ejemplo, anticuerpos secundarios, colorantes de detección y cualquier otro compuesto o líquido adecuado necesario para la realización de una detección de proteínas basada en el conocimiento de la persona experta en la técnica. Dichos ingredientes son conocidos por el experto en la materia y pueden variar dependiendo del método de detección realizado. Además, el kit puede comprender un folleto de instrucciones y/o puede proporcionar información sobre la relevancia de los resultados obtenidos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en un individuo que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra. El término "determinar el nivel de PDE4D7" se refiere a la determinación de la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo, transcripciones de PDE4D7, y/o la determinación de la presencia y/o cantidad de proteína(s) de PDE4D7. El término "nivel de PDE4D7" significa la presencia o la cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo, transcripciones de PDE4D7 y/o la determinación de la presencia o cantidad de proteínas de PDE4D7. La determinación de la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo, las transcripciones de PDE4D7 o las proteínas de PDE4D7 pueden realizarse por cualquier medio conocido en la técnica.

En una realización preferida de la presente invención, la determinación de la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo, los transcritos de PDE4D7 y/o las proteínas de PDE4D7 se realiza mediante la medición de los niveles de ácidos nucleicos o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7. Por lo tanto, los niveles de expresión de PDE4D7 se pueden determinar mediante un método que involucra la detección de un ARNm codificado por el gen PDE4D7, la detección de la proteína de PDE4D7 codificada por el transcrito de PDE4D7 y/o la detección de la actividad biológica de la proteína de PDE4D7.

Por ejemplo, la medición del nivel de ácidos nucleicos de la expresión de PDE4D7 puede evaluarse mediante la separación de moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN o ADNc) obtenidas de la muestra en geles de agarosa o poliacrilamida, seguida de hibridación con sondas de oligonucleótidos específicas de PDE4D7 como se define aquí más arriba. Alternativamente, el nivel de expresión se puede determinar mediante la marcación de los ácidos nucleicos obtenidos de la muestra seguida de la separación en un gel de secuenciación. Las muestras de ácidos nucleicos pueden colocarse en el gel de modo que el paciente y el control o los ácidos nucleicos estándar estén en carriles adyacentes. La comparación de los niveles de expresión se puede realizar visualmente o por medio de un densitómetro. Los métodos para la detección de ARNm o productos de expresión son conocidos por los expertos en la materia. Típicamente, el análisis de inmunotransferencia Northern puede usarse para tal propósito.

Alternativamente, el nivel de ácidos nucleicos de la expresión de PDE4D7 puede detectarse con una metodología de matriz de ADN o de matriz múltiple. Típicamente, los ácidos nucleicos de la muestra derivados de los sujetos que se van a analizar se procesan y marcan, preferiblemente con una etiqueta fluorescente. Posteriormente, tales moléculas de ácidos nucleicos pueden usarse en una metodología de hibridación con sondas de captura inmovilizadas correspondientes al gen marcador PDE4D7 de la presente invención o biomarcadores conocidos o genes marcadores de cáncer. Los medios adecuados para llevar a cabo análisis de micromatrices son conocidos por los expertos en la materia.

En una configuración estándar, una matriz o una micromatriz de ADN comprende sondas de alta densidad inmovilizadas para detectar varios genes. Las sondas en la matriz son complementarias de una o más partes de la secuencia del gen marcador, o de la región codificante completa del gen marcador. En la presente invención, se puede utilizar cualquier tipo de polinucleótido asociado a PDE4D7 como sonda para la matriz de ADN, siempre que el polinucleótido permita una distinción específica entre la expresión de PDE4D7 y la expresión de otros genes. Típicamente, los ADNc, productos de PCR y oligonucleótidos son útiles como sondas. Preferiblemente, puede usarse como sonda una sonda que involucre las porciones específicas de la variante de empalme 7 de PDE4D. Además de la determinación de la expresión de PDE4D7, también se puede lograr la determinación de la expresión de otros genes, por ejemplo, biomarcadores adicionales o genes marcadores de cáncer.

Un método de detección basado en una matriz o en una micromatriz de ADN comprende típicamente los siguientes pasos: (1) Aislar el ARNm de una muestra y, opcionalmente, convertir el ARNm en ADNc y, posteriormente, marcar este ARN o ADNc. Los métodos para aislar el ARN, convertirlo en ADNc y para etiquetar los ácidos nucleicos se describen en los manuales para la tecnología de micromatrices. (2) Hibridar los ácidos nucleicos del paso 1 con sondas para los genes marcadores. Los ácidos nucleicos de una muestra se pueden marcar con un colorante, como los colorantes fluorescentes Cy3 (rojo) o Cy5 (azul). Generalmente, una muestra de control se marca con un colorante diferente. (3) Detectar la hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con las sondas y determinar al menos cualitativamente, y más en particular, cuantitativamente, las cantidades de ARNm en la muestra para PDE4D7 y/o

genes marcadores adicionales investigados. La diferencia en el nivel de expresión entre la muestra y el control puede estimarse basándose en una diferencia en la intensidad de la señal. Estos pueden medirse y analizarse mediante el software adecuado, como, por ejemplo, el software proporcionado, por ejemplo, por Affymetrix.

5 No hay limitación en el número de sondas correspondientes a los genes marcadores utilizados, que se encuentran en una matriz de ADN. Además, un gen marcador puede estar representado por dos o más sondas, hibridando las sondas con diferentes partes de un gen. Las sondas están diseñadas para cada gen marcador seleccionado. Una sonda de este tipo es típicamente un oligonucleótido que comprende 5-50 residuos de nucleótidos. Los ADN más largos se pueden sintetizar mediante PCR o químicamente. Los métodos para sintetizar tales oligonucleótidos y aplicarlos sobre un sustrato son bien conocidos en el campo de los microarreglos. Otros genes además de los genes marcadores también pueden ser vistos en la matriz de ADN. Por ejemplo, una sonda para un gen cuyo nivel de expresión no está significativamente alterado se puede detectar en la matriz de ADN para normalizar los resultados de los ensayos o para comparar los resultados de múltiples matrices o diferentes ensayos.

15 Alternativamente, el nivel de ácidos nucleicos de la expresión de PDE4D7 se puede detectar en una metodología cuantitativa de RT-PCR, preferiblemente en una metodología de PCR en tiempo real después de la transcripción inversa del transcrito de ARNm de PDE4D7. Típicamente, como primer paso, una transcripción se transcribe a la inversa en una molécula de ADNc de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia. Posteriormente, se puede llevar a cabo una metodología de PCR cuantitativa o en tiempo real basado en una primera hebra de ADN obtenida como se describió más arriba.

Preferiblemente, las sondas Taqman o Molecular Beacon como principales sondas basadas en FRET de este tipo se pueden usar para la detección de PCR cuantitativa. En ambos casos, las sondas, preferiblemente las sondas PDE4D7 como se definen aquí más arriba, sirven como sondas internas que se usan junto con un par de cebadores opuestos que flanquean la región diana de interés, preferiblemente un conjunto de oligonucleótidos PDE4D7 como se definió aquí más arriba. Tras la amplificación de un segmento diana, la sonda puede unirse selectivamente a los productos en una secuencia de identificación entre los sitios del cebador, causando así aumentos en la señalización de FRET en relación con aumentos en la frecuencia objetivo.

30 Preferiblemente, una sonda Taqman para ser utilizada para una metodología de PCR cuantitativa de acuerdo con la presente invención puede comprender un oligonucleótido PDE4D7 como se definió anteriormente de aproximadamente 22 a 30 bases que está marcado en ambos extremos con un par FRET. Por lo general, el extremo 5' tendrá un fluoróforo de longitud de onda más corta, como la fluoresceína (por ejemplo, FAM), y el extremo 3' se marca comúnmente con un interruptor fluorescente de longitud de onda más larga (por ejemplo, TAMRA) o un compuesto desactivador no fluorescente (por ejemplo, Black Hole Quencher). Es preferible que las sondas que se usen para la PCR cuantitativa, en particular las sondas PDE4D7 como se definen aquí más arriba, no tengan guanina (G) en el extremo 5' adyacente al colorante informador para evitar la extinción de la fluorescencia informadora después de que la sonda sea degradada.

40 Una sonda de Baliza Molecular que se utilizará para una metodología de PCR cuantitativa de acuerdo con la presente invención usa preferiblemente las interacciones FRET para detectar y cuantificar un producto de PCR, con cada sonda que tiene un extremo 5' marcado fluorescente y un extremo 3' marcado con un inactivador. Esta configuración de horquilla o tallo-bucle de la estructura de la sonda comprende, preferiblemente, un tallo con dos extremos cortos y autoenlazantes y un bucle con una larga región interna específica de la diana de aproximadamente 20 a 30 bases.

45 Mecanismos de detección alternativos que también pueden emplearse en el contexto de la presente invención se dirigen a una sonda fabricada con solo una estructura de bucle y sin una región de tallo complementaria corta. Una metodología alternativa basada en FRET para la PCR cuantitativa que también se puede utilizar en el contexto de la presente invención, se basa en el uso de dos sondas de hibridación que se unen a sitios adyacentes en la diana, en donde la primera sonda tiene una etiqueta donante fluorescente en el extremo 3' y la segunda sonda tiene una etiqueta de aceptor de fluorescencia en su extremo 5'.

50 La medición de los niveles de proteína de la proteína de PDE4D7 o de cualquier fragmento, homólogo o derivado proveniente de la misma se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica de detección adecuada conocida en la técnica. Preferiblemente, el nivel de proteína de PDE4D7 y sus derivados pueden determinarse inmunológicamente, por ejemplo, utilizando un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7, preferiblemente un anticuerpo como se definió aquí más arriba. Alternativamente, se pueden usar variantes o fragmentos de anticuerpos como se definió aquí más arriba. La presente invención también contempla el uso de ligandos de afinidad de péptidos como aptámeros específicos para la proteína de PDE4D7 como se define anteriormente en este documento.

60 La determinación de los niveles de proteína de la proteína de PDE4D7 se puede lograr, por ejemplo, mediante la separación de proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida, seguido de la identificación de la proteína de PDE4D7 utilizando anticuerpos de unión específica en un análisis de inmunotransferencia de Western. Alternativamente, las proteínas se pueden separar mediante sistemas de electroforesis en gel bidimensional. La electroforesis en gel bidimensional es bien conocida en la técnica y típicamente implica un enfoque isoelectrónico a lo largo de una primera dimensión seguido de electroforesis SDS-PAGE a lo largo de una segunda dimensión. El análisis

de los geles 2D SDS-PAGE se puede realizar determinando la intensidad de las manchas de proteínas en el gel, o se puede realizar mediante inmunodetección. En otras realizaciones, las muestras de proteínas se analizan mediante espectroscopía de masas.

5 En el contexto de la presente invención, los anticuerpos específicos de PDE4D7 pueden colocarse sobre un soporte y ser inmovilizados. Las proteínas derivadas de muestras o tejidos por analizar pueden mezclarse posteriormente con los anticuerpos. Entonces se puede llevar a cabo una reacción de detección, por ejemplo, con un segundo ligando de afinidad como se definió aquí más arriba, preferiblemente con un anticuerpo específico.

10 Los ensayos inmunológicos que se pueden usar en el contexto de la presente invención, en particular para los fines de diagnóstico de la presente invención, incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como inmunotransferencias Western, radioinmunoensayos como RIA (inmunoensayo radioactivo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "en sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, por ejemplo aglutinación en látex, ensayos de fijación del complemento, 15 ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por ejemplo, FIA (inmunoensayo ligado a fluorescencia), inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayo electroquímico (ECLIA) e inmunoensayos de proteína A. Tales ensayos son rutinarios y bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 Además, la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno y la tasa de desconexión de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con un anticuerpo adecuado en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés para un antígeno particular y las tasas de enlace de unión 25 pueden determinarse a partir de los datos mediante cualquier metodología de análisis adecuado, por ejemplo, por un análisis de representación de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno puede incubarse con un anticuerpo adecuado conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

30 Además, los aptámeros específicos para la proteína de PDE4D7, de preferencia como se definen aquí más arriba, se pueden usar en un método para detectar proteínas PDE4D7. Tales aptámeros se pueden marcar preferiblemente para permitir la detección de una interacción proteína-ligando.

35 La determinación de la actividad biológica de PDE4D7 se puede llevar a cabo empleando ensayos moleculares o enzimáticos específicos para la función o funciones correspondientes de PDE4D7. Preferiblemente, se puede usar un sistema de lectura basado en la conversión de cAMP por fosfodiesterasa. Las técnicas adecuadas serían conocidas por el experto en la materia. En una realización preferida adicional, un ensayo para la determinación de la actividad biológica de PDE4D7 se puede llevar a cabo en combinación con la inhibición de la actividad de otras variantes de empalme de PDE4D, otras isoformas de PDE4 y/u otras PDE, preferiblemente otras PDE capaces de realizar la 40 conversión de cAMP. Dicha inhibición de la actividad puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado conocido por el experto en la materia, preferiblemente mediante el uso de nucleótidos antisentido adecuados, moléculas de ARNip o moléculas de miARN, más preferiblemente mediante hibridación de nucleótidos antisentido, moléculas específicas de ARNsi o ARNmi.

45 En una realización preferida adicional, la actividad biológica de PDE4D7 se puede probar con la ayuda de inhibidores específicos de PDE4D7. El uso de tales inhibidores puede, por ejemplo, combinarse con un sistema de lectura basado en la conversión del sustrato de cAMP. Los inhibidores típicos de PDE4D7 que se han de usar comprenden moléculas antisentido, moléculas de ARNip o moléculas de ARNm.

