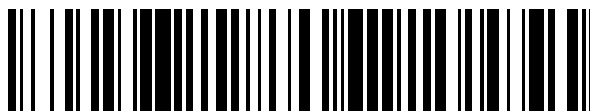


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 598**

51 Int. Cl.:

C12N 15/115 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

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/IB2010/052072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010** **WO10131194**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2010** **E 10726250 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018** **EP 2430190**

54 Título: **Fosfodiesterasa 4D7 como marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas**

30 Prioridad:

12.05.2009 EP 09159960

08.09.2009 EP 09169739

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

04.04.2019

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 2 707 598 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 para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para su uso como un marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde la expresión del marcador aumenta cuando se compara la expresión en tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas con la expresión en tejido normal o tejido de tumor benigno de próstata, y el uso de PDE4D7 como un marcador de diagnóstico para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. La presente invención también se refiere a una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, un método de detección correspondiente, un método que permite diferenciar entre un cáncer benigno y uno maligno de próstata sensible a hormonas y un método de adquisición de datos para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, así como inmunoensayos correspondientes. La presente invención también se refiere a un método para identificar un individuo para su elegibilidad para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas así como un inmunoensayo para estratificar a un individuo con dicho cáncer de próstata. La presente invención prevé además composiciones farmacéuticas y su uso para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

25 Antecedentes de la invención

El cáncer es una clase de enfermedades en la que un grupo de células presentan crecimiento descontrolado, invasión y en ocasiones metástasis. Estas tres propiedades malignas de cánceres los diferencian de tumores benignos, que están autolimitados, no invaden ni metastatizan. Entre los hombres, los tres cánceres más habitualmente diagnosticados son cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer colorrectal en países desarrollados. En particular el cáncer de próstata es el tumor maligno más habitual en hombres europeos. En 2002 en Europa, se diagnosticó a una estimación de 225.000 hombres nuevo cáncer de próstata y aproximadamente 83.000 murieron de esta enfermedad.

Determinadas fosfodiesterasas se han asociado con el desarrollo de cáncer. Por ejemplo, se ha mostrado que la fosfodiesterasa PDE7 está ligada a la leucemia linfocítica crónica. No obstante, para muchos tipos de cánceres o formas de progresión de cáncer no hay ninguna molécula marcadora adecuada disponible.

El cáncer de próstata, por ejemplo, se diagnostica tradicionalmente mediante el nivel en suero del antígeno específico de próstata (PSA). Sin embargo, el PSA no es específico de cáncer de próstata y puede estar elevado en otras circunstancias, lo que conduce a un gran número de falsos positivos (no se encuentra cáncer en aproximadamente el 70 % de los hombres con niveles de PSA aumentados que se someten a biopsia). Además, habrá un número impredecible de falsos negativos que posteriormente desarrollarán cáncer de próstata en presencia de un ensayo de PSA "normal".

La Publicación de Patente N.º WO 2004/042389 A2 describe el diagnóstico y terapia para enfermedades asociadas con PDE4D humana.

El documento WO03/044170 desvela también fosfodiesterasa (PDE4D7) y polinucleótidos que identifican y codifican PDE4D7. Sin embargo, el documento WO03/044170 no desvela PDE4D7 como un marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una perspectiva de diagnóstico alternativa, nueva y eficaz para la detección, supervisión y pronóstico de cáncer de próstata, en particular de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

55 Sumario de la invención

La presente invención aborda esta necesidad y proporciona medios y métodos que permiten el diagnóstico y la detección de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. El objetivo anterior se consigue mediante fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para su uso en el diagnóstico, la detección, la supervisión o el pronóstico de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde la expresión de la PDE4D7 está aumentada cuando se compara la expresión en tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas con la expresión en tejido normal o tejido de tumor benigno de próstata.

Los presentes inventores han mostrado que la fosfodiesterasa 4D7 está regulada positivamente en células o líneas celulares de cáncer de próstata. PDE4D7 se considera, por lo tanto, un biomarcador para predicción de cáncer de próstata y una herramienta de decisión para la estratificación de regímenes de vigilancia de cáncer de próstata, así como el pronóstico y la supervisión de la progresión del cáncer de próstata. En particular, los presentes inventores

han demostrado que PDE4D7 está regulada positivamente particular en células o líneas celulares de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas procedentes del ser humano así como muestras de tejido humano correspondientes. Pueden, por lo tanto, emplearse provechosamente métodos y usos de diagnóstico basados en PDE4D7 como un marcador de cáncer de próstata para (i) detectar y diagnosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, (ii) pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, (iii) supervisión de la progresión del cáncer hacia formas de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas y (iv) distinguir entre formas benignas y malignas de cáncer de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para su uso en un método de diagnóstico, detección, supervisión o pronóstico *in vivo* de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o de diagnóstico, detección, supervisión o pronóstico *in vivo* de la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o un ligando de afinidad peptídico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso *in vitro* o *ex vivo* de una composición que comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o un ligando de afinidad peptídico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7 para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En una realización preferida de la presente invención dicha composición comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico o un ligando de afinidad peptídico que se modifica para actuar 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 de expresión o proteína de PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere al uso de PDE4D7 como un marcador para un diagnóstico, una detección, una supervisión o un pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para un diagnóstico, una detección, una supervisión o un pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia el cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho método diferencia entre un tumor benigno de próstata y un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende las etapas de

- (a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;
- (b) determinar el nivel de expresión del 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 punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre aproximadamente -2 y +2, preferentemente aproximadamente 0.

(a) En otro aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* de adquisición de datos para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- (a) ensayar en un individuo para determinar la expresión de PDE4D7; y
- (b) comparar la expresión como se determina en la etapa (a) con un nivel de control.

En una realización preferida adicional de la presente invención el diagnóstico, la detección, la supervisión, el pronóstico o la adquisición de datos va a llevarse a cabo en una muestra obtenida de un individuo.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7,
- (b) ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7,
- (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de las etapas (a) y (b); y
- (d) decidir acerca de la presencia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia

En otro aspecto la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para diferenciar entre un tumor benigno de próstata y un cáncer maligno de próstata sensible 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 punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un tumor maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre aproximadamente -2 y +2, preferentemente aproximadamente 0.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para identificar a un individuo para determinar su elegibilidad para terapia de cáncer maligno sensible a hormonas que comprende:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
- (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7;
- (c) clasificar los niveles de expresión de la etapa (a) en relación con los niveles en las muestras de control de PDE4D7 de la etapa (b); y
- (d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en donde la muestra del individuo se clasifica como poseedora de un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para estratificar a un individuo o a una cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
- (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o ensayar en una muestra de control para determinar 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
- (d) estratificar a un individuo o una cohorte de individuos para terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

En una realización preferida adicional de la presente invención dicho ensayo o determinación de la expresión se consigue, o se consigue adicionalmente, mediante la medición de los niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7, o del gen de referencia.

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

En una realización preferida adicional de la presente invención dicho gen de referencia es un gen constitutivo, de forma particularmente preferida GAPDH o PBGD, o una fosfodiesterasa diferente, de forma particularmente preferida PDE4D5.

En una realización preferida de la presente invención dicha etapa de determinación se consigue mediante la medición de los niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7.

En una realización preferida adicional de la presente invención dicho método comprende la etapa adicional de comparar los niveles de ácido nucleico o proteína medidos o la actividad biológica medida con un nivel de control.

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

En una realización adicional, particularmente preferida, de la presente invención un nivel de PSA de 2,5 a 4 ng/ml determinado en una etapa adicional de un método o inmunoensayo como se ha definido anteriormente es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

- 5 En una realización preferida adicional de la presente invención la muestra como se ha mencionado anteriormente es una muestra tisular, una muestra de orina, una muestra de biopsia, una muestra de sedimento de orina, una muestra de sangre, una muestra de saliva, una muestra de semen, una muestra que comprende células tumorales en circulación o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata.
- 10 En otro aspecto más la presente invención se refiere a una composición farmacéutica inhibidora para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:
- 15 (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7;
 - (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7;
 - (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
 - (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7;
 - (e) un miARN específico para PDE4D7;
 - 20 (f) una molécula antisentido de PDE4D7;
 - (g) un ARNip específico para PDE4D7;
 - (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7;
 - (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y
 - (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

Como la fosfodiesterasa 4D7 está regulada positivamente en el contexto de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, pueden usarse provechosamente como medicamentos inhibidores de PDE4D7 y agentes que modifican, por ejemplo inhiben, PDE4D7, que modifican la expresión de PDE4D7, por ejemplo inhiben la expresión de PDE4D7, o modifican las interacciones de PDE4D7, por ejemplo inhiben las interacciones de PDE4D7. Por lo tanto, contrarrestando el proceso de regulación positiva observado, los inhibidores y/o agentes de modificación de PDE4D7 pueden usarse como un medicamento, por ejemplo como un medicamento que contrarresta todos o algunos de los efectos asociados con una alta expresión de PDE4D7 o su regulación positiva.

- 30 En otro aspecto la presente invención se refiere a un producto farmacéutico estimulante para su uso en el tratamiento de composición de cáncer maligno sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:
- (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un agonista alostérico de actividad enzimática de PDE4D7;
 - (b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7;
 - (c) la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
 - (d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7;
 - (e) un inhibidor de miARN específico para miARN de PDE4D7;
 - 40 (f) un agente de desmetilación de PDE4D7; y
 - (g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa PDE4D7. En una realización preferida de la presente invención dicha composición farmacéutica inhibidora o estimulante va a usarse para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas dependiendo del nivel de expresión de PDE4D7, en donde dicho nivel de expresión se determina y/o supervisa según las etapas de
- 50 (a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra;
 - (b) determinar el nivel de expresión de un gen de referencia en una muestra; y
 - (c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión de gen de referencia

- 55 En una realización adicional, particularmente preferida de la presente invención para niveles aumentados y/o crecientes de PDE4D7 debe administrarse dicha composición farmacéutica inhibidora, y para niveles reducidos y/o decrecientes de PDE4D7 debe administrarse dicha composición farmacéutica estimulante.

- 60 En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

- 65 En otra realización preferida de la presente invención dicho cáncer de próstata es cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En una realización particularmente preferida de la presente invención el cáncer maligno de próstata sensible a hormonas es un cáncer de próstata de estadio I-IV sensible a hormonas, un cáncer de próstata recurrente sensible a hormonas o un cáncer de próstata metastásico sensible a hormonas.