50 El nivel de PDE4D7 también puede detectarse en métodos que involucran procedimientos histológicos o biológicos celulares. Típicamente, se pueden usar técnicas visuales, como microscopía óptica o microscopía de inmunofluorescencia, así como citometría de flujo o luminometría. La presencia de la proteína de PDE4D7 en una célula puede, por ejemplo, detectarse o determinarse mediante la eliminación de las células que se analizarán de las 55 muestras como se definió aquí más arriba. También se pueden usar secciones de tejido o muestras de biopsia para estos métodos. Posteriormente, se pueden aplicar ligandos de afinidad para PDE4D7, preferiblemente anticuerpos o aptámeros. Típicamente, dichos ligandos de afinidad están marcados, preferiblemente con marcadores fluorescentes como se definió aquí más arriba. Dicho procedimiento permite la detección de PDE4D7, para su cuantificación y, además, permite determinar la distribución y el nivel relativo de expresión de la misma.

60 Tales procedimientos implican el uso de métodos de visualización. Los expertos en la técnica conocen métodos de visualización adecuados. Los métodos típicos que se han de utilizar comprenden técnicas fluorométricas, luminométricas y/o enzimáticas. La fluorescencia se detecta y/o cuantifica normalmente al exponer las etiquetas fluorescentes a la luz de una longitud de onda específica y, posteriormente, detectar y/o cuantificar la luz emitida de 65 una longitud de onda específica. La presencia de un ligando de afinidad etiquetado de forma luminiscente se puede

detectar y/o cuantificar por luminiscencia desarrollada durante una reacción química. La detección de una reacción enzimática se debe a un cambio de color en la muestra que surge de la reacción química.

5 En una realización preferida adicional, el nivel de PDE4D7 se puede determinar mediante técnicas de formación de imágenes moleculares adecuadas, por ejemplo, imágenes de resonancia magnética (MRI) o imágenes de fotones magnéticos (MPI), y/o utilizando agentes de contraste adecuados, por ejemplo, agentes de contraste como se definió aquí más arriba.

10 En otra realización preferida, un método para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata de la presente invención comprende la etapa adicional de comparar los niveles medidos de ácidos nucleicos o proteína o la actividad biológica medida a un nivel de control. El término "nivel de control", como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión del marcador PDE4D7 u otros marcadores adecuados en un control canceroso o control no canceroso, como se definió aquí más arriba. El estado, la naturaleza, la cantidad y la condición del nivel de control se pueden ajustar de acuerdo con las necesidades. Preferiblemente se puede usar un nivel de control no canceroso. El término "comparar" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier método adecuado para establecer, calcular, evaluar o procesar datos.

20 En otra realización más, como un paso adicional, una decisión sobre la presencia o el estadio del cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata puede basarse en los resultados del paso de comparación. Un cáncer de próstata puede ser diagnosticado o pronosticado o una progresión del cáncer de próstata puede ser diagnosticada o pronosticada en dicho método de acuerdo con las definiciones correspondientes proporcionadas anteriormente en el presente documento en el contexto de PDE4D7 como marcador de cáncer de próstata.

25 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar, controlar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos las etapas de:

(a) analizar, en al menos una muestra obtenida de al menos un individuo sospechoso de padecer cáncer de próstata, la expresión del producto de expresión de PDE4D7 o la proteína de PDE4D7;

30 (b) probar, en al menos una muestra de control obtenida de al menos un individuo que no padece cáncer, la expresión del producto de expresión de PDE4D7 o la proteína de PDE4D7;

(c) determinar la diferencia en la expresión de los pasos (a) y (b); y

35 (d) decidir la presencia o el estadio del cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en función de los resultados obtenidos en el paso (c).

40 En una realización, los pasos a), b), c) y/o d) de este método de diagnóstico pueden realizarse fuera del cuerpo humano o animal, por ejemplo, en muestras obtenidas de un paciente o individuo.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata resistente a hormonas o la progresión hacia el cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho método discrimina entre un cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas, comprendiendo los pasos de

(a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;

(b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;

50 (c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y

(d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado elegido para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte entre aproximadamente 1 y 7, preferiblemente alrededor de 5.

55 El nivel de PDE4D7 puede determinarse sobre el ácido nucleico, la proteína o el nivel de actividad como se describió más arriba en este documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de transcripciones y/o proteína de PDE4D7. Además, se puede determinar el nivel de un gen de referencia en una muestra. El término "gen de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier gen adecuado, por ejemplo, a cualquier gen, producto genético, producto de expresión, proteína o variante de expresión constante y continuamente detectable en el organismo de elección. El término también incluye productos genéticos tales como proteínas expresadas, péptidos, polipéptidos, así como variantes modificadas de los mismos. Por lo tanto, la invención también incluye proteínas de referencia derivadas de un gen de referencia. También se incluyen todos los tipos de transcripciones derivables del gen de referencia, así como las modificaciones del mismo o los parámetros secundarios vinculados al mismo.

Alternativa o adicionalmente, también pueden usarse otros parámetros de referencia con fines de referencia, por ejemplo, concentraciones metabólicas, tamaños celulares, etc.

La expresión puede llevarse a cabo preferiblemente en la misma muestra, es decir, el nivel de PDE4D7 y del gen de referencia se determinan en la misma muestra. Si las pruebas se llevan a cabo en la misma muestra, se puede realizar una detección única o una metodología de detección múltiple como se describe en este documento. Preferiblemente, para una detección múltiple, se pueden usar los oligonucleótidos y las sondas que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 7, 8 y 9. Para la realización de la detección multiplex, se puede modificar la concentración de cebadores y/o oligonucleótidos de sonda. Además, la concentración y la presencia de otros ingredientes como reguladores, iones, etc. pueden modificarse, por ejemplo, incrementarse o disminuirse en comparación con las indicaciones de los fabricantes.

En una realización específica de la presente invención, se puede determinar la expresión de más de un gen de referencia o un gen expresado de manera constante. Por ejemplo, se puede determinar la expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30 o más genes de referencia. Los resultados de tales mediciones pueden calcularse por separado o combinarse para obtener un índice de expresión promedio. Además, el patrón de expresión del gen de referencia se puede determinar y/o usar como base para los pasos subsiguientes. Dicho patrón puede basarse en comportamientos de expresión conocidos de genes en ciertos cánceres, en particular estadios o estados de cáncer de próstata.

Además, los resultados de la expresión pueden compararse con resultados ya conocidos de casos de referencia o bases de datos. La comparación puede incluir además un procedimiento de normalización para mejorar la relevancia estadística de los resultados.

En una realización alternativa de la presente invención, en lugar de determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra, se puede determinar la expresión de un marcador de cáncer adicional o un gen expresado de manera no constante. Por ejemplo, se puede determinar la expresión de un gen, del que se sabe que se reduce durante el cáncer de próstata resistente a hormonas, o del que se sabe que aumenta durante el cáncer de próstata sensible a hormonas.

En una realización adicional, también se pueden llevar a cabo ambas determinaciones de expresión, es decir, la determinación de la expresión de un gen de referencia y de un gen de cáncer o biomarcador adicional.

Los resultados de la expresión pueden normalizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, por ejemplo, de acuerdo con los métodos estadísticos de normalización como el puntaje estándar, la prueba T de Student, la prueba residual estudiantil, la prueba de momento estandarizado o la prueba de variación de coeficiente. Típicamente, tales pruebas o fórmulas correspondientes, que serían conocidas por los expertos en la técnica, se usarían para estandarizar los datos de expresión para permitir la diferenciación entre las variaciones reales en los niveles de expresión de genes y las variaciones debidas a los procesos de medición.

Sobre la base de los resultados de expresión obtenidos en los pasos (a) y (b) y/o los resultados normalizados obtenidos en el paso (c), se puede realizar una comparación con un valor de corte para la expresión de PDE4D7. El valor de corte por debajo del cual el nivel de expresión de PDE4D7 es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, excluyendo así el cáncer de próstata sensible a hormonas o las formas tumorales, está entre aproximadamente 0.75 y 8, 0.75 y 7.5, 0.75 y 7, 0.75 y 6.5, 0.75 y 6, 0.75 y 6, 0.75 y 5.5, 0.75 y 5.5, 1.0 y 8, 1.25 y 8, 1.5 y 8, 1.75 y 8, 2 y 8, 2.25 y 8, 2.5 y 8, 2.75 y 8, 3 y 8, 3.25 y 8, 3.5 y 8, 3.75 y 8, 4 y 8, 4.25 y 8, 4.5 y 8, 4.75 y 8 o 5 y 8. Lo más preferido es un valor de corte de aproximadamente 5, por ejemplo 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1 o 5.9, 5.8, 5.7, 5.6, 5.5, 5.4, 5.3, 5.2 o 5.1. En una realización particularmente preferida, dicho corte debe usarse con un gen de mantenimiento como gen de referencia. Aún más preferiblemente, dicho corte debe usarse con GAPDH y/o PBGD como gen de referencia.

En una realización preferida de la presente invención, el valor de corte es un valor de corte para PDE4D7 en muestras de sangre, por ejemplo. Muestras de suero o plasma, muestras de orina o muestras de sedimentos urinarios. En una realización particularmente preferida de la presente invención, el valor de corte es un valor de corte para la proteína o polipéptido PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se definió aquí más arriba en una muestra de orina. En otra realización particularmente preferida de la presente invención, el valor de corte es un valor de corte para la proteína o polipéptido PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se definió aquí más arriba en células contenidas en orina o exosomas secretados de células contenidas en orina. En una realización aún más preferida de la presente invención, el valor de corte es un valor de corte para la proteína o polipéptido PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se definió aquí más arriba en una muestra de sedimento de orina y células contenidas en una muestra de sedimento de orina, o exosomas secretados por células contenidas en una muestra de sedimento urinario.

Si la expresión de PDE4D7 medida y/o normalizada está por encima del valor de corte indicado, esto puede verse como una indicación de que el individuo no sufre de un cáncer de próstata resistente a hormonas. El valor puede indicar adicionalmente que el individuo padece un cáncer de próstata distinto del cáncer de próstata resistente a hormonas, en particular el cáncer de próstata dependiente de hormonas o el cáncer de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de adquisición de datos que comprende al menos las etapas de:

(a) probar en un individuo la expresión de PDE4D7; y

(b) comparar la expresión determinada en el paso (a) con un nivel de control.

Las pruebas de expresión de PDE4D7 se pueden llevar a cabo de acuerdo con los pasos que se definen anteriormente en este documento. Preferiblemente, la prueba se puede llevar a cabo como medición de los niveles de ácidos nucleicos o proteína de PDE4D7 o determinando la actividad biológica de PDE4D7, más preferiblemente de acuerdo con las opciones descritas anteriormente en este documento para tales mediciones. La prueba puede llevarse a cabo en un individuo, es decir, in vivo, o fuera del individuo, es decir, ex vivo o in vitro. El término "nivel de control", tal como se utiliza en el contexto del método de adquisición de datos, se refiere a la expresión del marcador PDE4D7 u otros marcadores adecuados en un control canceroso o control no canceroso, como se definió aquí más arriba. El estado, la naturaleza, la cantidad y la condición del nivel de control se pueden ajustar de acuerdo con las necesidades. Preferiblemente se puede usar un nivel de control no canceroso. Más preferiblemente, se puede usar un nivel de control derivado de las etapas del cáncer de próstata sensible a hormonas. Una comparación de la expresión con un nivel de control puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier método adecuado de establecimiento, cálculo, evaluación o procesamiento de datos y, en particular, tiene como objetivo la detección de diferencias entre dos conjuntos de datos. Se puede llevar a cabo una evaluación estadística de la importancia de la diferencia. Los métodos estadísticos adecuados son conocidos por el experto en la materia. Los datos e información obtenidos pueden almacenarse, acumularse o procesarse mediante métodos informáticos o métodos informáticos adecuados o herramientas conocidas por el experto en la materia y/o presentarse de manera adecuada para permitir al profesional utilizar los datos para uno o más pasos de deducciones o conclusiones subsecuentes.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, controlar o pronosticar el cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos las etapas de:

(a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7,

(b) probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7,

(c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de los pasos (a) y (b); y

(d) decidir la presencia o el estadio del cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en función de los resultados obtenidos en el paso (c).

El inmunoensayo se basa preferiblemente en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a PDE4D7, por ejemplo, uno o más de los anticuerpos PDE4D7 mencionados aquí. Alternativamente, el inmunoensayo puede llevarse a cabo o combinarse con cualquier otro agente adecuado. Por ejemplo, el ensayo puede combinarse con la detección de ácidos nucleicos, o métodos de prueba enzimáticos como se describe en el presente documento.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para discriminar entre un cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas, que comprende las etapas de

(a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;

(b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;

(c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y

(d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado elegido para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte está entre aproximadamente 1 y 7. Preferiblemente, el valor de corte es aproximadamente 5.

El nivel de PDE4D7 se puede determinar preferiblemente en el nivel de proteína o actividad tal como se describe en el presente documento anteriormente. Se prefiere la determinación de la cantidad de proteína de PDE4D7 con la ayuda de anticuerpos específicos de PDE4D7, por ejemplo, uno o más de los anticuerpos PDE4D7 mencionados aquí. Alternativamente, el inmunoensayo puede llevarse a cabo con cualquier otro agente adecuado o combinarse con la determinación de otras entidades. Por ejemplo, el ensayo puede combinarse con la detección de la presencia o cantidad de ácidos nucleicos, o métodos de prueba enzimáticos como se describe en el presente documento.

Además, se puede determinar el nivel de un gen de referencia como se definió aquí más arriba en una muestra. Para la detección de un gen de referencia, la cantidad del producto de expresión del gen (es decir, la proteína) se puede determinar, preferiblemente con la ayuda de uno o más anticuerpos adecuados conocidos por los expertos en la

técnica. Alternativamente, la determinación del gen de referencia puede llevarse a cabo con cualquier otro agente adecuado o combinarse con la detección de la presencia o cantidad de ácidos nucleicos, o métodos de prueba enzimáticos como se describe en el presente documento.

5 Sobre la base de los resultados de expresión obtenidos en los pasos (a) y (b) y/o los resultados normalizados obtenidos en el paso (c), se puede realizar una comparación con un valor de corte para la expresión de PDE4D7. El valor de corte por debajo del cual el nivel de expresión de PDE4D7 es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, excluyendo así el cáncer de próstata sensible a hormonas o las formas tumorales en el inmunoensayo está entre aproximadamente 0.75 y 8, 0.75 y 7.5, 0.75 y 7, 0.75 y 6.5, 0.75 y 6, 0.75 y 6, 0.75 y 5.5, 0.75 y 5.5, 1.0 y 8, 1.25 y 8, 1.5 y 8, 1.75 y 8, 2 y 8, 2.25 y 8, 2.5 y 8, 2.75 y 8, 3 y 8, 3.25 y 8, 3.5 y 8, 3.75 y 8, 4 y 8, 4.25 y 8, 4.5 y 8, 4.75 y 8 o 5 y 8. Lo más preferido es un valor de corte de aproximadamente 5, por ejemplo 4.9, 4.8, 4.7, 4.6, 4.5, 4.4, 4.3, 4.2, 4.1 o 5.9, 5.8, 5.7, 5.6, 5.5, 5.4, 5.3, 5.2 o 5.1.

15 El valor de corte puede ser un valor de corte para PDE4D7 en muestras de sangre, por ejemplo, muestras de suero o plasma, muestras de orina o muestras de sedimento de orina, etc., tal como se describe a continuación.

20 Si la expresión de PDE4D7 medida y/o normalizada está por encima del valor de corte indicado, esto puede verse como una indicación de que el individuo no sufre de un cáncer de próstata resistente a hormonas. El valor puede indicar adicionalmente que el individuo padece un cáncer de próstata distinto del cáncer de próstata resistente a hormonas, en particular el cáncer de próstata dependiente de hormonas o el cáncer de próstata sensible a hormonas.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para identificar a un individuo para elegibilidad para la terapia del cáncer de próstata que comprende:

25 (a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;

(b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;

30 (c) clasificar los niveles de expresión del paso (a) en relación con los niveles del paso (b); y

(d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia para el cáncer de próstata donde la muestra del individuo se clasifica como de un nivel reducido de expresión de PDE4D7.

35 El nivel de PDE4D7 puede determinarse sobre el ácido nucleico, la proteína o el nivel de actividad como se describió más arriba en este documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de transcripciones y/o proteína de PDE4D7. Además, se puede determinar el nivel de un gen de referencia en una muestra como se describió más arriba. Las pruebas para la expresión de un gen de referencia pueden llevarse a cabo en la misma muestra utilizada para la determinación de PDE4D7. Si la prueba se lleva a cabo en la misma muestra, se puede realizar una detección única o una metodología de detección múltiple. Preferiblemente, para una detección múltiple, se pueden usar los oligonucleótidos y las sondas que tienen la secuencia de SEQ ID NO: 7, 8 y 9. Para la realización de la detección multiplex, se puede modificar la concentración de cebadores y/o oligonucleótidos de sonda. Además, la concentración y la presencia de otros ingredientes como reguladores, iones, etc. pueden modificarse, por ejemplo. Incrementado o disminuido en comparación con las indicaciones de los fabricantes. Alternativamente, la prueba para la expresión de un gen de referencia puede llevarse a cabo en una muestra diferente, preferiblemente una muestra de control como se definió aquí más arriba. Preferiblemente, tal muestra de control puede ser una muestra de control del mismo individuo que la muestra de prueba, o una muestra de control derivada de una fuente o individuo diferente. La muestra de control puede ser además una muestra derivada del mismo tejido, preferiblemente tejido de próstata, o derivada de un tipo de tejido diferente. Ejemplos de tipos de tejido alternativos preferidos son tejido de próstata estromal, tejido epitelial de vejiga y tejido epitelial de uretra.

Además, se pueden combinar la prueba de la muestra de prueba para la expresión de un gen de referencia y la prueba de la muestra de control para la expresión de PDE4D7.

55 En una realización adicional, la muestra de control también puede analizarse para determinar la expresión del gen de referencia. En caso de que se analice más de una muestra para determinar la expresión de un gen de referencia, los resultados de la expresión obtenidos se pueden comparar y/o promediar o normalizar de acuerdo con cualquier método estadístico adecuado conocido por el experto en la materia.

60 El término "clasificar los niveles de expresión de la etapa (a) en relación con los niveles de la etapa (b)" como se usa en este documento significa que la expresión en una muestra de prueba para PDE4D7 y la expresión en una muestra de control para PDE4D7 se comparan, por ejemplo, después de la normalización frente a referencias de normalización adecuadas. De acuerdo con el resultado de la comparación, se indica que la muestra de prueba proporciona una expresión similar a la muestra de control, una expresión aumentada en comparación con la muestra de control o una expresión reducida en comparación con la muestra de control. El término significa además que se comparan la expresión en una muestra de prueba para PDE4D7 y la expresión en la misma muestra de prueba para un gen de

referencia, por ejemplo, después de la normalización contra un gen adicional como referencia de normalización. De acuerdo con el resultado de la comparación, se indica que la muestra de prueba proporciona una expresión similar al gen de referencia, una expresión aumentada en comparación con el gen de referencia o una expresión reducida en comparación con el gen de referencia.

5 De acuerdo con la clasificación de los resultados de la expresión, se puede considerar que un individuo es elegible para una terapia de cáncer de próstata cuando se reducen los niveles de expresión de PDE4D7. El nivel de expresión se considera "reducido" cuando la expresión del gen PDE4D7 en la muestra de prueba se reduce, por ejemplo, en 10 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más del 50% en comparación con la expresión de PDE4D7 en una muestra de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces o más en comparación con la expresión de PDE4D7 en una muestra de control; o cuando la expresión del gen PDE4D7 disminuye, por ejemplo, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, o más del 50% en comparación con la expresión de un gen de referencia en una muestra de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces 15 más disminuido en comparación con la expresión de un gen de referencia. En una realización específica, la expresión de un gen de referencia también puede normalizarse o ajustarse a la expresión de genes o marcadores adicionales, por ejemplo, genes domésticos.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un inmunoensayo para estratificar un individuo o cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer de próstata que comprende:

(a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;

25 (b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;

(c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de la etapa (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b); y

30 (d) estratificar un individuo o cohorte de individuos para el tratamiento del cáncer de próstata según los resultados obtenidos en el paso (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel reducido de expresión de PDE4D7.

35 La prueba de la expresión de PDE4D7 puede llevarse a cabo preferiblemente a través de la determinación de la cantidad de proteína de PDE4D7 o la determinación del nivel de actividad de PDE4D7 como se describe aquí más arriba. Se prefiere la determinación de la cantidad de proteína de PDE4D7 con la ayuda de anticuerpos específicos de PDE4D7, por ejemplo, uno o más de los anticuerpos PDE4D7 mencionados aquí. Alternativamente, el inmunoensayo puede llevarse a cabo con cualquier otro agente adecuado o combinarse con la determinación de otras entidades. Por ejemplo, el ensayo puede combinarse con la detección de la presencia o cantidad de ácidos nucleicos, o métodos de prueba enzimáticos como se describe en el presente documento. Además, se puede determinar el nivel 40 de un gen de referencia como se describió más arriba en una muestra. Las pruebas para la expresión de un gen de referencia pueden llevarse a cabo en la misma muestra utilizada para la determinación de PDE4D7. Si la prueba se lleva a cabo en la misma muestra, se puede realizar una detección única o una metodología de detección paralela o múltiple. Preferiblemente, para una detección paralela o múltiple, se pueden usar anticuerpos primarios o secundarios marcados de manera diferente.

45 Alternativamente, la prueba para la expresión de un gen de referencia se puede llevar a cabo en una muestra diferente, preferiblemente una muestra de control como se definió aquí más arriba. Preferiblemente, tal muestra de control puede ser una muestra de control del mismo individuo que la muestra de prueba, o una muestra de control derivada de una fuente o individuo diferente. La muestra de control puede ser además una muestra derivada del mismo tejido, preferiblemente tejido de próstata, o derivada de un tipo de tejido diferente. Ejemplos de tipos de tejido alternativos 50 preferidos son tejido estromal de próstata, tejido epitelial de vejiga y tejido epitelial de uretra. Además, pueden combinarse la prueba de la muestra de prueba para la expresión de un gen de referencia y la prueba de la muestra de control para la expresión de PDE4D7.

55 En una realización adicional, la muestra de control también puede analizarse para determinar la expresión del gen de referencia. En caso de que se analice más de una muestra para determinar la expresión de un gen de referencia, los resultados de la expresión obtenidos se pueden comparar y/o promediar o normalizar de acuerdo con cualquier método estadístico adecuado conocido por el experto en la materia.

60 El término "determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de la etapa (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b)" como se usa aquí significa que la expresión en una muestra de prueba para PDE4D7 y la expresión en una muestra de control para PDE4D7 se compara, por ejemplo, después de la normalización frente a referencias de normalización adecuadas. De acuerdo con el resultado de la comparación, se indica que la muestra de prueba proporciona una expresión similar a la muestra de control, una expresión aumentada en comparación con la muestra de control o una expresión reducida en comparación con la muestra de control. El término significa además 65 que, alternativamente o adicionalmente, se comparan la expresión en una muestra de prueba para PDE4D7 y la

expresión en la misma muestra de prueba para un gen de referencia, por ejemplo, después de la normalización contra un gen adicional como referencia de normalización. De acuerdo con el resultado de la comparación, se indica que la muestra de prueba proporciona una expresión similar al gen de referencia, o una diferencia en la expresión. La diferencia puede ser una expresión aumentada en comparación con el gen de referencia o una expresión reducida en comparación con el gen de referencia.

El término "estratificar a un individuo o cohorte de individuos a terapia de cáncer de próstata" como se usa en este documento significa que un individuo se identifica como perteneciente a un grupo de individuos similares, cuya forma de terapia óptima es una terapia de cáncer de próstata, preferiblemente una terapia contra cáncer de próstata resistente a hormonas de acuerdo con el resultado de la prueba de expresión como se describe aquí más arriba, en particular de acuerdo con la diferencia encontrada en el nivel de expresión de PDE4D7 y un gen de referencia o el nivel de expresión de PDE4D7 en diferentes muestras. De acuerdo con la determinación de la diferencia de expresión, un individuo puede identificarse como perteneciente a un grupo de individuos similares cuya forma de terapia óptima es la terapia del cáncer de próstata cuando se reducen los niveles de expresión de PDE4D7. El nivel de expresión se considera "reducido" cuando la expresión del gen PDE4D7 en la muestra de prueba se reduce, por ejemplo, en 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% o más del 50% en comparación con la expresión de PDE4D7 en una muestra de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces o más en comparación con la expresión de PDE4D7 en una muestra de control; o cuando la expresión del gen PDE4D7 disminuye, por ejemplo, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, o más del 50% en comparación con la expresión de un gen de referencia en una muestra de control, o al menos 0.1 veces, al menos 0.2 veces, al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces o más disminuido en comparación con la expresión de un gen de referencia. En una realización específica, la expresión de un gen de referencia también puede normalizarse o ajustarse a la expresión de genes o marcadores adicionales, por ejemplo, genes cuidadores.

Un individuo que se considera elegible para una terapia de cáncer de próstata o que está siendo estratificado a una terapia de cáncer de próstata como se describe aquí más arriba puede recibir cualquier tratamiento terapéutico adecuado para el cáncer de próstata conocido por el experto en la materia. Típicamente, puede considerarse que un individuo considerado elegible para la terapia del cáncer de próstata, o estratificado a un grupo de tratamiento correspondiente, debido a la reducción de la expresión de PDE4D7, padece un cáncer de próstata resistente a hormonas o es propenso a desarrollar en el futuro un cáncer de próstata resistente a hormonas, por ejemplo, dentro de los próximos 1 a 24 meses. Una persona individualmente identificada o estratificada puede tratarse con una composición farmacéutica. En una realización adicional, un individuo identificado de manera correspondiente puede tratarse con una composición farmacéutica en combinación con una terapia adicional contra el cáncer. El término "terapia adicional contra el cáncer" se refiere a cualquier tipo de terapia contra el cáncer conocida por el experto en la materia. Se prefieren las formas de terapia del cáncer conocidas para el cáncer de próstata resistente a hormonas. El término incluye, por ejemplo, todas las formas adecuadas de quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapias con anticuerpos, etc.

Alternativamente, un individuo identificado o estratificado también puede tratarse únicamente con una o más terapias contra el cáncer, como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapias con anticuerpos, etc. Se prefieren las terapias contra el cáncer usadas típicamente para el cáncer de próstata, más preferidas son las terapias contra el cáncer usadas para el cáncer de próstata resistente a hormonas.