- 5 Estas y otras características, elementos y objetivos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con las figuras y los ejemplos adjuntos, que demuestran como ilustración los principios de la invención.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La Fig. 1 proporciona en las Figuras 1A y 1B (continuación de la Fig. 1A) una visión de conjunto sobre los estudios de muestras tisulares humanas mediante RT-PCR para determinar la expresión relativa de PDE4D7 contra GAPDH. Se indica la edad y el sexo del paciente que proporciona la muestra, el tipo tisular, la apariencia de la muestra, el diagnóstico, el grado tumoral (puntuación de Gleason), el estadio según el sistema de
- 15 estadificación de TNM (como es definido por la UICC), el estadio del tumor y una verificación histológica correspondiente que es independiente del uso del marcador.
- La Fig. 2 representa un Diagrama de Cajas de niveles de expresión relativos de PDE4D7 con GAPDH de muestras de tejido de próstata normal, benigno y maligno. En la columna 1 se muestran niveles de expresión relativos de PDE4D7 contra GAPDH en muestras de tejido normal/de control, en la columna 2 se muestran
- 20 niveles de expresión relativos de PDE4D7 contra GAPDH en muestras de tejido benigno y en la columna 3 se indican niveles de expresión relativos de PDE4D7 contra GAPDH en muestras de tejido maligno.
- La Fig. 3 representa un Diagrama de Dispersión de niveles de expresión relativos de PDE4D7 contra GAPDH de muestras de tejido de próstata normal, benigno y maligno. Se indican valores de expresión relativos individuales de PDE4D7 en tejidos de próstata normal, benigno y maligno. Los valores de expresión son relativos a la
- 25 expresión de GAPDH.
- La Fig. 4 representa un análisis de curva ROC de expresión de PDE4D7 en muestras de próstata benigna frente a maligna.
- La Fig. 5 muestra un Diagrama de Cajas de valores de PSA en sangre humana de 90 hombres con enfermedad
- 30 prostática benigna y diferentes estadios de enfermedad prostática maligna. En la columna 1 se indican a los hombres con una enfermedad prostática benigna, en la columna 2 hombres con enfermedad prostática maligna, que presentan cánceres pequeños, y en la columna 3 hombres con enfermedad prostática maligna, que presentan cánceres significativos.
- La Fig. 6 representa un análisis de curva ROC de los niveles de PSA en sangre en hombres con enfermedad prostática benigna frente a diferentes estadios de enfermedad prostática maligna.
- 35 La Fig. 7 muestra la expresión génica relativa de PDE4D5 humana en 96 muestras diferentes procedentes de los paneles I y II de HPRT de Origene. Se indican los valores de expresión relativos individuales para PDE4D5 humana en tejidos prostáticos humanos y la mediana de las mediciones de datos relativos a los datos para cada grupo de paciente.
- La Fig. 8 muestra la expresión génica relativa de PDE4D5 humana en 96 muestras diferentes procedentes de los
- 40 paneles I y II de HPRT de Origene. La figura muestra un diagrama de cajas de las mediciones de expresión relativas a los datos individuales para PDE4D5 humana, por la que la caja incluye 75 % de todas las mediciones. La mediana del valor de expresión relativo se indica como el límite entre las dos cajas coloreadas.
- La Fig. 9 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 en 96 muestras diferentes procedentes de los paneles I y II de HPRT de Origene. Se indican los valores de expresión relativos individuales para PDE4D7 humana en
- 45 tejidos prostáticos humanos y la mediana de las mediciones de datos relativas a los datos se indica para cada grupo de pacientes.
- La Fig. 10 muestra la expresión génica relativa de PDE4D7 en 96 muestras diferentes procedentes de los paneles I y II de HPRT de Origene. La figura muestra un diagrama de cajas de las mediciones de expresión relativas a los datos individuales para PDE4D7 humana, por la que la caja incluye 75 % de todas las mediciones. La mediana del valor de expresión relativo se indica como el límite entre las dos cajas coloreadas en gris.
- 50 La Fig. 11 muestra las representaciones de la curva ROC de la expresión del gen de PDE4D7 en muestras de tejido prostático humano que indican la ABC para diferentes comparaciones por pares. La Fig. 11A muestra tejido Normal (N) frente a Tumoral. La Fig. 11B muestra tejido Benigno (Lesión + Hiperplasia(B)) frente a Tumoral. La Fig. 11C muestra Lesión (L) frente a tejido Tumoral. La Fig. 11D muestra Hiperplasia (H) frente a tejido Tumoral. La Fig. 11E muestra tejido Normal + Benigno (NB) frente a Tumoral.
- La Fig. 12 muestra la relación de expresión génica relativa de PDE4D7 y PDE4D5 ($\Delta Ct[PDE4D5 \text{ humana}] - Ct[PDE4D7 \text{ humana}]$). Los valores de Ct de PDE4D7 humana se restaron de los valores de Ct de PDE4D5 humana para cada muestra tisular individual ensayada. La información procedía de 96 muestras diferentes en total, medidas en los paneles I y II de HPRT de Origene (véase Ejemplos). La Fig. muestra valores de expresión
- 60 relativos individuales para delta humana ($PDE4D5 - PDE4D7$) en tejidos prostáticos humanos. La mediana de las mediciones de datos relativas a los datos está indicada para cada grupo de pacientes.
- La Fig. 13 muestra la relación de expresión génica relativa de PDE4D7 y PDE4D5 ($\Delta Ct[PDE4D5 \text{ humana}] - Ct[PDE4D7 \text{ humana}]$). Los valores de Ct de PDE4D7 humana se restaron de los valores de Ct de PDE4D5 humana para cada muestra de tejido individual ensayada. La información procedió de 96 muestras diferentes en total, medidas en los paneles I y II de HPRT de Origene (véase Ejemplos). La Fig. indica un diagrama de cajas de las mediciones de expresión relativas a los datos individuales para delta humana ($PDE4D5 - PDE4D7$), por la
- 65

que la caja incluye 75 % de todas las mediciones. La mediana del valor de expresión relativo se indica como el límite entre las dos cajas coloreadas en gris.

La Fig. 14 muestra curvas de Características Operativas del Receptor de valores de expresión génica de delta(Ct[PDE4D5 humana] – Ct[PDE4D7 humana]) para evaluar la potencia de diagnóstico. La Fig. indica las representaciones de curva ROC del Índice PDE de Próstata en muestras de tejido de próstata humano que indican ABC para diferentes comparaciones por pares. La Fig. 14A muestra Normal (N) frente a Tumor. La Fig. 14B muestra Benigno (Lesión + Hiperplasia(B)) frente a Tumor. La Fig. 14C muestra Lesión (L) frente a Tumor. La Fig. 14D muestra Hiperplasia (H) frente a Tumor. La Fig. 14E muestra Normal + Benigno (NB) frente a Tumor. La Fig. 15 representa los resultados de un Ensayo Múltiple de expresión génica relativa de delta(Ct[PDE4D5 humana] – Ct[PDE4D7 humana]), realizado en un único experimento. Las Ct de PDE-4D7 se restaron de las Ct de PDE-4D5. La información procede de 96 muestras diferentes en total, medidas en los paneles I y II de HPRT de Origene (véase Ejemplos). La Fig. muestra valores de expresión relativos individuales para delta(Ct[PDE4D5 humana] – Ct[PDE4D7 humana]) en tejidos prostáticos humanos. La mediana de las mediciones de datos relativas a los datos se indica para cada grupo de pacientes. La Fig. 16 representa los resultados de un Ensayo Múltiple de expresión génica relativa de delta(Ct[PDE4D5 humana] – Ct[PDE4D7 humana]), realizado en un único experimento. Las Ct de PDE-4D7 se restaron de Ct de PDE-4D5. La información procede de 96 muestras diferentes en total, medidas en los paneles I y II de HPRT de Origene (véase Ejemplos). La Fig. indica un diagrama de cajas de las mediciones de expresión relativas a los datos individuales para delta(Ct[PDE4D5 humana] – Ct[PDE4D7 humana]), por la que la caja incluye 75 % de todas las mediciones. La mediana del valor de expresión relativo se indica como el límite entre las dos cajas coloreadas en gris.

La Fig. 18 muestra curvas de Características Operativas del Receptor del Ensayo Múltiple de Índice de PDE (PIMA) definido como delta(Ct[PDE4D5 humana] - Ct[PDE4D7 humana]). La Fig. indica las representaciones de curva ROC del Índice de PDE de Próstata en muestras de tejido prostático humano que indican ABC para diferentes comparaciones por pares. La Fig. 17A muestra Normal (N) frente a Tumor. La Fig. 17B Benigno (Lesión + Hiperplasia(B)) frente a Tumor. La Fig. 17C muestra Lesión (L) frente a Tumor. La Fig. 17D muestra Hiperplasia (H) frente a Tumor. La Fig. 17E muestra Normal + Benigno (NB) frente a Tumor.

La Fig. 18 muestra un ensayo de Xcelligence con células LNCaP y el inhibidor de PDE4 Rolipram. Los datos de crecimiento se expresan como porcentaje de valor de pendiente "sin tratamiento" obtenido durante mediciones de impedancia eléctrica en tiempo real. Se realizaron mediciones 12 horas después de la fase de siembra en placas inicial del ensayo, es decir, 12 horas – 60 horas – para examinar el potencial proliferativo y no el cambio morfológico. Las células se ensayaron sin la presencia de andrógenos.

La Fig. 19 muestra un ensayo de crecimiento de MTT con células LNCaP y el inhibidor de PDE4 Rolipram. Los datos de crecimiento se expresan como porcentaje de la lectura de Abs A590 "sin tratamiento" después de 48 horas. Las células se ensayaron sin la presencia de andrógenos.

Descripción detallada de realizaciones

Los inventores han descubierto que PDE4D7 está fuertemente regulado positivamente en determinadas células o líneas celulares de cáncer de próstata y pueden usarse, por lo tanto, como un biomarcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Pueden usarse además como medicamentos inhibidores de PDE4D7 así como agentes que modifican PDE4D7 o modifican la expresión de PDE4D7, en particular para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

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

Antes de describir en detalle realizaciones ejemplares de la presente invención, se proporcionan definiciones importantes para el entendimiento de la presente invención.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un" y "una" también incluyen los plurales respectivos a no ser que el contexto claramente dicte otra cosa.

En el contexto de la presente invención, las expresiones "aproximadamente" y "en torno a" indican un intervalo de precisión que un experto en la materia entenderá que asegura aún el efecto técnico del elemento en cuestión. La expresión indica normalmente una desviación desde el valor numérico indicado de $\pm 20\%$, preferentemente $\pm 15\%$, más preferentemente $\pm 10\%$ y aún más preferentemente $\pm 5\%$.

Debe entenderse que la expresión "que comprende" no es limitante. Para los fines de la presente invención la expresión "que consiste en" se considera una realización preferida de la expresión "que comprende". Si en lo sucesivo en el presente documento se define que un grupo comprende al menos un determinado número de realizaciones, se entiende que este también abarca un grupo que consiste preferentemente en solamente estas realizaciones.

Además, los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)", etc. y similares en la descripción y en las reivindicaciones se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos usados de este modo son intercambiables en

circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento tienen capacidad de operación en otras secuencias distintas de las descritas o ilustradas en el presente documento.

En caso de que los términos “primero”, “segundo”, “tercero” o “(a)”, “(b)”, “(c)”, “(d)”, etc. se refieran a etapas de un método o uso no hay ninguna coherencia de tiempo o intervalo temporal entre las etapas, es decir, las etapas pueden llevarse a cabo simultáneamente o puede haber intervalos de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre dichas etapas, a menos que se indique de otro modo en la solicitud como se expone en el presente documento anteriormente o posteriormente.

Debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, los protocolos, las proteínas, las bacterias, los vectores, los reactivos, etc. particulares descritos en el presente documento ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención que estará limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas. A no ser que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende habitualmente un experto en la materia.