En una realización adicional de la presente invención, el método de clasificación para elegibilidad o el inmunoensayo para la estratificación como se describió más arriba en este documento también se puede usar para monitorizar el tratamiento de un individuo, por ejemplo, un individuo clasificado como que sufre de un cáncer de próstata resistente a hormonas. El proceso de monitorización se puede llevar a cabo como determinación de la expresión durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, durante o después de las sesiones de tratamiento, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 meses, o 1, 2, 3 o más años. Los pasos de determinación se pueden llevar a cabo en intervalos adecuados, por ejemplo, cada semana, 2 semanas, 3 semanas, cada mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 12 meses, etc. En una realización adicional de la presente invención, se puede ajustar cualquier esquema de tratamiento como se menciona aquí anteriormente, por ejemplo, ejecutado o atenuado, o alterado de cualquier manera adecuada en correspondencia con los resultados del proceso de monitorización.

La prueba para la expresión de PDE4D7 se puede llevar a cabo de acuerdo con los pasos que se definen anteriormente en este documento. Preferiblemente, la prueba puede llevarse a cabo como medición de los niveles de proteína de PDE4D7, más preferiblemente de acuerdo con las opciones descritas anteriormente en el presente documento para tales mediciones. Como controles o muestras de control se pueden usar controles como se definió aquí más arriba. En una realización particularmente preferida, los pasos de prueba pueden basarse en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a PDE4D7, por ejemplo, un anticuerpo anti-PDE4D7 disponible comercialmente como NB300-652 o GTX14629. Un cáncer puede ser diagnosticado o pronosticado o una progresión de cáncer puede ser diagnosticado o pronosticado en dicho inmunoensayo o un individuo puede ser identificado para elegibilidad para el cáncer de próstata, o un individuo o cohorte de individuos puede ser estratificado en un inmunoensayo de acuerdo con las definiciones correspondientes proporcionado aquí anteriormente en el contexto de la PDE4D7 como marcador de cáncer. Por consiguiente, dicha prueba o determinación de la expresión de PDE4D7 puede realizarse, o puede

realizarse adicionalmente, mediante la medición de los niveles de ácidos nucleicos o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7. Se pueden realizar mediciones similares con respecto al gen de referencia.

5 En una realización particularmente preferida de la presente invención, el gen de referencia es un gen de mantenimiento o una fosfodiesterasa diferente. En organismos humanos, los ejemplos de "genes de mantenimiento" incluyen, entre otros, β -actina, glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), porfobilinógeno desaminasa (PBGD) y proteína ribosómica P1. Aparte de estos genes, cualquier otro gen adecuado se puede usar como gen doméstico, siempre que el gen muestre una expresión o transcripción en un nivel constante, no modificado, en particular durante diferentes etapas del desarrollo del cáncer, más preferiblemente durante diferentes etapas del desarrollo del cáncer de próstata, más preferiblemente durante la transición del cáncer de próstata sensible a hormonas a estados de cáncer de próstata resistentes a hormonas. Particularmente preferido es el gen o transcripción o producto de expresión o proteína de GAPDH. Más particularmente preferido es el gen o transcripción o producto de expresión o proteína de PBGD. Los datos de expresión de un gen doméstico pueden obtenerse a partir de una o más muestras del mismo individuo o de más individuos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 1000, 5000, 10000 o más. Los datos de expresión también se pueden obtener de las bases de datos o de las colecciones de datos disponibles para el experto en la materia.

20 El término "fosfodiesterasa diferente", como se usa en el presente documento, se refiere a otras fosfodiesterasas que no son PDE4D7. Dichas fosfodiesterasas, para ser adecuadas como genes de referencia, deben expresarse de manera constante y proporcionar un producto génico, producto de expresión, proteína o proteína continuamente detectable en el organismo de elección. Son particularmente preferidas las fosfodiesterasas de la familia PDE4D por ejemplo PDE4D1, PDE4D2, PDE4D3, PDE4D4, PDE4D5, PDE4D6, PDE4D8 y PDE4D9. Más preferida es la fosfodiesterasa PDE4D5.

25 Por consiguiente, la normalización y/o la comparación con GAPDH, PBGD y en particular PDE4D5 pueden usarse preferiblemente para los métodos de diagnóstico e inmunoensayos basados en puntos de corte, los métodos de identificación o los inmunoensayos para discriminar o estratificar individuos, descritos anteriormente. Las etapas de determinación correspondientes pueden llevarse a cabo en reacciones separadas o, de forma particularmente preferida, en reacciones multiplex. Para la realización de la detección multiplex, se puede modificar la concentración de cebadores y/o oligonucleótidos de sonda. Además, la concentración y la presencia de otros ingredientes como reguladores, iones, etc., pueden modificarse, por ejemplo, incrementarse o disminuirse en comparación con las indicaciones de los fabricantes. En una realización adicional de la presente invención, el método de identificación de un individuo para elegibilidad para la terapia de cáncer de próstata basado en la expresión de PDE4D7 como se describió más arriba en este documento puede combinarse adicionalmente con uno o más métodos de identificación similares, basados en la expresión de uno o más biomarcadores diferentes. Se refiere la determinación del nivel de antígeno prostático específico (PSA). Por lo tanto, si el nivel de PSA se encuentra en 10, 20, 30 o preferiblemente por encima de 5.0, se puede considerar que un individuo padece cáncer de próstata resistente a hormonas, o es probable que desarrolle cáncer de próstata resistente a hormonas en un futuro cercano, es decir, dentro de los próximos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 meses.

45 En una realización preferida de la presente invención, el diagnóstico, detección, seguimiento o pronóstico tal como se mencionó anteriormente se debe llevar a cabo en una muestra obtenida de un individuo. El término "muestra obtenida de un individuo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material biológico obtenido de un individuo a través de métodos adecuados conocidos por los expertos en la materia. La muestra utilizada en el contexto de la presente invención debe recogerse preferiblemente de una manera clínicamente aceptable, más preferiblemente de una manera que se conserven los ácidos nucleicos (en particular el ARN) o las proteínas.

50 Las muestras biológicas pueden incluir tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, sudor, esputo o saliva, semen y orina, así como heces o muestras fecales. Además, la muestra biológica puede contener un extracto celular derivado de o una población celular que incluye una célula epitelial, preferiblemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial derivada de tejido de la cual se sospecha que es cancerosa. Incluso más preferiblemente, la muestra biológica puede contener una población celular derivada de un tejido glandular, por ejemplo, la muestra puede derivarse de la próstata de un individuo masculino. Además, las células pueden purificarse a partir de los tejidos y fluidos corporales obtenidos, si es necesario, y luego usarse como muestra biológica.

Las muestras, en particular después del procesamiento inicial, pueden agruparse. Sin embargo, también se pueden utilizar muestras no agrupadas.

60 En una realización específica de la presente invención, el contenido de una muestra biológica también puede someterse a una etapa de enriquecimiento. Por ejemplo, una muestra puede ponerse en contacto con ligandos específicos para la membrana celular u orgánulos de ciertos tipos de células, por ejemplo, células prostáticas, funcionalizados por ejemplo con partículas magnéticas. El material concentrado por las partículas magnéticas se puede usar posteriormente para las etapas de detección y análisis como se describe aquí más arriba o más adelante.

65

En una realización específica de la invención, pueden obtenerse y/o usarse muestras de biopsia o resección. Dichas muestras pueden comprender células o lisados celulares.

5 Además, pueden enriquecerse células, por ejemplo, células tumorales mediante procesos de filtración de muestras fluidas o líquidas, por ejemplo, sangre, orina, sudor, etc. Tales procesos de filtración también pueden combinarse con pasos de enriquecimiento basados en interacciones específicas de ligando como se describió más arriba en este documento.

10 En una realización particularmente preferida de la presente invención, una muestra puede ser una muestra de tejido, una muestra de orina, una muestra de sedimento de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de semen, una muestra que comprende células tumorales circulantes o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata.

15 El cáncer por diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar o cuya progresión se diagnostica, detecta, monitorizar o pronostica, es el cáncer de próstata.

20 En otra realización particularmente preferida de la presente invención, el cáncer por diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar o cuya progresión se diagnostica, detecta, monitoriza o pronostica es el cáncer de próstata resistente a hormonas. El término "cáncer de próstata resistente a hormonas" significa que el crecimiento y la proliferación del cáncer de próstata o de líneas celulares de cáncer de próstata es resistente a la estimulación de la hormona sexual masculina. El término también se relaciona con una etapa tardía de desarrollo del cáncer de próstata que ya no es susceptible de administración de antihormonas, preferiblemente antiandrógenos como se definió aquí más arriba.

25 Típicamente, la progresión del cáncer de próstata se acompaña de un cambio en la dependencia de los controles endocrinos a los controles paracrinos y eventualmente autocrinos, y se cree que este proceso complejo es el resultado de cambios que ocurren en los niveles moleculares del control celular. Debido a la posibilidad de diseminación metastásica de tumores en esta etapa, los cánceres de próstata resistentes a hormonas son un objetivo principal para el diagnóstico y los tratamientos de acuerdo con la presente invención, en particular de acuerdo con las realizaciones proporcionadas anteriormente.

30 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan con fines ilustrativos. Por lo tanto, se entiende que el ejemplo y las figuras no deben interpretarse como limitantes. El experto en la materia claramente podrá contemplar modificaciones adicionales de los principios establecidos en este documento.

35 **Ejemplos:**

Ejemplo 1 - Ensayo cuantitativo por RT-PCR de líneas celulares humanas y xenoinjertos de tejido humano

40 A partir de las líneas celulares y xenoinjertos de tejido humano representados en la Figura 1 (véase también para más detalles Marques et al., 2006, Eur. Urol., 49(2): 245-57) el ARN fue aislado y transcrito por procedimientos estándar en ADNc. Los ADNc preparados de las muestras "PC346P xenoinjerto" a través de "346Flu2" que son líneas celulares y las muestras "PC295" a "PC374" que son xenoinjertos se analizaron en los niveles de expresión de PDE4D7.

45 qRT-PCR: Materiales y Métodos

Las muestras de ARN se trataron con DNasa para asegurar que no hubiera contaminación de ADN. Antes de la síntesis de ADNc, las muestras de ARN se trataron con DnaseI (In Vitrogen) durante 30 minutos a 37°C. Luego se trató 1 µg de la muestra de ARN con Superscript Vilo (In Vitrogen) para sintetizar la primera hebra de ADN para el análisis de qPCR según las pautas del fabricante. Las muestras de ADN se trataron con RnaseH1 30 min a 37°C.

50 El ADN resultante se diluyó a una concentración final de 50-60 ng/µl, de los cuales se agregaron 5 µl a cada pozo de reacción de una placa de reacción óptica de 96 pozos.

55 Las reacciones de PCR cuantitativas se realizaron utilizando una máquina ABI Prism 7300 en un volumen de reacción de 15 µl de acuerdo con el siguiente protocolo:

7.5 µl Platinum qPCR SuperMix-UDG con ROX (InVitrogen)

60 2.2 µl de agua libre de nucleasas

0.1 µl de 100 pmol/µl de sonda

0.1 µl 100 pmol/µl de cebador directo

65 0.1 µl 100 pmol/µl de cebador inverso

ES 2 700 877 T3

El volumen total en cada pozo de reacción fue de 15 µl, incluido el ADNc.

La propia PCR se ejecutó durante 40 ciclos bajo el siguiente programa:

Etapa	Repeticiones	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	50	2 segundos
2	1	95	2 minutos
3	40	95	15 segundos
		60	1 minuto

5

Cebadores y sondas qRT-PCR (TAQMAN)

Los siguientes cebadores y sondas de oligonucleótidos se usaron para RT-PCR en PDE4D7:

10

Primer delantero 5'-TGCCTCTGAGGAAACTAC-3' (SEQ ID NO: 3), Cebador inverso 5'-GCTGAATATTGCGACATGAAAG-3' (SEQ ID NO: 4) que da origen a un producto de la longitud 101.

15

Como sonda, se utilizó la secuencia 5'-CCAGTAATGAAGAGGAAGACCCTTTCCGC-3' (SEQ ID NO: 5).

20

Los conjuntos de sondas se diseñaron para dirigirse a las regiones N-terminales únicas de la isoforma PDE. El amplicón fue diseñado para estar dentro del rango óptimo para los ensayos Taqman en la tecnología ABI Prism. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado para maximizar la integridad de los datos. También se incluyó una sonda de referencia GAPDH a la que se hizo referencia con todos los datos consecutivos.

qRT-PCR: análisis de datos

25

Se llevó a cabo una metodología de -ddCt para normalizar y comparar diferentes experimentos de RT-PCR. Los valores de Ct se obtuvieron por observación manual de umbral donde cada conjunto de sondas se amplificó exponencialmente a una eficiencia comparable. En particular, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

30

1.) La diferencia en el número de ciclo (Ct) entre la referencia y el gen de interés (GAPDH restada del gen de interés) se calculó para obtener el dCt de la muestra experimental (ES).

35

2.) Se seleccionó una muestra como estándar para compararse con (LNCAp) (C) y se calculó su dCt.

3.) El cambio en la diferencia de número de ciclo podría derivarse de $dCt(ES) - dCt(C) = ddCt$

4.) Los valores de expresión finales comparables podrían derivarse por 2^{-ddCt} para tener en cuenta la duplicación del ADN después de cada ciclo, por lo que muestra la cantidad de ARNm en comparación con LNCAp.

40

Esta operación dio un valor en comparación con LNCAp (que tendrá el valor de 1), es decir, cualquier valor >1 se consideró un aumento en la expresión, un valor de <1 se consideró una disminución en la expresión.

En consecuencia, se asumió que las eficiencias de extensión de todas las reacciones de PCR están dentro de un cierto rango, lo que resulta en un valor de 1.

Metodología porcentual para normalizar y comparar diferentes experimentos de RT-PCR

45

Para cada conjunto de sondas se obtuvo un valor de Ct (número de ciclo). Este se generó al encontrar una línea base que intersectaba las curvas de amplificación durante su fase exponencial. Las líneas base se generaron dinámicamente de acuerdo con las curvas obtenidas en cada experimento. Los valores Ct (intersección o ciclo) de los GOI se restaron luego del valor Ct del estándar GAPDH.

50

De acuerdo con la fórmula $Ct(GAPDH) - Ct(GOI) = dCt$, dado que los valores de GOI Ct son siempre mayores que el gen de referencia, el valor de dCt dio como resultado números negativos, es decir, un valor de -dCt.

55

Con base en el efecto de duplicación de cada ciclo, los valores absolutos se determinaron de acuerdo con el valor de expresión comparativo = 2^{-dCt} . Debido a los valores muy pequeños obtenidos de este cálculo, el valor se multiplicó por 1000 para fines de manejo.

Los niveles de expresión para PDE4D7 obtenidos por esta metodología se muestran en las Figuras 2 a 7. En particular, las Figuras 2 a 4 cubren la expresión relativa del ADNc de PDE4D7 en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata

humano y xenoinjertos (véase Figura 1) normalizados de acuerdo con la metodología -ddCt, mientras que las Figuras 5 a 7 cubren la expresión relativa del ADNc de PDE4D7 en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata humano y xenoinjertos (véase Figura 1) normalizados en relación con la expresión total de PDE4D en las líneas celulares individuales o el material tisular de xenoinjerto.

5 Como se puede derivar de las Fig. 2-7, el nivel de expresión (o transcripción) de PDE4D7 es significativamente diferente entre la mayoría de las líneas celulares dependientes de andrógenos o sensibles a andrógenos frente a andrógenos independientes (Figuras 3 y 6) o xenoinjertos humanos. (Figuras 4 y 7). Las Figuras 2 y 5 muestran los resultados combinados de líneas celulares y xenoinjertos.

10 De acuerdo con los resultados presentados en las Figuras 2 a 7, la transcripción de PDE4D7 en líneas y tejidos de cáncer de próstata humano depende del estado de la actividad del Receptor de Andrógeno en un tipo de célula dado. En el caso de la presencia de AR y la sensibilidad de una célula a la estimulación de andrógenos/hormonas, se puede observar una transcripción de PDE4D7, mientras que en ausencia de AR activa, la transcripción de PDE4D7 es muy mínima, es decir, prácticamente ausente.

15 Ejemplo 2 - Ensayo de RT-PCR cuantitativo con muestras de tejido humano

20 La expresión génica relativa de PDE4D7 humana se evaluó en tejidos de cáncer de próstata derivados de pacientes con pacientes sensibles/con respuesta a refractarios a hormona/resistentes a castración.

Materiales y métodos

25 Los detalles sobre las muestras utilizadas en las mediciones de qPCR del experimento de expresión del gen PDE se dan en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1: Información del paciente utilizada en el experimento.

Tejido	Tipo de Tejido	Puntuación de Gleason	Edad en el tratamiento	Estado hormonal refractario
Próstata	TURP	4+4	66	no
Ganglio linfático		4+4	63	no
Próstata	TURP	3+3	67	no
Próstata	TURP	4+4	82	no
Próstata	TURP	5+4	76	Si
Próstata	TURP	3+4	60	Si
Ganglio linfático		4+4	66	no
Próstata	TURP	5+3	90	Si
Próstata	TURP	4+3	66	Si
Próstata	TURP	3+4	60	Si
Próstata	TURP	4+4	64	no
Próstata	TURP	6	71	Si
Ganglio linfático		4+4	62	no
Próstata	TURP	7	75	Si
Próstata	TURP	3+5	70	Si
Ganglio linfático		4+4	52	no

30 Todas las muestras se derivaron de pacientes masculinos (edades 52-82). La columna "Tejido" define el tejido que se ha tomado durante la cirugía, ya sea tejido de la próstata o ganglios linfáticos para la estadificación. La columna "Tipo de tejido" describe la metodología de la resección tisular. Si no se indica lo contrario, el tejido fue resecado durante la cirugía de próstata (prostatectomía). "TURP" se define como la resección transuretral de la próstata. El panel de ADNc incluye 4 muestras derivadas de pacientes con cáncer de próstata sensible a hormonas, y 8 muestras derivadas de

pacientes con cáncer de próstata refractario a las hormonas (indicado por "sí" en la columna "Estado refractario a hormonas") y 4 muestras de metástasis de ganglios linfáticos

Secuencias de cebadores y sondas utilizados para PDE4D7 humana:

5 secuencia del cebador en sentido: CGGAATGGAACCCTA TCTTGTC (SEQ ID NO: 7)

secuencia del cebador antisentido: TTGGTCGTTGAATGTTCTCTGAT (SEQ ID NO: 8)

10 secuencia de la sonda: CCTCTCGCCTTCAGACAGTTGGAACAAGGAG AGG (marcado con FAM) (SEQ ID NO: 9).

Los cebadores específicos de PDE4D7 (SEQ ID NO: 7 y 8) se mezclaron previamente con las sondas FAM (SEQ ID NO: 9) para realizar una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y se usaron en una dilución 1:20 según la descripción del fabricante. (PrimerDesign, Reino Unido). Las muestras de ADNc humano se disponen en placas de microtitulación (MT) de 96 pozos, listas para qPCR, estándar.

Se dispusieron 16 muestras de tejido, derivadas de 16 pacientes diferentes por placa MT de 96 pozos, y cada uno de los 16 pozos utilizados por placa contenía aproximadamente 2-3 ng de ADNc de transcripción inversa de ARN.

20 A cada uno de los pozos utilizados de la placa MT se añadieron 15 μ L de la mezcla maestra GeneAmp de Applied Biosystems (2x), 13.5 μ L de agua libre de ARNasa/ADNasa y 2 μ L de PrimerDesign PerfectProbe primermix (PrimerDesign, Reino Unido).

25 Todas las muestras se analizaron con el siguiente protocolo de PCR: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C a la vez se registraba la fluorescencia, 15 segundos a 72°C y los últimos tres pasos repetidos 50 veces.

30 Para todos los cálculos relativos a los valores de la expresión génica, se utilizó el siguiente procedimiento: los valores de C_T de 40 o más o menos 16 se excluyeron por razones de calidad deficiente. (Los genes examinados aquí tenían un valor promedio de C_T de ~33).

35 Para normalizar los valores de C_T , se usó la siguiente metodología: los valores de C_T se convirtieron en un número relativo de copias de genes basándose en curvas de calibración. Las curvas de calibración se midieron de forma independiente en diferentes diluciones de ADNc. Posteriormente, la expresión de PDE4D7 dividiendo el número de copias de PDE4D7 por el número de copias promedio de los genes domésticos (Glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y Porfobilinógeno Desaminasa (PBGD)).

40 Expresión relativa de PDE4D7 humana en tejidos de próstata humanos (sensibles a hormonas frente a resistentes a hormonas), incluidas muestras de tejido resecado de ganglios linfáticos

45 El nivel de expresión génica de la isoforma PDE4D7 humana se determinó en tejidos de próstata humana como se describió más arriba. Los niveles de expresión relativos se determinaron en dos tejidos de próstata definidos: "sensible a hormonas" y "refractario a hormonas". Para una investigación inicial del estado de la expresión de la PDE4D7 humana, se incluyeron muestras de tejido resecado de ganglios linfáticos junto con muestras primarias de cáncer de próstata.

50 Las muestras de tejido resecado de ganglios linfáticos se caracterizan por un crecimiento invasivo, ya que se han diseminado desde el tumor primario a los ganglios linfáticos centinela. En ese sentido, estas muestras son desde una perspectiva molecular diferentes de las células tumorales primarias, que se caracterizan por una proliferación incontrolada pero que todavía están creciendo dentro de los límites de los órganos primarios. El crecimiento invasivo implica un comportamiento de crecimiento más agresivo que también se encuentra en el tejido del cáncer de próstata refractario a las hormonas.

55 Se realizó una prueba T de Student para ver si la expresión del gen PDE4D7 humana está, en promedio, ligeramente disminuida en los tejidos tumorales resistentes a hormonas en comparación con el tejido prostático humano sensible a hormonas.

60 Como se puede derivar de las Figuras 8 y 9, la expresión en los tumores de próstata resistentes a hormonas generalmente disminuye, pero no se puede distinguir fácilmente de la expresión en los grupos de tumores de próstata sensibles a hormonas. Se encontró que la diferencia media de expresión de PDE4D7 entre los tipos de tejido analizados no era significativa (valor de $p = 0.22$).

65 Este resultado podría posiblemente explicarse por el comportamiento más agresivo de parte de las muestras incluidas en el análisis del grupo 1. Se ha especulado si la enfermedad agresiva ya alberga células tumorales que han perdido su capacidad de respuesta al andrógeno, de modo que las características del comportamiento de refractario a hormonas o resistente a hormonas estaría inherentemente contenido dentro de un tumor agresivo. En consecuencia,

estas células serían seleccionadas en condiciones de privación de andrógenos. Esto podría explicar por qué tales tipos de tejidos ya tienden a tener niveles de expresión reducidos de PDE4D7 humana, lo que lleva a valores p menos significativos en una prueba T estándar. Por lo tanto, la dificultad de determinar correctamente el estado de las muestras de tejido resecado de ganglios linfáticos, es decir, el hecho de que no se pueda excluir que estos tumores ya contenían en alguna medida, poblaciones de células tumorales resistentes a hormonas, posiblemente podría haber conducido a los resultados obtenidos.

Expresión relativa de PDE4D7 humana en tejidos de próstata humanos (sensibles a hormonas frente a resistentes a hormonas) excluyendo muestras de tejido resecado de ganglios linfáticos

Con el fin de evitar los problemas encontrados, los niveles de expresión relativos se determinaron en dos tejidos de próstata definidos: "sensibles a hormonas" y "refractarios a hormonas", por lo que para la investigación del estado de expresión de PDE4D7 humana solo se incluyeron muestras de cáncer de próstata primarias, es decir, se descartaron todas las muestras derivadas de resecciones de ganglios linfáticos.

Se realizó una prueba T de Student para ver si la expresión del gen PDE4D7 humano disminuye significativamente en promedio en los tejidos tumorales resistentes a hormonas en comparación con el tejido prostático humano sensible a hormonas.

Como puede derivarse de las Figuras 10 y 11, la expresión en los tumores de próstata resistentes a hormonas disminuye y puede distinguirse fácilmente de la expresión en los grupos de tumores de próstata sensibles a hormonas. La diferencia de expresión promedio de PDE4D7 entre los dos tipos de tejido (tejidos tumorales resistentes a hormonas frente a tejidos tumorales sensibles a hormonas) es significativa ($p = 0.032$).

Las figuras 10 y 11 muestran que la expresión de PDE4D7 en los tumores de próstata resistentes a hormonas generalmente disminuye en comparación con los tumores de próstata sensibles a hormonas. Por lo tanto, se concluye que un nivel reducido de actividad de cAMP-PDE es ventajoso para una proliferación celular aumentada. Durante mucho tiempo se ha especulado que junto con las mutaciones genéticas del receptor de andrógenos o la amplificación de genes, la activación de otras rutas de señalización celular puede apoyar la transición de hormonas sensibles al crecimiento celular independiente de hormonas. La ruta cAMP-PKA es una de las rutas que han sido implicadas en esa transición del crecimiento relacionado con hormonas. El cambio en la expresión de PDE4D7 a partir de tejido prostático humano resistente a hormonas al refractario a hormonas apoya esta opinión.

Ejemplo 3 - El efecto de la expresión de PDE4D7 en la proliferación de PC3

Para probar el efecto de la expresión heteróloga de PDE4D7 humana sobre la proliferación de líneas celulares independientes de andrógenos, se transfectaron varias construcciones génicas en células PC3 y se probó el crecimiento celular en comparación con las líneas celulares de control tratadas. Como control células PC3 no tratadas, se utilizaron células PC3 transfectadas con una forma negativa dominante de PDE4D7 en donde la actividad catalítica de PDE4D7 se ha eliminado por mutación genética de la secuencia de codificación de PDE4D7, así como las células PC3 transfectadas con una isoforma diferente de la familia PDE4D, a saber, PDE4D1.

Las células PC3 se cultivaron a 5% de CO₂, 37°C, 5% de suero bovino fetal en RPMI 1640 complementado con L-glutamina (concentración final 2 mM) y PenStrep (1%). Las células PC3 se sembraron a una densidad de 5000 células por pozo de una placa de 96 pozos (MTP). Los complejos de transfección para el gen de interés (PDE4D7, PDE4D7 dominante negativo y PDE4D1) se formaron utilizando el reactivo de transfección Fugene 6 según las instrucciones del fabricante. Para cada gen de interés se realizaron -25 transfecciones independientes para aumentar el poder estadístico de la prueba (cada barra representa -25 mediciones independientes).