Como se ha presentado anteriormente, la presente invención se refiere en un aspecto a fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para su uso como un marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde la expresión del marcador está aumentada cuando se compara la expresión en tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas con la expresión en tejido normal o tejido de tumor benigno de próstata. La expresión “fosfodiesterasa 4D7” o “PDE4D7” se refiere a la variante de corte y empalme 7 de la fosfodiesterasa PDE4D humana, es decir, el gen de la fosfodiesterasa PDE4D7, preferentemente a la secuencia definida en el N.º de referencia de Genbank AF536976 (versión AF536976.1, GI:22901883 a fecha del 3 de marzo de 2009), más preferentemente a la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1, que corresponde a la secuencia del número de referencia de Genbank anteriormente indicado del transcrito de PDE4D7, y también se refiere a la secuencia de aminoácidos correspondiente expuesta en la SEQ ID NO: 2, que corresponde a la secuencia del número de referencia de Genbank anteriormente indicado del polipéptido de PDE4D7 codificado por el transcrito de PDE4D7. La expresión también comprende secuencias de nucleótidos que muestran un alto grado de homología con PDE4D7, por ejemplo secuencias de ácidos nucleico que son al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta 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 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, o secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, o secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de ácido nucleico que son al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

La expresión “gen de fosfodiesterasa PDE4D7 humana”, “gen de PDE4D7” o “gen marcador de PDE4D7” como se usa en el presente documento se refiere al gen que codifica fosfodiesterasa 4D. Preferentemente, la expresión se refiere a un gen que expresa fosfodiesterasa 4D como variante de corte y empalme 7, por ejemplo la combinación exónica específica definida en el N.º de referencia de Genbank: AF536976 (versión AF536976.1, GI:22901883 a fecha del 3 de marzo de 2009) o expuesta en la SEQ ID NO: 1. La expresión también se refiere a moléculas de ADN procedentes de transcritos de ARNm que codifican fosfodiesterasa 4D con corte y empalme como la variante 7, preferentemente moléculas de ADNc.

La expresión “marcador” o “marcador de 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 proteica) como se ha definido anteriormente en el presente documento, cuyo nivel de expresión está aumentado en célula o tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o en cualquier tipo de muestra que comprenda dichas células o tejidos o partes o fragmentos de los mismos, en comparación con un nivel de control, preferentemente en comparación con la expresión en tejido normal o tejido de tumor benigno de próstata. La expresión también se refiere a cualquier producto de expresión de dicha unidad genética o secuencia, en particular a un transcrito de ARNm de PDE4D7, un polipéptido o proteína codificado por el transcrito de PDE4D7 o variantes o fragmentos de los mismos, así como derivados homólogos de los mismos como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

La expresión “nivel de expresión” como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de transcrito de PDE4D7 y/o proteína PDE4D7 que puede obtenerse de un número definido de células o una parte de tejido definida, preferentemente a la cantidad de transcrito de PDE4D7 y/o proteína PDE4D7 que puede obtenerse en un procedimiento de extracción de ácido nucleico (por ejemplo, ARN) o proteína convencional. Los expertos en la materia conocen métodos de extracción adecuados.

La expresión “nivel de control” (o “estado de control”), como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel de expresión que puede determinarse al mismo tiempo y/o en condiciones similares o comparables a la muestra de ensayo usando una muestra o muestras previamente recogidas y almacenadas de un sujeto/sujetos cuya afección o

patología, por ejemplo, tumor de próstata no canceroso, normal o benigno, cáncer de próstata avanzado, etc. se conocen. La expresión "patología" o "patología cancerosa" se refiere a cualquier estado o tipo de condición celular o molecular entre un estado celular no canceroso e (incluyendo) un estado celular canceroso terminal. Preferentemente, la expresión incluye diferentes estadios de proliferación/desarrollo canceroso o niveles de desarrollo tumoral en el organismo entre (y excluyendo) un estado celular no canceroso e (incluyendo) un estado celular canceroso terminal. Dichos estadios del desarrollo pueden incluir todos los estadios del sistema de clasificación de TNM (Tumor, Nodo, Metástasis) de tumores malignos definido por la UICC, por ejemplo, estadio 0 y I a IV. La expresión también incluye estadios antes del estadio 0 de TNM, por ejemplo, estadios de desarrollo en los que los biomarcadores de cáncer conocidos por los expertos en la materia muestran una expresión o un patrón de expresión modificado.

El nivel de expresión como se ha mencionado anteriormente puede ser preferentemente el nivel de expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. Como alternativa o adicionalmente, el nivel de expresión también puede ser el nivel de expresión de cualquier otro gen o elemento génico adecuado expresado en una célula, preferentemente en el contacto de PDE4D7, por ejemplo, el nivel de expresión de otra fosfodiesterasa, el nivel de expresión de un gen constitutivo, por ejemplo, GAPDH o PBGD.

El término "canceroso" se refiere en el contexto de la presente invención a una patología cancerosa como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La expresión "no canceroso" se refiere en el contexto de la presente invención a una condición en la que no puede detectarse proliferación ni benigna ni maligna. Se conocen en la técnica medios adecuados para dicha detección.

Un nivel de control preferido en el contexto de la presente invención es la expresión de PDE4D7 en tejido normal, es decir, sano o no canceroso, o la expresión de PDE4D7 en tejido de tumor benigno de próstata. La expresión "tumor benigno de próstata" 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 una manera limitada, agresiva, no invade tejidos circundantes y no metastatiza. Normalmente, un tumor benigno de próstata implica una enfermedad de hinchamiento o neoplásica prostática no progresiva y leve que carece de las propiedades invasivas de un cáncer. Además, los tumores prostáticos benignos están normalmente encapsulados, y por lo tanto inhibidos en su capacidad para comportarse de una manera maligna. Un tumor benigno o una condición sana pueden determinarse por cualquier método molecular, histológico o fisiológico independiente, adecuado, conocido por el experto en la materia.

Como alternativa, el nivel de control puede determinarse mediante un método estadístico basado en los resultados obtenidos analizando el nivel o niveles de expresión previamente determinados del gen marcador de PDE4D7 de la presente invención en muestras de sujetos cuya patología se conoce. Además, el nivel de control puede obtenerse de una base de datos de patrones de expresión o niveles de expresión de sujetos, tejidos o células previamente ensayados. Además, el nivel de expresión de los genes marcadores de la presente invención en una muestra biológica para ensayar puede compararse con múltiples niveles de control, cuyos niveles de control se determinan a partir de múltiples muestras de referencia. Se prefiere usar un nivel de control determinado a partir de una muestra de referencia procedente de un tipo tisular similar al de la muestra biológica procedente de paciente. Se prefiere en particular usar una muestra o muestras procedentes de un sujeto/sujetos cuya patología no es cancerosa como se ha definido anteriormente en el presente documento, es decir que presentan una condición sana en la que no puede detectarse proliferación ni benigna ni maligna. También se prefiere en particular usar una muestra o muestras procedentes de un sujeto/sujetos que tienen tumor benigno de próstata como se ha definido anteriormente en el presente documento, es decir que presentan una condición sana en la que puede detectarse proliferación benigna. En otra realización de la presente invención, el nivel de control puede determinarse a partir de una muestra de referencia procedente de un sujeto que se ha diagnosticado que padece cáncer de próstata, por ejemplo, cáncer de próstata independiente de hormonas o resistente a hormonas.

Como alternativa, las muestras de referencia pueden comprender material procedente de líneas celulares, por ejemplo, líneas celulares de cáncer inmortalizadas, o procedentes de xenoinjertos tisulares. Preferentemente, el material procedente de líneas celulares de cáncer de próstata o material procedente de xenoinjertos tisulares con tejido de próstata humano, en particular con tejido de próstata humana procedente de tumor y benigno, puede estar comprendido en una muestra de referencia según la presente invención. Los ejemplos de líneas celulares cancerosas preferidas comprenden las líneas celulares PC346P, PC346B, LNCaP, VCaP, DuCaP, PC346C, PC3, DU145, PC346CDD, PC346Flu1, PC346Flu2. Los ejemplos de xenoinjertos preferidos comprenden PC295, PC310, PC-EW, PC82, PC133, PC135, PC324 y PC374. Preferentemente puede usarse un panel completo de líneas celulares y xenoinjertos, por ejemplo, el panel de PC346 humano.

En una alternativa preferida, adicional, las muestras de referencia pueden proceder de tejidos de pacientes, o paneles tisulares o colecciones tisulares obtenidas en ambientes clínicos. Las muestras pueden obtenerse, por ejemplo, de pacientes varones que se someten a cirugía. Las muestras pueden proceder de cualquier tipo tisular adecuado, por ejemplo, de tejido prostático o ganglios linfáticos. Los ejemplos preferidos de colecciones de tejido de pacientes proceden de procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, prostatectomía).

Por otra parte, se prefiere usar el valor convencional de los niveles de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención en una población con una patología conocida, por ejemplo, una población que tiene tumor benigno de próstata o una población sana. El valor convencional puede obtenerse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse como valor convencional un intervalo de media ± 2 DT (desviación típica) o media ± 3 DT.

Además, el nivel de control también puede determinarse al mismo tiempo y/o en condiciones similares o comparables a la muestra de ensayo usando una muestra o muestras previamente recogidas y almacenadas de un sujeto/sujetos cuya patología se sabe que es cancerosa, es decir a los que se ha diagnosticado de forma independiente que padecen cáncer de próstata, en particular cáncer maligno de próstata sensible 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 cancerosa, por ejemplo, es una muestra tisular sana o una muestra de tumor benigno de próstata, se denomina "nivel de control normal".

Si el nivel de control se determina a partir de una muestra biológica cancerosa, en particular una muestra de un sujeto para el que se diagnosticó de forma independiente cáncer resistente a hormonas, se puede designar como "nivel de control canceroso".

La expresión "cáncer de próstata" se refiere a un cáncer de la glándula prostática en el sistema reproductor masculino, que se produce cuando células de la próstata mutan y comienzan a multiplicarse fuera de control. Normalmente, el cáncer de próstata está ligado a un nivel elevado de antígeno específico de próstata (PSA). En una realización de la presente invención la expresión "cáncer de próstata" se refiere a un cáncer que muestra niveles de PSA por encima de 4,0. En otra realización la expresión se refiere a cáncer que muestra niveles de PSA por encima de 2,0. La expresión "nivel de PSA" se refiere a la concentración de PSA en la sangre en ng/ml.

La expresión "cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" significa que el crecimiento y la proliferación de cáncer de próstata o líneas celulares de cáncer de próstata es sensible a la estimulación de hormonas sexuales masculinas. El término "sensible" se refiere a situaciones en las que el cáncer de próstata o la línea celular del cáncer de próstata muestra un patrón de reacción bioquímico o celular en presencia de hormonas sexuales masculinas, pero no necesita una hormona sexual masculina para el crecimiento y/o la proliferación. Se entiende en consecuencia que una próstata sensible a hormonas es un tumor maligno de próstata que se ha desarrollado a partir de formas premalignas como PIN (Neoplasia Intraepitelial Prostática) y se caracteriza por el hecho de que su crecimiento aún depende de la presencia de las hormonas sexuales masculinas andrógenos. Por el contrario, una vez que dichos tumores se han tratado mediante terapias de empobrecimiento de hormonas estos cánceres normalmente se desarrollan a una forma resistente a hormonas que crece independientemente de la presencia de andrógenos.