Después de un tiempo de siembra inicial de 4 horas, los complejos de transfección se agregaron al medio de crecimiento y las células se dejaron proliferar durante 60 horas antes de la adición del compuesto Promega MTT. Se siguió el procedimiento de ensayo MTT para investigar la proliferación celular según las instrucciones del fabricante.

Las lecturas de absorbancia se obtuvieron utilizando el sistema lector de placas Mithras LB940. Se tomó 1 segunda lectura de cada pozo.

Como se demostró en el experimento anterior, la expresión heteróloga de PDE4D7 en la línea celular PC3 de cáncer de próstata independiente de andrógenos mostró un efecto negativo sobre la proliferación in vivo. La proliferación celular en las condiciones elegidas se inhibió globalmente en un ~15% mediante la expresión de PDE4D7 humana en comparación con las células no tratadas, las células transfectadas con una forma inactiva de PDE4D7 y en comparación con la expresión de PDE4D1. El efecto es estadísticamente significativo ($p < 0.001$ en comparación con PC3 no tratado).

Este experimento demuestra que la activación de PDE4D7 humana tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular de células de cáncer de próstata independientes de andrógenos. El efecto observado sobre la proliferación celular es desde el punto de vista estadístico altamente significativo.

Debido a la forma transitoria de la transfección utilizada para el experimento (es decir, dependiendo de la eficacia de la transfección, se transfectaron más o menos PC3 y posteriormente se sobreexpresa la enzima PDE), se espera que se puede alcanzar un nivel aún mayor de inhibición de la proliferación celular una vez que se logre una mayor eficiencia de transfección transitoria en las células PC3.

- 5 La presente divulgación comprende las siguientes realizaciones adicionales:
- Ítem 1: Fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para usar como marcador de cáncer.
- 10 Ítem 2: Una composición para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer o la progresión del cáncer, que comprende un ligando de afinidad de ácidos nucleicos y/o un ligando de afinidad de péptidos para el producto o proteína de expresión de PDE4D7.
- 15 Ítem 3: La composición del ítem 2, en donde dicho ligando de afinidad de ácidos nucleicos o ligando de afinidad de péptidos se modifica para funcionar como un agente de contraste.
- Ítem 4: La composición del ítem 2, en donde dicho ligando de afinidad es un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.
- 20 Ítem 5: Uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer o la progresión del cáncer.
- 25 Ítem 6: Un método para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer o la progresión del cáncer que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra.
- Ítem 7: El método del ítem 6, en donde la etapa de determinación se realiza mediante la medición de los niveles de ácidos nucleicos o proteína o la determinación de la actividad biológica de PDE4D7.
- 30 Ítem 8: El método del ítem 7, en donde dicho método comprende la etapa adicional de comparar los niveles medidos de ácidos nucleicos o proteína o la actividad biológica medida con un nivel de control.
- Ítem 9: Un método de adquisición de datos que comprende al menos los pasos de:
- 35 (a) probar en un individuo la expresión de PDE4D7; y
- (b) comparar la expresión determinada en el paso (a) con un nivel de control.
- 40 Ítem 10: El uso del ítem 2 o el método de cualquiera de los ítems 6 a 9, en donde el diagnóstico, detección, monitorización, pronóstico o adquisición de datos se realizará en una muestra obtenida de un individuo.
- Ítem 11: Un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer o la progresión del cáncer que comprende al menos los pasos de
- 45 (a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7,
- (b) probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7,
- 50 (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de los pasos (a) y (b); y
- (d) decidir la presencia o el estadio del cáncer o la progresión del cáncer en función de los resultados obtenidos en el paso (c),
- 55 en donde dichos pasos de prueba se basan en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a PDE4D7.
- Ítem 12: El uso o método del ítem 10 o el inmunoensayo del ítem 11, en donde dicha muestra es una muestra de tejido, una muestra de orina, una muestra de sedimento de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de semen o una muestra que comprende células tumorales circulantes.
- 60 Ítem 13: Una composición farmacéutica que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:
- (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferiblemente un agonista alostérico de la actividad enzimática de PDE4D7;
- 65 (b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7;

(c) la proteína de PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;

(d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7;

5 (e) un inhibidor de ARNmi específico para los ARNmi de PDE4D7;

(f) un agente de desmetilación; y

10 (g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa, preferiblemente un péptido, un peptidomimético, una molécula pequeña, un anticuerpo o un aptámero.

Ítem 14: Una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:

15 (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferiblemente un agonista alostérico de la actividad enzimática de PDE4D7;

(b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7;

20 (c) la proteína de PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;

(d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7;

25 (e) un inhibidor de ARNmi específico para los ARNmi de PDE4D7;

(f) un agente de desmetilación; y

30 (g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa, preferiblemente un péptido, un peptidomimético, una molécula pequeña, un anticuerpo o un aptámero.

Ítem 15: Uso de

35 (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferiblemente un agonista alostérico de la actividad enzimática de PDE4D7;

(b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7;

(c) la proteína de PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;

40 (d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7;

(e) un inhibidor de ARNmi específico para los ARNmi de PDE4D7;

45 (f) un agente de desmetilación; y/o

(g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa, preferiblemente un péptido, un peptidomimético, una molécula pequeña, un anticuerpo o un aptámero,

50 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer.

Ítem 16: La fosfodiesterasa del ítem 1, la composición de uno de los ítems 2 a 4, el uso del ítem 5, 10 o 12, el método de cualquiera de los ítems 6 a 10 o 12, el inmunoensayo del ítem 11 o 12, la composición farmacéutica del ítem 13 o 14, o el uso del ítem 15, en donde dicho cáncer es cáncer de próstata.

55 Ítem 17: La fosfodiesterasa, el uso, la composición, el método, el inmunoensayo o la composición farmacéutica del ítem 16, en donde dicho cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a hormonas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para uso en un método de diagnóstico, detección, monitorización o pronóstico in vivo del cáncer de próstata, o de diagnóstico, detección, monitorización o pronóstico in vivo de la progresión del cáncer de próstata.
- 10 2. Una composición para uso en un método de diagnóstico, detección, monitorización o pronóstico in vivo del cáncer de próstata o el diagnóstico, detección, monitorización o pronóstico de la progresión del cáncer de próstata, que comprende un ligando de afinidad de ácidos nucleicos y/o un ligando de afinidad de péptidos para el producto o proteína de expresión de PDE4D7.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde dicho ligando de afinidad de ácidos nucleicos o ligando de afinidad de péptidos se modifica para funcionar como un agente de contraste.
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde dicho ligando de afinidad es un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.
- 25 5. Uso de PDE4D7 como marcador para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata.
- 30 6. El uso in vitro o ex vivo de una composición que comprende un ligando de afinidad de ácidos nucleicos y/o un ligando de afinidad de péptidos para el producto o proteína de expresión de PDE4D7, para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata.
- 35 7. El uso in vitro o ex vivo de la reivindicación 6, en donde el ligando de afinidad de ácidos nucleicos o el ligando de afinidad de péptidos se modifica para funcionar como un agente de contraste.
- 40 8. El uso in vitro o ex vivo de la reivindicación 6, en donde el ligando de afinidad es un conjunto de oligonucleótidos específicos para el producto de expresión de PDE4D7, una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7, un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína de PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína de PDE4D7.
- 45 9. Un método para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para diagnosticar, detectar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra.
- 50 10. Un método para diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata resistente a hormonas o para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar la progresión hacia el cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho método discrimina entre un cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas. que comprende los pasos de
- (a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;
- (b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;
- (c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y
- (d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado elegido para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte está entre aproximadamente 1 y 7, preferiblemente alrededor de 5.
- 55 11. Un método de adquisición de datos para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos los pasos de:
- (a) probar en un individuo la expresión de PDE4D7; y
- (b) comparar la expresión según lo determinado en el paso (a) a un nivel de control.
- 60
- 65

12. Un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar el cáncer de próstata o para detectar, diagnosticar, monitorizar o pronosticar la progresión del cáncer de próstata que comprende al menos los pasos
- 5 (a) probar en una muestra la expresión de PDE4D7,
- (b) probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7,
- (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de los pasos (a) y (b); y
- 10 (d) decidir sobre la presencia o el estadio del cáncer de próstata o la progresión del cáncer de próstata en función de los resultados obtenidos en el paso (c),
- en donde dichos pasos de prueba se basan en el uso de un anticuerpo que se une específicamente a PDE4D7.
- 15 13. Un inmunoensayo para discriminar entre un cáncer de próstata sensible a hormonas y uno resistente a hormonas, que comprende los pasos de
- (a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;
- 20 (b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra;
- (c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia; y
- 25 (d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de corte predeterminado elegido para excluir el cáncer de próstata sensible a hormonas, en donde un nivel de expresión normalizado por debajo del valor de corte es indicativo de un cáncer de próstata resistente a hormonas, en donde dicho valor de corte está entre aproximadamente 1 y 7, preferiblemente alrededor de 5.
- 30 14. Un método de identificación de un individuo para elegibilidad para la terapia del cáncer de próstata que comprende:
- (a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;
- (b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;
- 35 (c) clasificar los niveles de expresión del paso (a) en relación con los niveles del paso (b); y
- (d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia para el cáncer de próstata donde la muestra del individuo se clasifica como de un nivel reducido de expresión de PDE4D7.
- 40 15. Un inmunoensayo para estratificar a un individuo o cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer de próstata que comprende:
- (a) probar en una muestra obtenida de un individuo la expresión de PDE4D7;
- 45 (b) probar en dicha muestra la expresión de un gen de referencia y/o probar en una muestra de control la expresión de PDE4D7;
- (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de la etapa (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b); y
- 50 (d) estratificar un individuo o cohorte de individuos para terapia del cáncer de próstata con base en los resultados obtenidos en el paso (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel reducido de expresión de PDE4D7.
- 55 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 o 14, o el inmunoensayo de las reivindicaciones 12, 13 o 15, en donde dicha prueba o determinación de la expresión se realiza, o se realiza adicionalmente, mediante la medición de niveles de ácidos nucleicos o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7, o del gen de referencia.
- 60 17. El método o inmunoensayo de la reivindicación 16, en donde dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de comparar los niveles medidos de ácidos nucleicos o proteína o la actividad biológica medida con un nivel de control.
- 65 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10, 14, 16 o 17, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 15 a 17, en donde dicho gen de referencia es un gen de mantenimiento, preferiblemente GAPDH o PBGD, o una fosfodiesterasa diferente, preferiblemente PDE4D5.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10, 14, 16, 17 o 18, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 13, 15, 16, 17 o 18, en donde dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de determinar el nivel del antígeno prostático específico (PSA).

5 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 14, 16, 17 o 18, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 12, 13, 15, 16, 17 o 18, en donde dicha muestra es una muestra de tejido, una muestra de orina, una muestra de sedimento de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de semen, una muestra que comprende células tumorales circulantes o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata.

10 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 14, o 16 a 19, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde la terapia del cáncer de próstata comprende la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 19 o la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 19 en combinación con una terapia adicional para el cáncer, preferiblemente radioterapia o quimioterapia.

15 22. La fosfodiesterasa para el uso de la reivindicación 1, la composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, el método de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 14, 16 a 20 o 23, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 12, 15 a 20 o 21, en donde dicho cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a hormonas.

20

FIGURA 1

Muestra	Origen	Respuesta andrógena	Expresión de AR	Expresión de PSA	Secuencia AR
PC346P xenoinjerto(PC346c línea celular)	Nódulo linfático	AD	Si	Si	VM
PC346E xenoinjerto(ser mismo paciente como PC346P)	Primario	AD	Si	Si	VM
LHCaP 8 h - (no R1881 tratamiento)	Nódulo linfático	AD/AS	Si	Si	T877A
LHCaP 8 h + R1881	Nódulo linfático	AD/AS	Si	Si	T877A
VCaP 8 h - (no R1881 tratamiento)	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
VCaP 8 h + R1881	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
DuCaP 8 h - (no R1881 tratamiento)	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
DuCaP 8 h + R1881	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
pc346c 8 h - (no R1881 tratamiento)	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
pc346c 8 h + R1881	Vértebra	A/AS	Si	Si	VM
PC3	Hueso	AI	No	No	n/a
DU145	Cerebro	AI	No	No	n/a
pc346DCC	Vértebra	AI	Si	Si	VM
pc346Fu1	Vértebra	AI	Si	Si	VM
pc346Fu2	Vértebra	AI	Si	Si	VM
PC285	Primario	AD	Si	Si	VM
PC318	Nódulo linfático	AD	Si	Si	VM
PC-EW	Primario	AS	Si	Si	VM
PC82	Primario	AS	Si	Si	VM
PC133	Primario	AI	No	No	n/a
PC135	Primario	AI	No	No	n/a
PC324	Primario	AI	No	No	n/a
PC374	Primario	AI	No	No	n/a