La expresión "cáncer de próstata resistente a hormonas" significa por lo tanto que el crecimiento y la proliferación de cáncer de próstata o líneas celulares de cáncer de próstata es resistente a estimulación de hormonas sexuales masculinas. La expresión también se refiere a un estadio tardío del desarrollo de cáncer de próstata que ya no es susceptible de administración de anti-hormonas, preferentemente anti-andrógenos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La expresión "hormona sexual masculina" como se usa en el presente documento se refiere a un andrógeno, preferentemente a testosterona, androstenediona, dihidrotestosterona, deshidroepiandrosterona, androstenediol o androsterona.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere al uso de PDE4D7 en el diagnóstico, la detección, la supervisión o el pronóstico de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o el diagnóstico, la detección, la supervisión o el pronóstico de la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

La expresión "diagnóstico de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" como se usa en el presente documento significa que un sujeto o individuo padece un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, cuando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención está aumentado o regulado positivamente, en comparación con un nivel de control como se ha definido anteriormente en el presente documento, preferentemente si se compara con el nivel de control normal definido anteriormente en el presente documento. El término "diagnóstico" también se refiere a la conclusión alcanzada mediante ese proceso de comparación.

La expresión "aumentado" o "nivel de expresión aumentado" o "nivel de expresión regulado positivamente" o "aumento del nivel de expresión" (que pueden usarse de forma sinónima) en el contexto de la presente invención indica por lo tanto una elevación en el nivel de expresión entre una situación para analizar, por ejemplo una situación que puede proceder de una muestra de un paciente, y un punto de referencia, que podría ser un nivel de control normal o nivel de control canceroso que puede proceder de cualquier estadio tumoral o de cáncer de próstata adecuado conocido por el experto en la materia. Se considera que los niveles de expresión están "aumentados" cuando la expresión del gen de PDE4D7, por ejemplo en una muestra para analizar, difiere en, es decir, está

elevada en, por ejemplo 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, o más del 50 % en comparación con un nivel de control, o en 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 ha definido anteriormente en el presente documento. Si va a llevarse a cabo una comparación con un nivel de control canceroso, se prefiere una comparación adicional con un nivel de control normal. Dicha comparación adicional permite la determinación de una tendencia de la modificación, por ejemplo, puede observarse la magnitud de un aumento del nivel de expresión y/o pueden extraerse conclusiones correspondientes. Se prefiere una comparación con un tumor benigno de próstata, o con un tejido sano o una muestra procedente de un individuo sano.

En una realización adicional, una similitud adicional en el patrón de expresión génica general entre una muestra obtenida de un sujeto y una referencia como se ha definido anteriormente en el presente documento, que es canceroso, indica que el sujeto padece un cáncer de próstata. En otra realización de la presente invención, el diagnóstico puede combinarse con la dilucidación de niveles de expresión de biomarcadores de cáncer adicionales, en particular biomarcadores de cáncer de próstata. Los biomarcadores adecuados, en particular biomarcador de cáncer de próstata, serían conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, puede ensayarse la expresión de biomarcadores como PSA.

Puede considerarse que se diagnostica un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas cuando aumenta el nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención, en comparación con el nivel de control normal como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida adicional puede considerarse que se diagnostica un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas si el nivel de expresión de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, está aumentado en un valor de entre 20 % y 80 %, preferentemente en un valor de 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 70 % en una muestra de ensayo 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 ha definido anteriormente en el presente documento. En una realización particularmente preferida puede considerarse que se diagnostica un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas si el nivel de expresión de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, está aumentado en un factor de 1,5 a 10 veces, preferentemente en un factor de 2 a 5 veces en una muestra de ensayo en comparación con un nivel de control normal, en particular un tejido sano o un tumor benigno de próstata.

La expresión “detección de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas” como se usa en el presente documento significa que puede determinarse la presencia de una enfermedad o un trastorno de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en un organismo o que puede identificarse dicha enfermedad o dicho trastorno en un organismo. La determinación o identificación de una enfermedad o trastorno de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas pueden realizarse mediante una comparación del nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención y el nivel de control normal como se ha definido anteriormente en el presente documento. Puede detectarse un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas cuando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 está aumentado en comparación con el nivel de control normal como se ha definido anteriormente en el presente documento. En una realización preferida de la presente invención puede detectarse un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas si el nivel de expresión del marcador PDE4D7 es similar a un nivel de expresión de una célula o línea celular de cáncer de próstata establecida, por ejemplo, establecida de forma independiente, por ejemplo, una línea celular de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, o una línea celular como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

La expresión “supervisión de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas” como se usa en el presente documento se refiere al acompañamiento de una enfermedad o un trastorno de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas diagnosticado o detectado, por ejemplo, durante un procedimiento de tratamiento o durante un determinado periodo de tiempo, normalmente durante 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años o cualquier otro periodo de tiempo. El término “acompañamiento” significa que los estados de enfermedad como se han definido anteriormente en el presente documento y, en particular, cambios de estos estados de enfermedad pueden detectarse comparando el nivel de expresión del marcador PDE4D7 de la presente invención en una muestra con un nivel de control normal como se ha definido anteriormente en el presente documento, preferentemente un nivel de expresión de control procedente de un control de tumor benigno o un control sano o con el nivel de expresión de una célula o línea celular de cáncer de próstata establecida, por ejemplo establecida de forma independiente, por ejemplo, una línea celular de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, o una línea celular en cualquier tipo de segmento temporal 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 años, cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años, durante cualquier periodo 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. La célula o línea celular de cáncer de próstata establecida, por ejemplo, establecida de forma independiente, que da lugar a un nivel de control adicional puede proceder de muestras correspondientes a diferentes estadios del desarrollo de cáncer, por ejemplo estadios 0 y I a IV del sistema de clasificación de TNM. En una realización preferida de la presente invención la expresión se refiere al acompañamiento de un cáncer de próstata diagnosticado, más preferentemente de un cáncer maligno de

próstata sensible a hormonas. La supervisión también puede incluir la detección de la expresión de genes o elementos genéticos adicionales, por ejemplo, genes constitutivos como GAPDH o PBGD, u otras fosfodiesterasas, preferentemente PDE4D5.

5 La expresión "pronóstico de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" como se usa en el presente documento se refiere a la predicción de la evolución o el resultado de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas diagnosticado o detectado, por ejemplo, durante un determinado periodo de tiempo, durante un tratamiento o después de un tratamiento. La expresión también se refiere a una determinación de probabilidad de supervivencia o recuperación de la enfermedad, así como una predicción del tiempo de supervivencia esperado de un sujeto. Un pronóstico puede implicar, específicamente, el establecimiento de la probabilidad de supervivencia de un sujeto durante un periodo de tiempo en el futuro, tal como 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 5 años, 10 años o cualquier otro periodo de tiempo.

15 La expresión "progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" como se usa en el presente documento se refiere a un cambio entre diferentes estadios del desarrollo de cáncer, por ejemplo estadios 0 y I a IV de la clasificación de TNM, o cualquier otro estadio o subestadio, partiendo de una condición sana hasta un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Normalmente, dichos cambios están acompañados de una modificación del nivel de expresión de PDE4D7, normalmente un aumento, en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de ensayo previa del mismo individuo, por ejemplo en comparación con una muestra procedente de un control de tumor maligno de próstata o un control de tejido sano. Una progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede considerarse detectada o diagnosticada si el nivel de expresión de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, está aumentado en un valor de entre 3 % y 50 %, preferentemente en un valor de 10 %, 15 %, 20 % o 25 % en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de ensayo previa del mismo individuo. La modificación puede detectarse durante cualquier periodo de tiempo, preferentemente 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 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 periodo de tiempo indicado anteriormente.

30 En una realización particularmente preferida de la presente invención la expresión "progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" se refiere a un cambio de un estado sano o un estado de tumor benigno de próstata a un estado de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Una progresión desde un estado sano hasta un estado de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede considerarse detectada o diagnosticada si el nivel de expresión de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, está aumentado en un valor de entre 20 % y 50 %, preferentemente en un valor de 20 %, 25 %, 30 % o 35 % en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de ensayo previa del mismo individuo, que se hubo diagnosticado como sano. Como alternativa, para la comparación pueden usarse muestras de ensayo de otros individuos, por ejemplo muestras de ensayo de individuos sanos. También se prevé el uso de información de bases de datos disponibles acerca de la expresión o el empleo de muestras de colección de células cancerosas, etc.

40 Una progresión desde un estado de tumor benigno de próstata a un estado de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede considerarse detectada o diagnosticada si el nivel de expresión de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, está aumentado en un valor de entre 3 % y 30 %, preferentemente en un valor de 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de ensayo previa del mismo individuo, que se ha diagnosticado que padece un tumor benigno de próstata. Como alternativa, para la comparación pueden usarse muestras de ensayo de otros individuos, por ejemplo muestras de ensayos de individuos que se ha diagnosticado que padecen tumores benignos de próstata. También se prevé el uso de información de bases de datos disponibles acerca de la expresión o el empleo de muestras de colección de células cancerosas, etc.

50 La modificación puede detectarse durante cualquier periodo de tiempo, preferentemente 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 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 periodo de tiempo indicado anteriormente.

55 En una realización adicional la presente invención se refiere al diagnóstico y la detección de una predisposición para desarrollar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Una "predisposición para desarrollar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" en el contexto de la presente invención es un estado de riesgo del desarrollo de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Preferentemente puede estar presente una predisposición para desarrollar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en casos en los que el nivel de expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento está por encima de un nivel de control normal o canceroso como se ha definido anteriormente en el presente documento, es decir un nivel de expresión de referencia procedente de tejidos o muestras de un sujeto que están evidentemente sanos. La expresión "por encima de" en este contexto se refiere a un nivel de expresión de PDE4D7 que está aumentado en aproximadamente 2 % a 20 % en comparación con dicho nivel de control sano, preferentemente aumentado en aproximadamente 15 %. En una realización específica el nivel de expresión de PDE4D7 puede estar por encima de un nivel de control normal y al mismo tiempo por debajo de un nivel de control canceroso. La expresión "por debajo de" cómo se usa en el

presente documento significa que el nivel de expresión de PDE4D7 está reducido en aproximadamente de 5 % a 10 % en comparación con dicho nivel de control canceroso, preferentemente reducido en aproximadamente 7 %. Como alternativa, una predisposición para desarrollar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en el contexto de la presente invención puede darse en situaciones en las que el nivel de expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento está por encima de un nivel de control normal y/o por encima o por debajo de un nivel de control canceroso como se ha definido anteriormente en el presente documento y en el que, además, los marcadores de cáncer alternativos, por ejemplo PSA, no muestran modificación del nivel de expresión o el patrón de expresión. Los expertos en la materia conocen marcadores de cáncer adicionales adecuados.

Por lo tanto, una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede considerarse diagnosticada o detectada si se observa una de las situaciones representadas anteriormente.

La diferencia entre los niveles de expresión de una muestra biológica de ensayo y un nivel de control puede normalizarse con respecto al nivel de expresión de ácidos nucleicos de control adicionales, por ejemplo genes constitutivos cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren dependiendo del estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes de control ejemplares incluyen entre otros β -actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), porfobilinógeno desanimasa (PBGD) y proteína ribosómica P1. La normalización también puede llevarse a cabo con otras fosfodiesterasas, preferentemente con una fosfodiesterasa humana que muestra un patrón de expresión inalterado en diferentes estadios tumorales. Una fosfodiesterasa preferida es cualquier isoforma de PDE4D excepto PDE4D7, más preferentemente es PDE4D5.

En el contexto de la presente invención, también se pretende que los términos “diagnóstico” y “pronóstico” abarquen predicciones y análisis de probabilidad. PDE4D7 como marcador puede usarse en consecuencia clínicamente en la toma de decisiones con respecto a modalidades de tratamiento, incluyendo intervención terapéutica o criterios de diagnóstico tales como una vigilancia para la enfermedad. Según la presente invención, puede proporcionarse un resultado intermedio para examinar la condición de un sujeto. Dicho resultado intermedio puede combinarse con información adicional para ayudar a un médico, enfermero u otro practicante a diagnosticar que un sujeto padece la enfermedad. Como alternativa, la presente invención puede usarse para detectar células cancerosas en un tejido procedente del sujeto, y proporcionar a un médico información útil para diagnosticar que el sujeto padece la enfermedad.

Un sujeto o individuo para diagnosticar, supervisar o en el que va a detectarse o pronosticarse un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, una progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas según la presente invención es un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

Se prefiere en particular el uso de herramientas de captura de imágenes moleculares conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) y/o tecnología de captura de imágenes por resonancia fotónica magnética (IFM) en el contexto del uso de PDE4D7 como un marcador para diagnóstico, detección, supervisión o pronóstico de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas de la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. Por ejemplo, puede usarse PDE4D7 como un marcador para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en enfoques como IRM o IFM que permiten la detección en línea del marcador de diagnóstico en un sujeto humano.

En un aspecto adicional a presente invención se refiere a una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en un individuo. La composición según la presente invención puede comprender un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o peptídico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7.

La expresión “ligando de afinidad de ácido nucleico para el producto de expresión de PDE4D7” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente con un transcrito de PDE4D7 o una molécula de ADN procedente de la variante de corte y empalme 7 de PDE4D, aún más preferentemente a la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o a la secuencia de ADN complementario de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o una molécula de ARN correspondiente. El ligando de afinidad de ácido nucleico también puede ser capaz de unirse específicamente con 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 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.

La expresión “ligando de afinidad peptídico para la proteína PDE4D7” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula peptídica que es capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7. La molécula peptídica puede ser capaz preferentemente de unirse específicamente con una proteína o un polipéptido que

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. El ligando de afinidad peptídico puede ser capaz también de unirse específicamente con una proteína o un 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 expuesta 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 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 puede combinarse con restos o funcionalidades químicas adicionales.

La expresión "producto de expresión" como se usa en el presente documento se refiere a un transcrito de PDE4D7 o una molécula de ARNm generada por la expresión del gen de PDE4D. Más preferentemente, la expresión se refiere a un transcrito de PDE4D procesado como se ha definido anteriormente en el presente documento, por ejemplo mediante la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida de la presente invención la composición de la presente invención comprenden ligandos de afinidad de ácido nucleico y/o peptídicos seleccionados del grupo que consiste en un conjunto de oligonucleótidos específico 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 PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y una variante de anticuerpo específica para la proteína 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. La expresión "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 de la cadena con sentido o antisentido de la variante de corte y empalme 7 de PDE4D. Preferentemente, el oligonucleótido es complementario de la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o de la secuencia de ADN complementaria de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia oligonucleotídica puede ser complementaria también de 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 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.

El oligonucleótido puede tener cualquier longitud y secuencia adecuada conocida por un experto en la materia, que puede proceder de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o su complemento. Normalmente, el oligonucleótido puede tener una longitud de entre 8 y 60 nucleótidos, preferentemente de entre 10 y 35 nucleótidos, más preferentemente 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 oligonucleotídicas específicas para el producto de expresión de PDE4D7 pueden definirse con la ayuda de herramientas de software conocidas por el experto en la materia.

En una realización adicional de la presente invención las secuencias oligonucleotídicas pueden ser complementarias de secuencias localizadas en el exón 1 o el exón 2 del gen de PDE4D7, de secuencias localizadas en el límite entre el exón 1 y el exón 2 del gen de PDE4D7, o de secuencias localizadas en el exón 2 del gen de PDE4D7 solamente, preferentemente de 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 un cebador directo puede localizarse en el límite entre el exón 1 y el exón 2 del gen de PDE4D7 y el oligonucleótido utilizable como un cebador inverso puede localizarse en el exón 2 del gen de 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 además los oligonucleótidos que tienen o que comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10 y/o la SEQ ID NO: 11.

La expresión "sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7" como se usa en el presente documento significa una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la cadena con sentido o antisentido de la variante de corte y empalme 7 de PDE4D. Preferentemente, la sonda es complementaria de la secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o de la secuencia de ADN complementaria de la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de sonda también puede ser complementaria de 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 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.

La sonda puede tener cualquier longitud y secuencia adecuada conocida por los expertos en la materia, que puede proceder de la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o su complemento. Normalmente, la sonda puede tener una longitud

de entre 6 y 300 nucleótidos, preferentemente de entre 15 y 60 nucleótidos, más preferentemente 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 pueden definirse con la ayuda de herramientas de software conocidas por los expertos en la materia.

En una realización adicional de la presente invención la secuencia de sonda puede ser complementaria de una secuencia localizada en el exón 1 o el exón 2 del gen de PDE4D7, preferentemente de 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. Si la sonda va a utilizarse para reacciones de PCR cuantitativas, por ejemplo PCR en tiempo real, la sonda puede diseñarse de modo que se localice en una posición entre las posiciones de unión de un cebador directo e inverso. Preferentemente, la sonda puede diseñarse de modo que se localice en proximidad a uno de los oligonucleótido cebadores. Más preferentemente, puede localizarse en proximidad al 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: 12.

La composición de la presente invención puede comprender adicionalmente o como alternativa un aptámero específico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7. La expresión "aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico corta, por ejemplo ARN, ADN, DNA, PNA, CNA, HNA, LNA o ANA o cualquier otro formato de ácido nucleico adecuado conocido por los expertos en la materia, que es capaz de unirse específicamente con la variante de corte y empalme 7 de PDE4D, preferentemente la molécula de ADN procedente de la variante de corte y empalme 7 de PDE4D. Más preferentemente, la molécula de aptámero de ácido nucleico puede unirse específicamente con una secuencia de ADN representada en la SEQ ID NO: 1 o un derivado bicatenario de la misma. El aptámero de ácido nucleico según la presente invención también puede unirse con una molécula de ARN correspondiente al transcrito de PDE4D7, preferentemente una molécula de ARN correspondiente a la secuencia de ADN expuesta en la SEQ ID NO: 1.

El aptámero de ácido nucleico puede ser capaz además de unirse específicamente con 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 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.

Puede conferirse especificidad del aptámero de ácido nucleico para la variante de corte y empalme 7 de PDE4D mediante una unión específica con secuencias presentes solamente en dicha variante de corte y empalme, por ejemplo exón 2 o el límite exónico entre el exón 1 y el exón 2 de PDE4D. En una realización particular de la presente invención puede conferirse especificidad del aptámero de ácido nucleico para la variante de corte y empalme 7 de PDE4D mediante una unión específica con una secuencia localizada 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. Pueden generarse aptámeros de ácido nucleico según cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, por ejemplo mediante selección *in vitro* o métodos SELEX. Preferentemente, pueden generarse y/o diseñarse aptámeros de ácido nucleico según la orientación proporcionada en Ellington y Szostak, 1990, Nature, 346: 818-822. Un aptámero de ácido nucleico según la presente invención puede combinarse adicionalmente con restos adicionales, por ejemplo con partes interactivas como biotina o funcionalidades enzimáticas como elementos de ribozima.

La expresión "aptámero específico para la proteína PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido corto capaz de interactuar y unirse específicamente con la proteína PDE4D7. El aptámero peptídico puede ser capaz preferentemente de unirse específicamente con una proteína o un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. El aptámero peptídico también puede ser capaz de unirse específicamente con una proteína o un 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 expuesta en la SEQ ID NO: 1 o a una proteína o un 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. Normalmente, un aptámero peptídico es un bucle peptídico variable, que comprende, por ejemplo, de 10 a 20 aminoácidos. En el contexto de la presente invención el aptámero peptídico puede unirse preferentemente en uno o ambos extremos a una estructura de armazón. La estructura de armazón puede ser cualquier molécula, preferentemente una proteína, que tenga buenas propiedades de solubilidad. Las moléculas de armazón adecuadas serían conocidas por el experto en la materia. Una molécula de armazón preferida para usar en el contexto de la presente invención es la proteína bacteriana tiorredoxina-A. El bucle peptídico de aptámero puede insertarse preferentemente en un sitio activo reductor de la molécula de armazón. Como alternativa, pueden usarse proteína A estafilocócica y dominios de la misma y derivados de estos dominios, tales como proteína Z o lipocalinas como estructuras de armazón en el contexto de la presente invención.

Pueden generarse aptámeros peptídicos según cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia, por ejemplo mediante enfoques de dos híbridos de levadura.

En otra realización la presente invención se refiere a un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7. Dicho anticuerpo está contemplado para cualquier aplicación, uso, método, composición, inmunoensayo, método de exploración y composición o kit de diagnóstico o farmacéutica como se define en la presente solicitud. El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse con respecto al epítipo o epítipo o parte o partes del polipéptido de PDE4D7 de la presente invención que reconocen o con los que se unen específicamente. Son epítipos preferidos según la presente invención los aminoácidos 1-10, 2-11, 3-12, 4-13, 5-14, 6-15, 7-16, 8-17, 9-18, 10-19, 11-20, 12-21, 13-22, 14-23, 15-24, 16-25, 17-26, 18-27, 19-28, 20-29, 21-30, 22-31, 23-32, 24-33, 25-34, 26-35, 27-36, 28-37, 29-38, 30-39, 31-40, 32-41, 33-42, 34-43, 35-44, 36-45, 37-46, 38-47, 39-48, 40-49, 41-50, 42-51, 43-52, 44-53, 45-54, 46-55, 47-56, 48-57, 49-58, 50-59, 51-60, 52-61, 53-62, 54-63, 55-64, 56-65, 57-66, 58-67, 59-68, 60-69, 61-70, 62-71, 63-72, 64-73, 65-74, 66-75, 67-76, 68-77, 69-78, 70-79, 71-80, 72-81, 73-82, 74-83, 75-84, 76-85, 77-86, 78-87, 79-88, 80-89, 81-90, 82-91, 83-92, 84-93, 85-94, 86-95, 87-96, 88-97, 89-98, 90-99, 91-100, 1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24, 6-25, 7-26, 8-27, 9-28, 10-29, 11-30, 12-31, 13-32, 14-33, 15-34, 16-35, 17-36, 18-37, 19-38, 20-39, 21-40, 22-41, 23-42, 24-43, 25-44, 26-45, 27-46, 28-47, 29-48, 30-49, 31-50, 32-51, 33-52, 34-53, 35-54, 36-55, 37-56, 38-57, 39-58, 40-59, 41-60, 42-61, 43-62, 44-63, 45-64, 46-65, 47-66, 48-67, 49-68, 50-69, 51-70, 52-71, 53-72, 54-73, 55-74, 56-75, 57-76, 58-77, 59-78, 60-79, 61-80, 62-81, 63-82, 64-83, 65-84, 66-85, 67-86, 68-87, 69-88, 70-89, 71-90, 72-91, 73-92, 74-93, 75-94, 76-95, 77-96, 78-97, 79-98, 80-99, 81-100, 1-30, 2-31, 3-32, 4-33, 5-34, 6-35, 7-36, 8-37, 9-38, 10-39, 11-40, 12-41, 13-42, 14-43, 15-44, 16-45, 17-46, 18-47, 19-48, 20-49, 21-50, 22-51, 23-52, 24-53, 25-54, 26-55, 27-56, 28-57, 29-58, 30-59, 31-60, 32-61, 33-62, 34-63, 35-64, 36-65, 37-66, 38-67, 39-68, 40-69, 41-70, 42-71, 43-72, 44-73, 45-74, 46-75, 47-76, 48-77, 49-78, 50-79, 51-80, 52-81, 53-82, 54-83, 55-84, 56-85, 57-86, 58-87, 59-88, 60-89, 61-90, 62-91, 63-92, 64-93, 65-94, 66-95, 67-96, 68-97, 69-98, 70-99 o 71-100 de la proteína PDE4D7, preferentemente de la parte N terminal de la proteína PDE4D7, más preferentemente de la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

Están comprendidos además todos los otros epítipos adecuados, que pueden reconocerse, determinarse, describirse y posteriormente emplearse según métodos conocidos por los expertos en la materia.