FIGURA 2

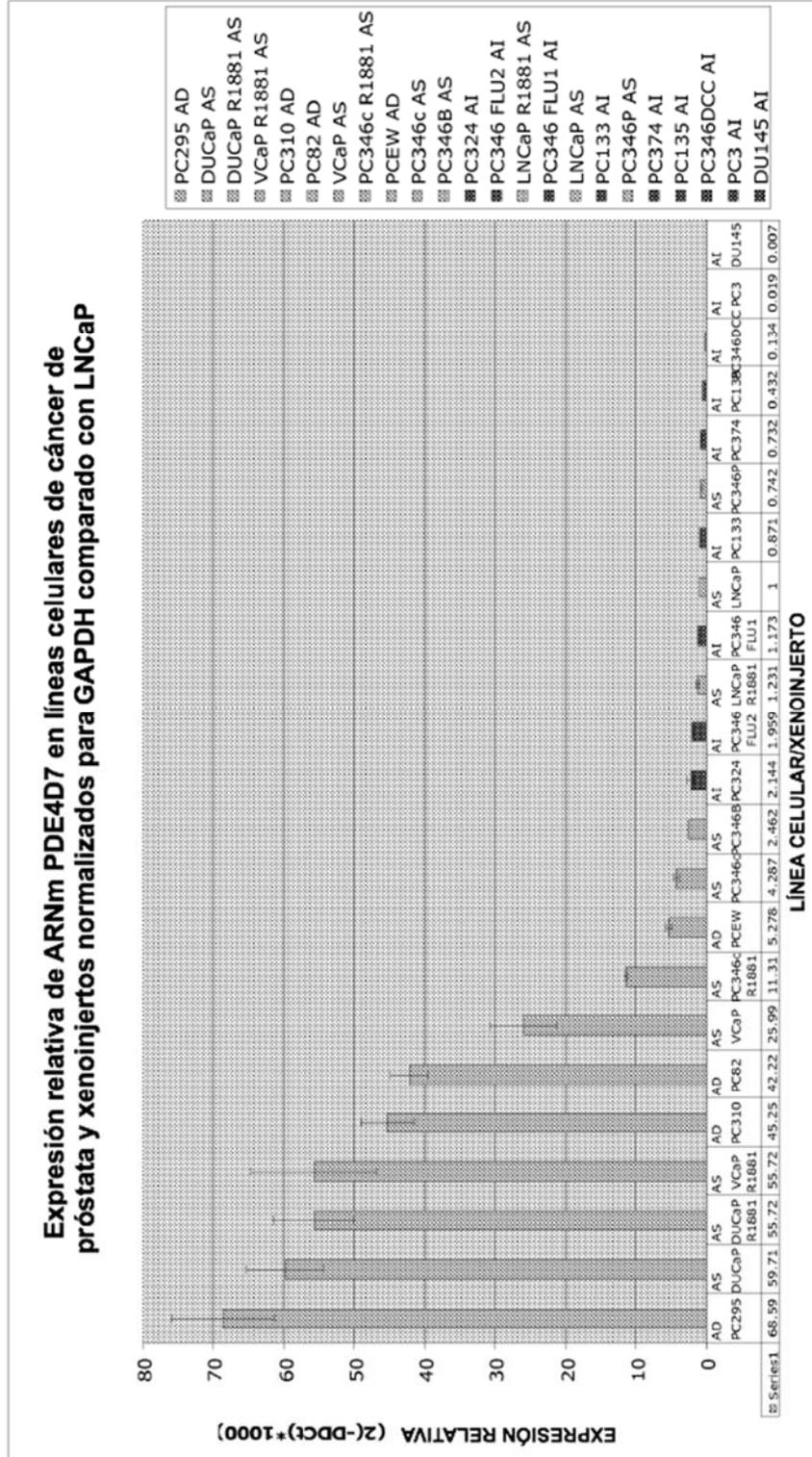


FIGURA 3

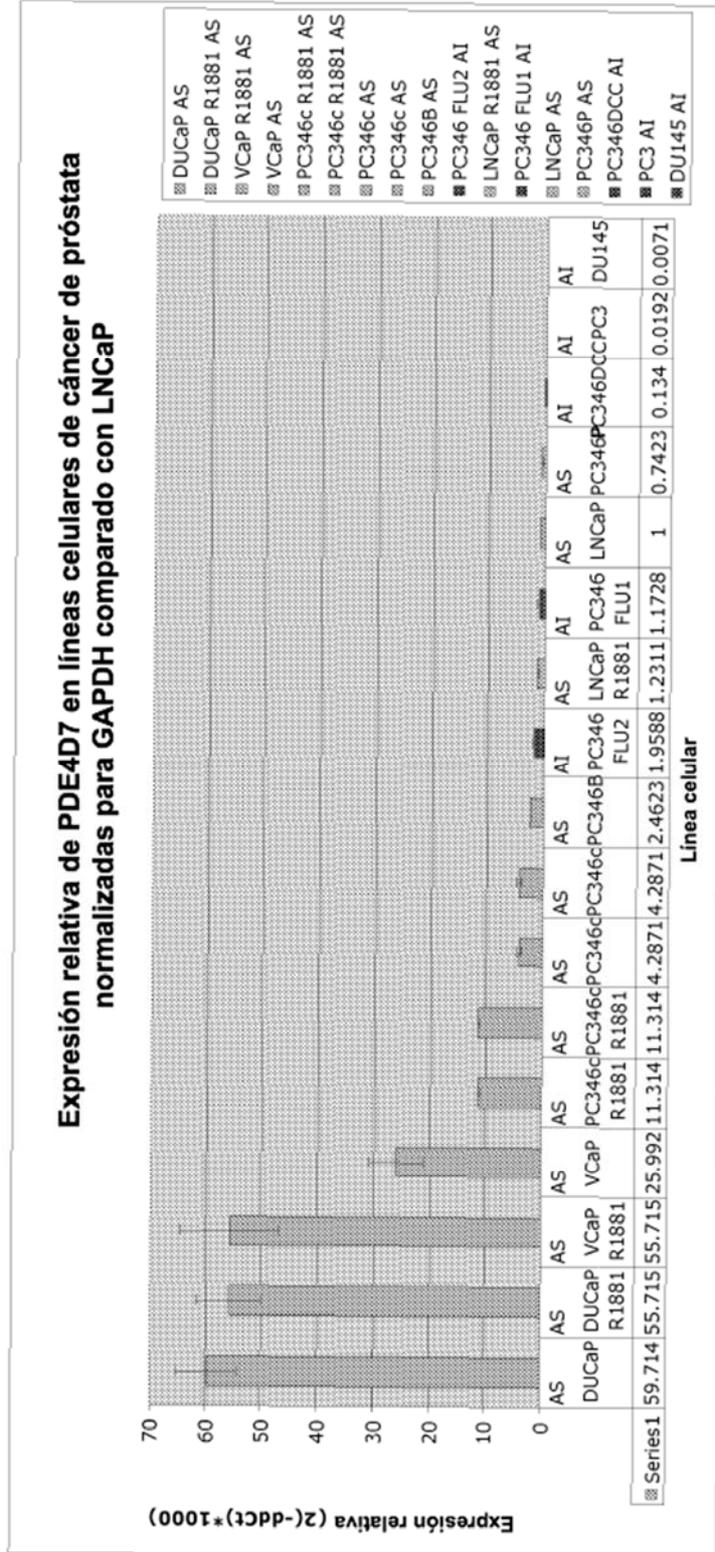


FIGURA 4

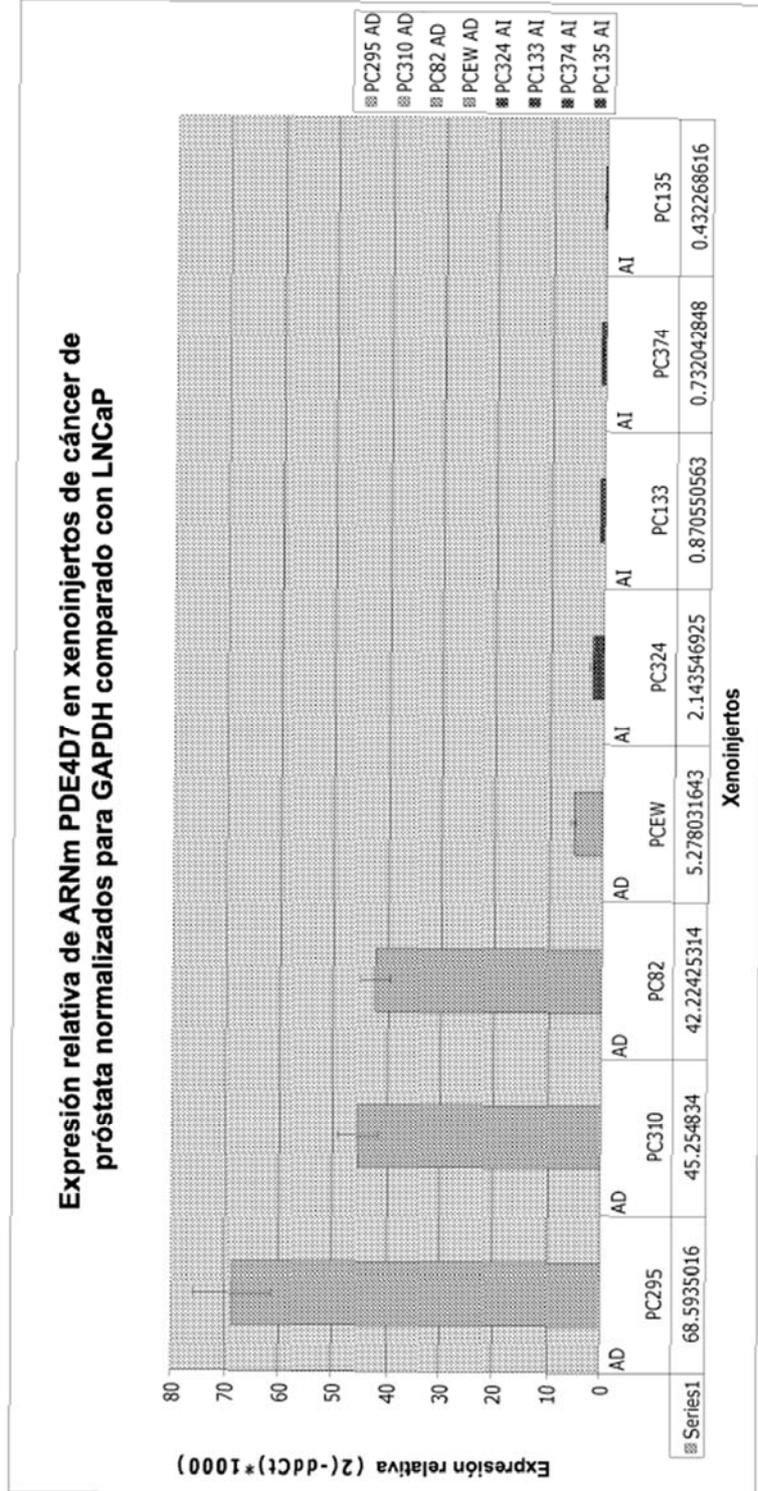


FIGURA 5

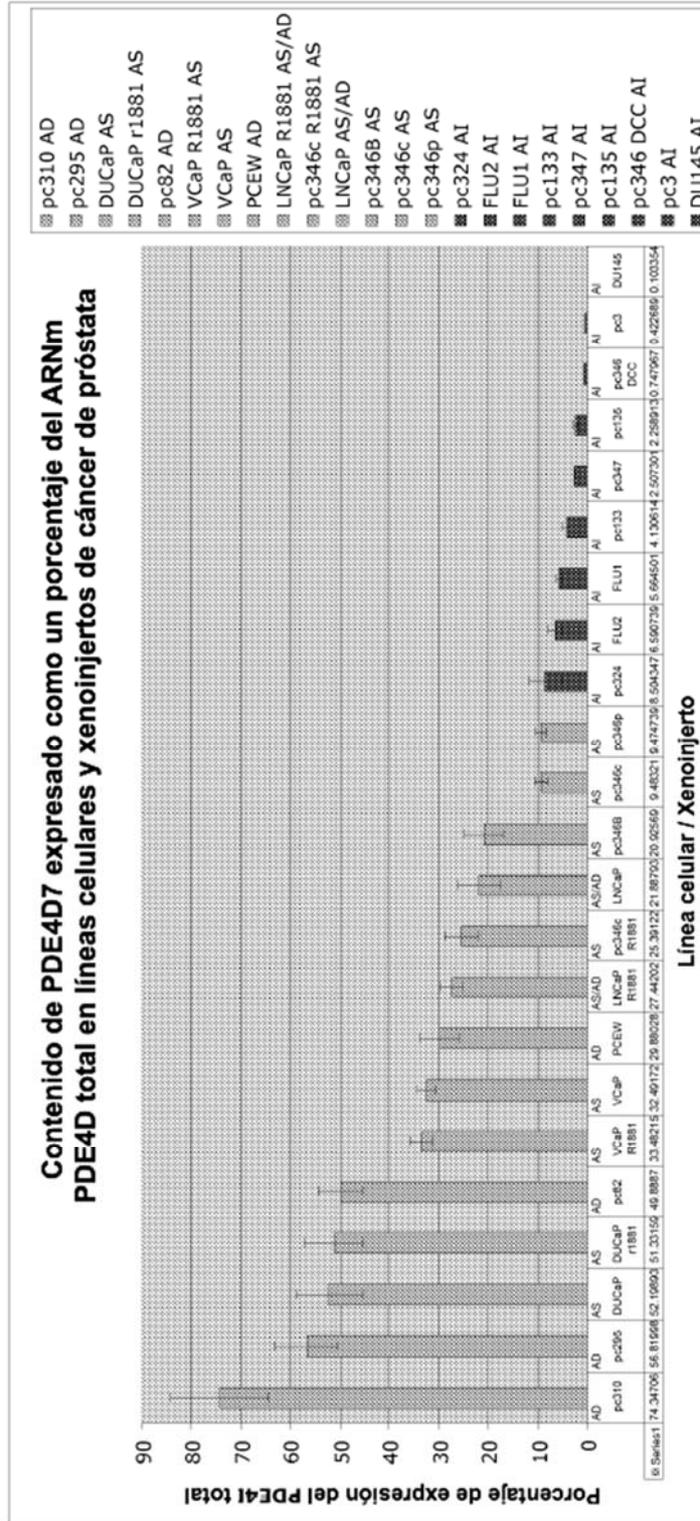


FIGURA 7

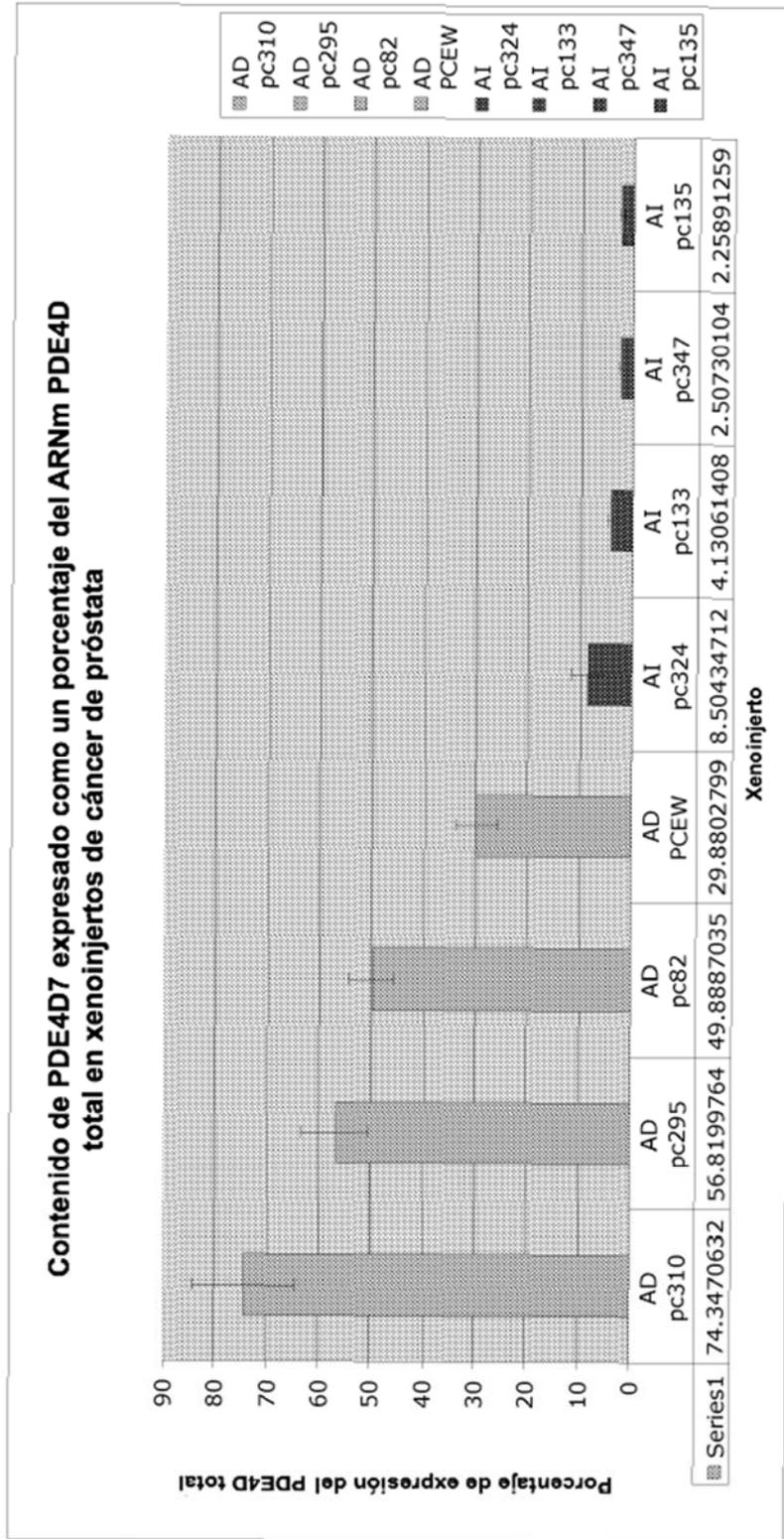