La expresión "específico para la proteína PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a la detección y unión inmuno-específica de un anticuerpo con un epítipo antigénico como se ha definido anteriormente en el presente documento. La expresión "que se une de forma específica" excluye la unión inespecífica pero no excluye necesariamente reactividad cruzada con otros antígenos, en particular con antígenos que comprenden el mismo epítipo antigénico detectado por el presente anticuerpo.

En una realización preferida los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, multispecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, F(ab')₂, Fv, Fv con enlaces disulfuro, minicuerpos, diacuerpos, scFv, sc(Fv)₂, moléculas de inmunoglobulina completas, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, anticuerpos camelizados, anticuerpos que contienen V_{HH}, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para anticuerpos de la invención) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores.

Más preferentemente los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos de la presente invención e incluyen Fab, Fab' y F(ab')₂, Fv, Fv monocatenarios (scFv), sc(Fv)₂, anticuerpos monocatenarios, Fv con enlaces disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH.

La expresión "fragmento Fab" como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de anticuerpo que consisten en el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1), el dominio constante de la cadena ligera (CL), el dominio variable de la cadena pesada (VH) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) de una proteína de inmunoglobulina intacta. La expresión "F(ab')₂" o "fragmento F(ab')₂" como se usa en el presente documento se refieren a fragmentos de anticuerpo que consisten en dos primeros dominios constantes de la cadena pesada (CH1), dos dominios constantes de la cadena ligera (CL), dos dominios variables de la cadena pesada (VH) y dos dominios variables de la cadena ligera (VL) de una proteína de inmunoglobulina intacta, es decir, comprende dos fragmentos Fab. La expresión "fragmento Fab" como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos procedentes de moléculas de "F(ab')₂", preferentemente fragmentos que comprenden el enlace S-S en la región bisagra del anticuerpo. La expresión "fragmentos Fv" como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de anticuerpo que consisten en los dos dominios de anticuerpo variables VH y VL. La expresión "fragmento Fv monocatenario (scFv)" como se usa en el presente documento se refiere a fragmentos de anticuerpo que consisten en los dos dominios VH y VL unidos entre sí por un enlazador peptídico flexible.

Los anticuerpos según la invención pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humanos, murinos (por ejemplo, de ratón y de rata), de burro, de mono, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo.

5 Los anticuerpos según la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de la presente invención como para un epítomo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

10 Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse con respecto a su reactividad cruzada. En una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere a anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido de la presente invención. Sin embargo, también se incluyen en la presente invención anticuerpos que se unen con polipéptidos con al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al menos 55 % y al
15 menos 50 % de identidad (calculada usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un polipéptido de la presente invención.

La invención también proporciona anticuerpos que pueden inhibir de forma competitiva la unión de un anticuerpo con un epítomo de la invención como se determina por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva, por ejemplo, mediante inmunoensayos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión con el epítomo en al menos 95 %, al menos 90 %, al menos 85 %, al menos 80 %, al menos 75 %, al menos 70 %, al menos 60 % o al menos 50 %.

25 En una realización adicional los anticuerpos de la invención incluyen derivados que se modifican, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con el anticuerpo de modo que dicha unión covalente no evite que el anticuerpo se una específicamente con el epítomo, o que genere una respuesta anti-idiotípica. Son ejemplos típicos de dichas modificaciones glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión con un ligando celular u otra proteína, etc. Pueden llevarse a cabo modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo escisión
30 química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Pueden producirse anticuerpos según cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. Pueden producirse anticuerpos policlonales mediante inmunización de animales con el antígeno de preferencia. Por ejemplo,
35 un polipéptido de la invención puede administrarse a diversos animales hospedadores incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago. Pueden producirse anticuerpos monoclonales de especificidad definida usando, por ejemplo, la tecnología de hibridoma desarrollada por Kohler y Milstein (Kohler y Milstein, 1976, Eur. J. Immunol., 6: 511-519).

40 Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

45 La expresión "anticuerpo quimérico" como se ha usado anteriormente en el presente documento se refiere a una molécula en la que diferentes partes del anticuerpo proceden de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La expresión "anticuerpo humanizado" como se ha usado anteriormente en el presente documento se refiere a moléculas de anticuerpo que se unen con el antígeno deseado que tiene una o más regiones
50 determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco conservadas de una molécula de inmunoglobulina humana. Los expertos en la materia conocen técnicas para la producción de anticuerpos humanizados. La expresión "anticuerpo humano" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos que tiene la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas.

55 En una realización adicional de la presente invención el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha definido anteriormente puede ser biotinilado o marcado. El término "biotinilado" como se usa en el presente documento significa que dicho anticuerpo está unido covalentemente con la molécula biotina. Normalmente, la biotina puede estar unida a aminos primarios, por ejemplo presentes como cadenas laterales de lisina en aminos épsilon o aminos
60 alfa N terminales. Como alternativa, el enlace puede realizarse mediante grupos sulfhidrilo, grupos carboxilo, grupos de azúcares o restos presentes en la molécula de anticuerpo. Asimismo, la biotinilación puede llevarse a cabo como biotinilación inespecífica.

La expresión "anticuerpo marcado" como se usa en el presente documento significa que dicho anticuerpo puede
65 comprender uno o más marcadores en el extremo C o N de las cadenas de anticuerpo. Como alternativa, dicho anticuerpo puede comprender también uno o más marcadores en cualquier posición a lo largo de la molécula.

Preferentemente dicho anticuerpo comprende entre 1 y 10 marcadores, que pueden ser idénticos o diferentes o cualquier combinación de los mismos. Más preferentemente, el anticuerpo puede comprender entre 1 y 5 marcadores, aún más preferentemente un marcador. Dichos marcadores pueden ser cualquier marcador adecuado conocido por los expertos en la materia, por ejemplo marcadores radiactivos, fluorescentes o quimioluminiscentes.

En una realización particularmente preferida dicho marcador es un marcador radiactivo, un marcador enzimático, marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o uno bioluminiscente.

La expresión "marcador enzimático" se refiere a marcadores que comprenden actividades enzimáticas. Un ejemplo preferido, típico, es la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), que puede estar unida o conectada con el anticuerpo. Este complejo enzimático puede catalizar posteriormente la conversión de un sustrato adecuado, por ejemplo un sustrato quimioluminiscente a un reactivo sensibilizado en proximidad al anticuerpo lo que conduce en última estancia a la emisión de luz o una reacción de producción color. En particular, la quimioluminiscencia potenciada, que puede usarse en este contexto, permite la detección de cantidades mínimas de moléculas marcadas.

La expresión "marcador radiactivo" se refiere a marcadores que emiten radiación radiactiva, preferentemente compuestos de isótopos radiactivos. La expresión "isótopo radiactivo" en el contexto del marcador se refiere a cualquiera de dichos factores conocidos por los expertos en la materia. Más preferentemente, la expresión se refiere a ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S o ^{125}I .

La expresión "marcador quimioluminiscente" se refiere a un marcador que es capaz de emitir luz (luminiscencia) con una emisión limitada de calor como resultado de una reacción química. Preferentemente, la expresión se refiere a luminol, cyalume, cloruro de oxalilo, TMAE (tetraquis (dimetilamino) etileno), piragalol, lucigenina, acridinuméster o dioxetano.

La expresión "marcador bioluminiscente" se refiere a un marcador que es capaz de emitir luz debido a una reacción bioquímica. Normalmente, la expresión se refiere a la producción de luz debida a la reacción de una luciferina y una luciferasa. En dicho esquema de reacción, la luciferasa cataliza la oxidación de luciferina dando como resultado luz y una oxiluciferina inactiva. Por ejemplo, un anticuerpo según la presente invención puede estar unido a una luciferasa. Como alternativa, el anticuerpo también puede estar marcado con luciferina. La luciferina y la luciferasa así como un cofactor tal como oxígeno, pueden unirse entre sí para formar una única fotoproteína. Esta molécula puede unirse a un anticuerpo según la presente invención. Puede desencadenarse una emisión de luz cuando esté presente un compuesto particular, por ejemplo un tipo específico de ion, preferentemente calcio. Los ejemplos de luciferina para usar en el contexto de la presente invención incluyen luciferina bacteriana, luciferina de dinoflagelado, vargulina, coelenterazina y luciferina de luciérnaga.

La expresión "marcador fluorescente" se refiere a derivados químicamente reactivos de un fluoróforo. Normalmente los grupos reactivos comunes incluyen derivados de isotiocianato sensibles a amina tales como FITC y TRITC (derivados de fluoresceína y rodamina), ésteres de succinimidilo sensibles a amina tales como NHS-fluoresceína y fluores activados con maleimida sensible a sulfhidrilo tales como fluoresceín-5-maleimida. Según la presente invención puede usarse cualquier marcador fluorescente adecuado conocido por el experto en la materia. Preferentemente, pueden usarse los marcadores fluorescentes FITC, Fluoresceína, Fluoresceína-5-EX, 5-SFX, Rhodamine Green-X, BodipyFL-X, Cy2, Cy2-OSu, Fluor X, Bodipy TMR-X, Rodamina, Rhodamine Red-X, Texas Red, Texas Red-X, Bodipy TR-X, Cy3.5-OSu, Alexa fluors, Dylight fluors y/o Cy5.5-OSu. En una realización más preferida de la presente invención pueden usarse los marcadores fluorescentes 6-FAM, HEX, TET, ROX, Cy3, Cy3-OSu, Cy5, Cy5-OSu, Texas Red o Rodamina.

Como alternativa, los anticuerpos también pueden marcarse o combinarse con polipéptidos fluorescentes, por ejemplo proteína verde fluorescente (GFP) así como derivados de los mismos conocidos por los expertos en la materia.

Estos marcadores pueden usarse individualmente o en grupos en cualquier combinación. En otro aspecto más la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento. La invención también abarca moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones de hibridación rigurosas o de baja rigurosidad, por ejemplo como se ha definido anteriormente en el presente documento, con moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo codificado por dichas moléculas de hibridación se une específicamente con la proteína PDE4D, más preferentemente con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o epítopos contenidos en el mismo, por ejemplo como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Como alternativa, puede generarse un polinucleótido que codifica un anticuerpo a partir de un ácido nucleico de una fuente convencional.

En una realización adicional de la presente invención puede usarse una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento para expresión de anticuerpo recombinante. Preferentemente, dichos vectores de expresión contienen las secuencias codificantes de

anticuerpos y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Los vectores pueden comprender secuencias codificantes para la cadena pesada variable o la cadena ligera variable o ambas. Dichos vectores también pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes de la molécula de anticuerpo.

En una realización preferida pueden usarse células de mamífero, más preferentemente células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento de promotor del gen temprano intermedio mayor de citomegalovirus humano como un sistema de expresión eficaz para anticuerpos. En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse provechosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se exprese.

En otra realización la presente invención se refiere a una célula que produce el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento. Dicha célula puede ser una célula de hibridoma como se ha definido anteriormente en el presente documento o una célula que expresa una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la presente invención. Se prefieren particularmente células o líneas celulares que expresen de forma estable la molécula de anticuerpo.

Una vez que se ha producido, sintetizado o expresado de forma recombinante una molécula de anticuerpo de la invención, esta puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, preferentemente por afinidad por el antígeno específico después de Proteína A y de separación por tamaños en columna), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas conocida por el experto en la materia.

Además, los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos pueden fusionarse con cualquier secuencia polipeptídica heteróloga, por ejemplo para facilitar la purificación de anticuerpos o para proporcionar medios diana para el anticuerpo. También se prevé la fusión de proteínas o moléculas heterólogas citotóxicas, por ejemplo toxinas, etc. El experto en la materia conocería ejemplos y técnicas correspondientes.

En otra realización preferida de la presente invención la composición, por ejemplo, la composición de diagnóstico, puede comprender, o puede comprender adicionalmente, un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7, preferentemente variantes de anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmentos como un anticuerpo monocatenario, un diacuerpo, un minicuerpo, un fragmento Fv monocatenario (sc(Fv)), un anticuerpo sc(Fv)₂, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂ basándose en un anticuerpo específico de PDE4D7 monoclonal, un producto inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, un anticuerpo camelizado o anticuerpo que contiene V_{HH}, etc. como se ha definido anteriormente en el presente documento. En una realización específica de la presente invención pueden estar comprendidos en la composición o pueden usarse, por ejemplo para diagnóstico, anticuerpos anti-PDE4D7 disponibles en el mercado como NB300-652 (Novus Biologicals, Inc.) o GTX14629 (GeneTex, Inc.).

Un ligando de afinidad, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, puede marcarse con diversos marcadores o puede detectarse mediante un ligando de afinidad secundario, marcado con diversos marcadores, para permitir la detección, visualización y/o cuantificación. Esto puede conseguirse usando cualquier marcador adecuado, que puede conjugarse con el ligando de afinidad capaz de interaccionar con el producto de expresión de PDE4D7 o la proteína PDE4D7 o con cualquier otro ligando de afinidad secundario, usando cualquier técnica o método adecuado conocido por el experto en la materia. La expresión "ligando de afinidad secundario" se refiere a una molécula que es capaz de unirse con el ligando de afinidad como se ha definido anteriormente en el presente documento (es decir un "ligando de afinidad primario" si se usa en el contexto de un sistema con dos ligandos de afinidad de interacción). La interacción de unión es preferentemente una unión específica.

Los ejemplos de marcadores que pueden conjugarse con un ligando de afinidad primario y/o secundario 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 usar como una sonda, en particular una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento, puede marcarse con un marcador fluorescente como 6-FAM, HEX, TET, ROX, Cy3, Cy5, Texas Red o Rodamina y/o al mismo tiempo con un marcador interruptor como TAMRA, Dabcilo, interruptor Black Hole, BHQ-1 o BHQ-2. Se describe una diversidad de fluorescentes y cromóforos útiles adicionales en Stryer, 1968, Science, 162: 526-533. 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 ¹⁸F) o partículas (por ejemplo oro).

Los diferentes tipos de marcadores pueden conjugarse con un ligando de afinidad usando diversas químicas, por ejemplo la reacción de amina o la reacción de tiol. Sin embargo, también pueden usarse 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 ácido nucleico o ligando de afinidad peptídico de la presente invención pueden modificarse para actuar como un agente de contraste. La expresión "agente de contraste" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto molecular que es capaz de interaccionar específicamente con el marcador PDE4D7 y que puede detectarse mediante un aparato situado fuera del cuerpo humano o animal. Preferentemente, dichos agentes de contraste son adecuados para su uso en técnicas de captura de imágenes, por ejemplo en captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) o captura de imágenes fotónica magnética (IFM). La expresión "que interacciona específicamente" se refiere a la propiedad de un compuesto molecular para interaccionar preferentemente con el marcador PDE4D7 en la superficie celular de células que están presentes en el cuerpo humano o animal con respecto a otras proteínas que son expresadas por dichas células. Los agentes de contraste preferidos que también pueden designarse composiciones de agentes de contraste serán capaces de detectar específicamente moléculas que tengan 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 las mismas como se ha definido anteriormente en el presente documento. Son agentes de contraste preferidos aptámeros específicos para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento así como anticuerpos específicos para la proteína PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento o están ligados o asociados con dichos aptámeros.

Los agentes de contraste, además de su propiedad de ser capaces de reconocer específicamente el marcador PDE4D7 comprenderán además normalmente una molécula adicional que es detectable mediante la tecnología de detección específica usada. La expresión "modificado para actuar" como se usa en el presente documento se refiere por lo tanto a cualquier modificación adecuada conocida por los expertos en la materia, que puede ser necesaria para permitir el uso del agente de contraste en métodos de captura de imágenes moleculares, en particular en IRM o IFM. Por ejemplo, si se usa espectroscopia fluorescente como un medio de detección, dichas moléculas pueden comprender fluoróforos como moléculas marcadoras detectables que pueden excitarse a una longitud de onda específica. Como alternativa, puede emplearse un marcador radiactivo, por ejemplo un radioisótopo como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Con respecto a agentes de contraste preferidos de acuerdo con la invención que son adecuados para IRM, los agentes de contraste tales como los anticuerpos anteriormente descritos pueden comprender una molécula marcadora que es detectable mediante IRM. Dichos marcadores detectables incluyen por ejemplo USPIOS y 19Fluor.

En una realización específica de la presente invención una composición puede comprender adicionalmente ingredientes accesorios como tampones de PCR, dNTP, una polimerasa, iones como cationes bivalentes o cationes monovalentes, soluciones de hibridación, ligandos de afinidad secundarios como, 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 han definido anteriormente en el presente documento, que es conocido por el experto en la materia.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de un ligando de afinidad de ácido nucleico o peptídico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en un individuo, como se ha descrito anteriormente en el presente 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 ha definido anteriormente en el presente documento, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en un individuo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En otra realización preferida la presente invención se refiere al uso de un aptámero específico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o una predisposición para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en un individuo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En una realización adicional la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, para la preparación de una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer o la progresión de cáncer o una predisposición para cáncer en un individuo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida de la presente invención una composición como se ha definido anteriormente en el presente documento es una composición de diagnóstico.

En otra realización más la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7, como se ha definido anteriormente en el presente documento, para la preparación de una composición para el tratamiento de cáncer.

En otro aspecto la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

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

Normalmente, el kit de diagnóstico de la presente invención contiene uno o más agentes que permiten la detección específica de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. Los agentes o ingredientes de un kit de diagnóstico pueden, según la presente invención, estar comprendidos en uno o más recipientes o entidades separadas. La naturaleza de los agentes se determina mediante el método de detección para el que se pretende usar el kit. Cuando se pretenda la detección en el nivel de expresión de ARNm de PDE4D7, es decir mediante el producto de expresión de PDE4D7, los agentes que van a estar comprendidos pueden ser un conjunto de oligonucleótidos específico para el producto de expresión de PDE4D7 y/o una sonda específica para el producto de expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento, que pueden marcarse opcionalmente según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo con marcadores descritos anteriormente en el presente documento. Además o como alternativa puede estar comprendido un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7. Cuando se pretenda la detección al nivel de proteína PDE4D7, los agentes que van a estar comprendidos pueden ser uno o más anticuerpos o compuestos que contienen un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o variantes de anticuerpo específicas para la proteína PDE4D7, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Además o como alternativa, puede estar comprendido un aptámero específico para la proteína PDE4D7. Como alternativa, un kit de diagnóstico puede comprender un agente de contraste como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La presencia de proteínas específicas también puede detectarse usando otros compuestos que interaccionan específicamente con PDE4D7, por ejemplo sustratos o ligandos específicos.

Preferentemente, un kit de diagnóstico de la presente invención contiene reactivos de detección para productos de expresión de PDE4D7 o la proteína PDE4D7. Dichos reactivos de detección comprenden, por ejemplo, soluciones de tampón, marcadores o líquidos de lavado, etc. Asimismo, el kit puede comprender una cantidad de una molécula de ácido nucleico o proteína conocida, que puede usarse para una calibración del kit o como un control interno. Normalmente, 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 secundarios, por ejemplo anticuerpos secundarios, colorantes de detección y cualquier otro compuesto o líquido adecuado necesario para la realización de una detección de proteína basada conocida por el experto en la materia. Dichos ingredientes son conocidos por el experto en la materia y pueden variar dependiendo del método de detección llevado a cabo. Adicionalmente, el kit puede comprender un folleto de instrucciones y/o puede proporcionar información con respecto a la relevancia de los resultados obtenidos.

En otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, por ejemplo en un individuo, que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra. La expresión "determinar el nivel de PDE4D7" se refiere a la determinación de la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo transcrito o transcritos de PDE4D7 y/o la determinación de la presencia y/o cantidad de proteína o proteínas PDE4D7. La expresión "nivel de PDE4D7" significa por lo tanto la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo transcrito o transcritos de PDE4D7 y/o la determinación de la presencia o cantidad de proteína o proteínas PDE4D7. La determinación de la presencia o cantidad de productos de expresión de PDE4D7, por ejemplo transcrito o transcritos de PDE4D7 o proteína o proteínas PDE4D7 puede conseguirse 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 transcrito o transcritos de PDE4D7 y/o de proteína o proteínas de PDE4D7, se consigue mediante la medición de niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7. Por lo tanto, el nivel o niveles de expresión de PDE4D7 pueden determinarse mediante un método que implica la detección de un ARNm codificado por el gen de PDE4D7, la detección de la proteína PDE4D7 codificada por el transcrito de PDE4D7 y/o la detección de actividad biológica de la proteína PDE4D7.

Por ejemplo, la medición del nivel de ácido nucleico de expresión de PDE4D7 puede evaluarse mediante la separación de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo ARN o ADNc) obtenidas de la muestra en geles de agarosa o poliacrilamida, seguido de hibridación con sondas oligonucleotídicas específicas de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. Como alternativa, el nivel de expresión puede determinarse mediante el marcaje de ácido nucleico obtenido de la muestra seguido de separación en un gel de secuenciación. Las muestras de ácido nucleico pueden colocarse en el gel de modo que el ácido nucleico del paciente y de control o convencional estén en carriles adyacentes. Puede realizarse comparación de niveles de expresión de forma visual o por medio de un densitómetro. Los expertos en la materia conocen métodos para detección de ARNm o productos de expresión. Normalmente, puede usarse análisis de transferencia de Northern para dicho fin.