FIGURA 8

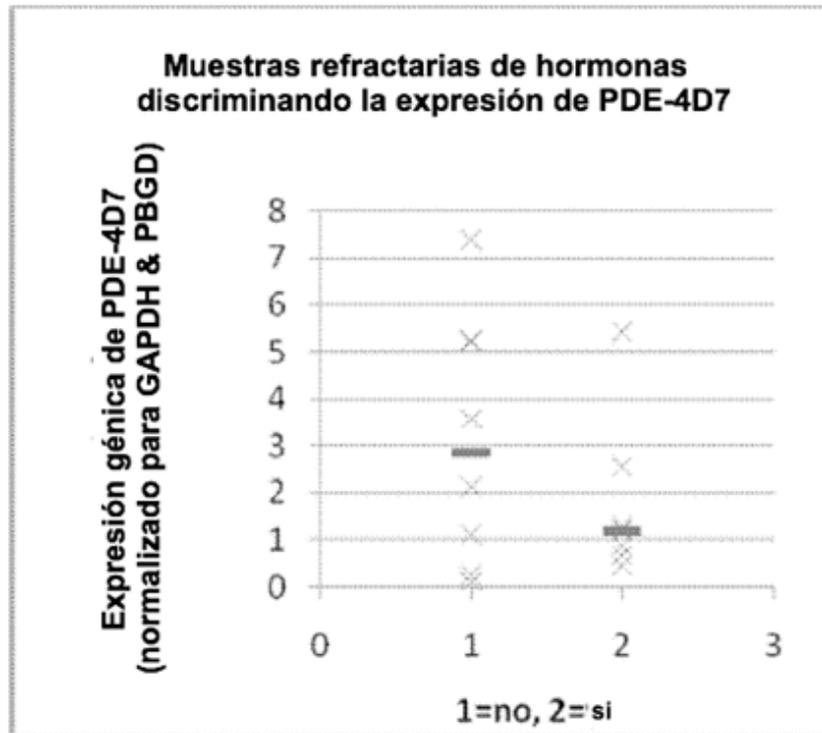


FIGURA 9

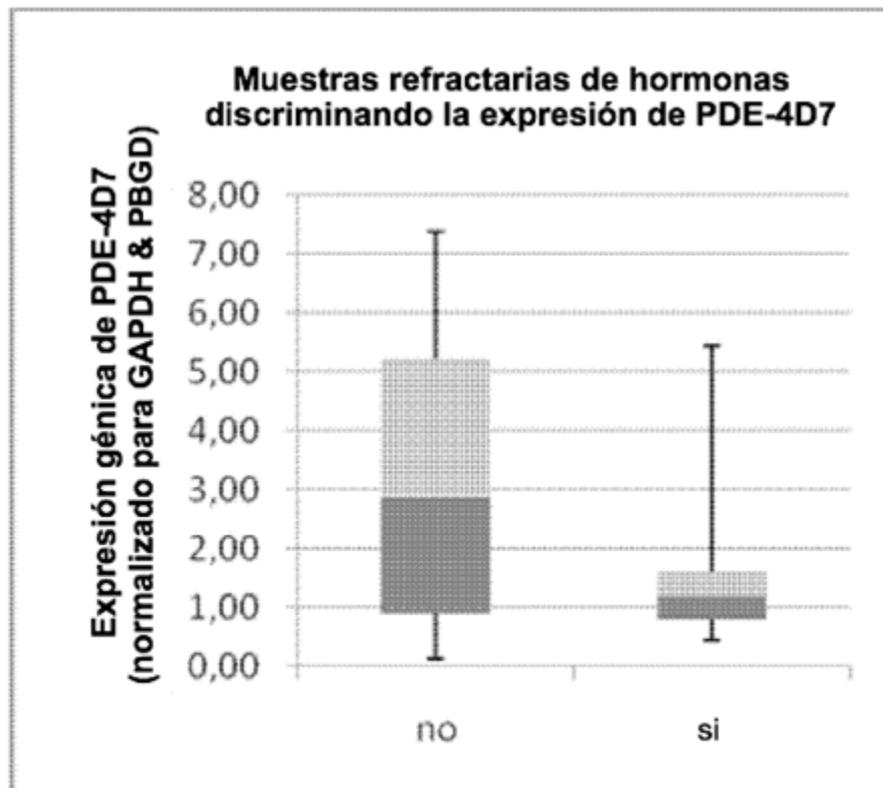


FIGURA 10

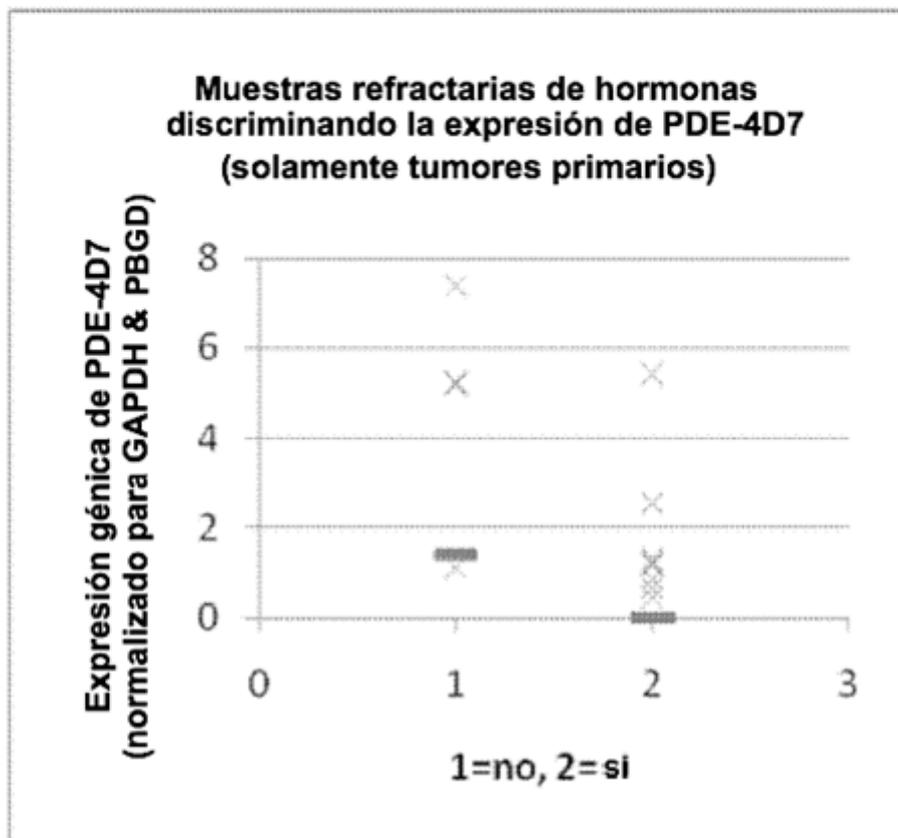


FIGURA 11

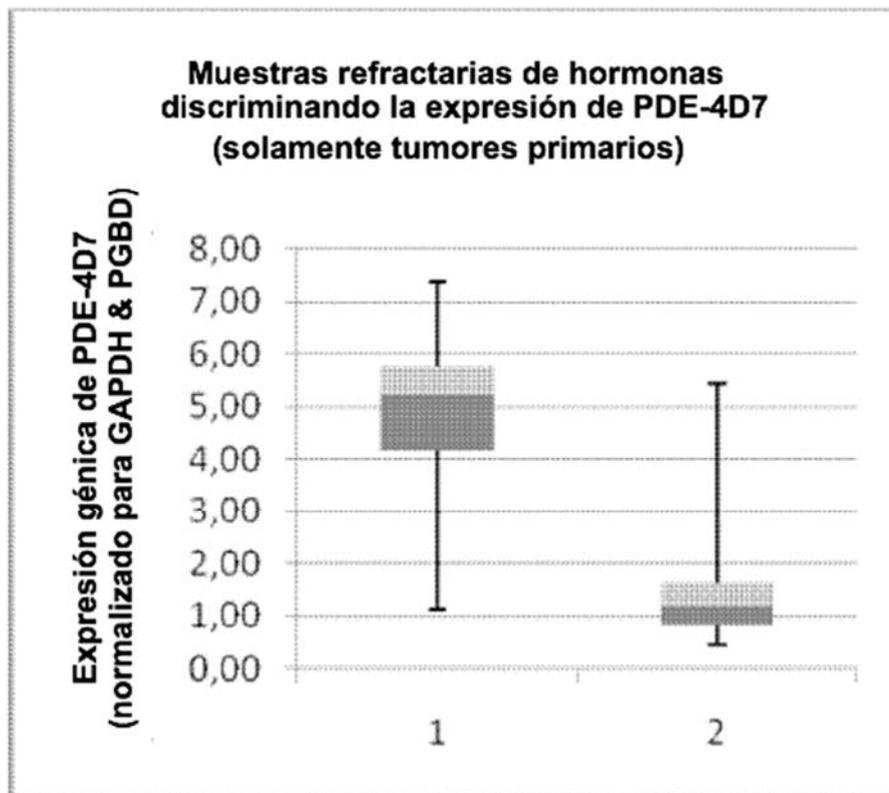


FIGURA 12