Como alternativa, el nivel de ácido nucleico de expresión de PDE4D7 puede detectarse en un enfoque de matriz o micromatriz de ADN. Normalmente, los ácidos nucleicos de muestra procedentes de sujetos para ensayar se procesan y se marcan, preferentemente con un marcador fluorescente. Posteriormente, dichas moléculas de ácido nucleico pueden usarse en un enfoque de hibridación con sondas de captura inmovilizadas correspondientes al gen de marcador PDE4D7 de la presente invención o genes biomarcadores o marcadores de cáncer conocidos. Los expertos en la materia conocen medios adecuados para llevar a cabo análisis de micromatrices.

En una preparación convencional una matriz o 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, puede usarse 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. Normalmente, los ADNc, productos de PCR y oligonucleótidos son útiles como sondas. Preferentemente, puede usarse como una sonda una sonda que implique las partes específicas de variante de corte y empalme 7 de PDE4D. Además de la determinación de la expresión de PDE4D7 también puede conseguirse la determinación de la expresión de los genes, por ejemplo genes biomarcadores o marcadores de cáncer adicionales.

Un método de detección basado en matrices o micromatrices de ADN comprende normalmente las siguientes etapas: (1) aislar ARNm de una muestra y opcionalmente convertir el ARNm en ADNc, y posteriormente marcar este ARN o ADNc. Se describen métodos para aislar ARN, convertirlo a ADNc y para marcar ácidos nucleicos en manuales para tecnología de micromatrices. (2) Hibridar los ácidos nucleicos de la etapa 1 con sondas para los genes marcadores. Los ácidos nucleicos de una muestra pueden marcarse con un colorante, tal como los colorantes fluorescentes Cy3 (rojo) o Cy5 (azul). En general una muestra de control está marcada 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 particularmente 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 de la intensidad de señal. Estas pueden medirse y analizarse mediante software apropiado tal como, pero sin limitación, el software proporcionado, por ejemplo, por Affymetrix.

No existe limitación acerca del número de sondas correspondientes a los genes marcadores usados, que se aplican puntualmente 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. Se diseñan sondas para cada gen marcador seleccionado. Dicha sonda es normalmente un oligonucleótido que comprende 5-50 restos de nucleótidos. Pueden sintetizarse ADN más largos mediante PCR o de forma química. Se conocen bien en el campo de las micromatrices métodos para sintetizar dichos oligonucleótidos y aplicarlos a un sustrato. También pueden aplicarse puntualmente en la matriz de ADN genes distintos de los genes marcadores. Por ejemplo, puede aplicarse puntualmente en la matriz de ADN una sonda para un gen cuyo nivel de expresión no está alterado significativamente para normalizar los resultados de ensayo o para comparar resultados de ensayo de múltiples matrices o diferentes ensayos.

Como alternativa, el nivel de ácido nucleico de expresión de PDE4D7 puede detectarse en un enfoque de RT-PCR cuantitativo, preferentemente en un enfoque de PCR en tiempo real después de la transcripción inversa del transcrito de ARNm de PDE4D7. Normalmente, como una primera etapa, un transcrito se transcribe de forma inversa a una molécula de ADNc según cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. Puede llevarse a cabo posteriormente un enfoque de PCR cuantitativa o en tiempo real basándose en una primera cadena de ADN obtenida como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente pueden usarse sondas Taqman o Molecular Beacon como sondas basadas en TERF principales de este tipo para detección por PCR cuantitativa. En ambos casos, las sondas, preferentemente sondas de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento, actúan como sondas internas que se usan junto con

un par de cebadores opuestos que flanquean la región diana de interés, preferentemente, un conjunto de oligonucleótidos de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. Tras la amplificación de un segmento diana, la sonda puede unirse selectivamente con los productos en una secuencia de identificación entre los sitios de cebadores, provocando de este modo aumentos en la señalización de TERF en relación con aumentos en la frecuencia diana.

Preferentemente, una sonda Taqman para usar para un enfoque de PCR cuantitativa según la presente invención puede comprender un oligonucleótido de PDE4D7 como se ha definido anteriormente de aproximadamente 22 a 30 bases que está marcado en ambos extremos con un par de TERF. Normalmente, el extremo 5' tendrá un fluoróforo de longitud de onda más corta tal como fluoresceína (por ejemplo FAM) y el extremo 3' está marcado habitualmente con un interruptor fluorescente de longitud de onda más larga (por ejemplo TAMRA) o un compuesto interruptor no fluorescente (por ejemplo interruptor Black Hole). Se prefiere que las sondas se usen para PCR cuantitativa, en particular las sondas de PDE4D7 como se han definido anteriormente en el presente documento, no tienen guanina (G) en el extremo 5' adyacente al colorante indicador para evitar la inactivación de la fluorescencia indicadora después de degradarse la sonda.

Una sonda de Molecular Beacon para usar para un enfoque de PCR cuantitativa según la presente invención utiliza preferentemente interacciones de TERF para detectar y cuantificar un producto de PCR, teniendo cada sonda un extremo marcado con fluorescencia 5' y un extremo marcado con interruptor 3'. Esta configuración en horquilla o de tallo-bloque de la estructura de sonda comprende preferentemente un tallo con dos extremos de auto-unión cortos y un bucle con una región específica de diana interna de aproximadamente 20 a 30 bases.

Se dirigen mecanismos de detección alternativos que también pueden emplearse en el contexto de la presente invención a una sonda fabricada solamente con una estructura de bucle y sin una región de tallo complementaria corta. También puede usarse un enfoque basado en TERF alternativo para PCR alternativa en el contexto de la presente invención que se basa en el uso de dos sondas de hibridación que se unen con sitios adyacentes en la diana en donde la primera sonda tiene un marcador donante fluorescente en el extremo 3' y la segunda sonda tiene un marcador aceptor fluorescente en su extremo 5'.

La medición de niveles proteicos de la proteína PDE4D7 o de cualquier fragmento, homólogo o derivado procedente de la misma puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica de detección adecuada conocida en este campo. Preferentemente, el nivel proteico de PDE4D7 y derivados del mismo puede determinarse de forma inmunológica, por ejemplo usando un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7, preferentemente un anticuerpo como se ha definido anteriormente en el presente documento. Como alternativa, pueden usarse variantes de anticuerpo o fragmentos como se han definido anteriormente en el presente documento. La presente invención también prevé el uso de ligandos de afinidad peptídicos como aptámeros específicos para la proteína PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Puede conseguirse determinación de los niveles proteicos de la proteína PDE4D7, por ejemplo, mediante la separación de proteínas de una muestra en un gel de poliacrilamida, seguido de identificación de la proteína PDE4D7 usando anticuerpos de unión específica en un análisis de transferencia de Western. Como alternativa, las proteínas pueden separarse mediante sistemas de electroforesis en gel bidimensional. La electroforesis en gel bidimensional es bien conocida en la técnica y normalmente implica isoelectroenfoque a lo largo de una primera dimensión seguido de electroforesis de SDS-PAGE a lo largo de una segunda dimensión. El análisis de geles de SDS-PAGE bidimensionales puede realizarse determinando la intensidad de puntos proteicos en el gel, o puede realizarse usando detección inmunitaria. En otras realizaciones, las muestras proteicas se analizan mediante espectroscopia de masas.

Dentro del contexto de la presente invención los anticuerpos específicos de PDE4D7 pueden colocarse en un soporte e inmovilizarse. Las proteínas procedentes de muestras o tejidos para analizar pueden posteriormente mezclarse con los anticuerpos. Después puede llevarse a cabo una reacción de detección, por ejemplo con un segundo ligando de afinidad como se ha definido anteriormente en el presente documento, preferentemente, con un anticuerpo específico.

Los ensayos inmunológicos que pueden usarse 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 usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayo como RIA (inmunoensayo radioligado), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, por ejemplo aglutinación de látex, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por ejemplo FIA (inmunoensayo ligado a fluorescencia), inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) e inmunoensayos de proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y bien conocidos por los expertos en la materia.

Asimismo, la afinidad de unión de un anticuerpo con un antígeno y la tasa de disociación de una interacción de 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 de un anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las velocidades de disociación de unión pueden determinarse a partir de los datos por cualquier enfoque de análisis adecuado, por ejemplo mediante un análisis de diagrama de scatchard. La competición con un segundo anticuerpo 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.

Además, pueden usarse aptámeros específicos para la proteína PDE4D7, preferentemente como se ha definido anteriormente en el presente documento, en un método para detectar proteínas PDE4D7. Dichos aptámeros pueden marcarse preferentemente para permitir la detección de una interacción proteína-ligando.

La determinación de la actividad biológica de PDE4D7 puede llevarse a cabo empleando ensayos moleculares o enzimáticos específicos para la función o funciones correspondientes de PDE4D7. Preferentemente, puede usarse un sistema de lectura basado en la conversión de AMPc mediante fosfodiesterasa. El experto en la materia conocería técnicas adecuadas. En una realización preferida adicional, puede llevarse a cabo un ensayo para la determinación de la actividad biológica de PDE4D7 en combinación con la inhibición de la actividad de otras variantes de corte y empalme de PDE4D, otras isoformas de PDE4 y/u otras PDE, preferentemente otras PDE capaces de realizar la conversión de AMPc. Dicha inhibición de la actividad puede llevarse a cabo por cualquier medio adecuado conocido por el experto en la materia, preferentemente mediante el uso de nucleótidos antisentido, moléculas de ARNip o moléculas de miARN adecuados, más preferentemente mediante nucleótidos antisentido, ARNip específicos o moléculas de miARN que hibridan específicamente.

En una realización preferida adicional la actividad biológica de PDE4D7 puede ensayarse con la ayuda de inhibidores de PDE4D7 específicos. El uso de dichos inhibidores puede combinarse, por ejemplo, con un sistema de lectura basado en la conversión del sustrato de AMPc. Los inhibidores de PDE4D7 típicos para usar comprenden moléculas antisentido, moléculas de ARNip o moléculas de miARN.

El nivel de PDE4D7 también puede detectarse en métodos que implican procedimientos histológicos o biológicos celulares. Normalmente, pueden usarse técnicas visuales, tales como microscopia óptica o inmunofluorescencia o microscopia UV, así como citometría de flujo o luminometría. La presencia de proteína PDE4D7 en una célula puede, por ejemplo, detectarse o determinarse retirando células para ensayar de muestras definidas anteriormente en el presente documento. También pueden usarse para estos métodos secciones tisulares o muestras de biopsia. Posteriormente, pueden aplicarse ligandos de afinidad para PDE4D7, preferentemente anticuerpos o aptámeros. Normalmente, dichos ligandos de afinidad se marcan, preferentemente con marcadores fluorescentes como se ha definido anteriormente en el presente documento. 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.

Dichos procedimientos implican el uso de métodos de visualización. Los expertos en la materia conocen métodos de visualización adecuados. Los métodos típicos para usar comprenden técnicas fluorométricas, luminométricas y/o enzimáticas. La fluorescencia se detecta y/o cuantifica normalmente exponiendo marcadores fluorescentes a luz de una longitud de onda específica y detectando y/o cuantificando posteriormente la luz emitida de una longitud de onda específica. La presencia de un ligando de afinidad marcado con luminiscencia puede detectarse y/o cuantificarse mediante luminiscencia desarrollada durante una reacción química. La detección de una reacción enzimática se debe a un desplazamiento del color en la muestra que surge de la reacción química.

En una realización preferida, adicional, el nivel de PDE4D7 puede determinarse mediante técnicas de captura de imágenes moleculares adecuadas, por ejemplo captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) o captura de imágenes fotónica magnética (IFM) y/o mediante el uso de agentes de contraste adecuados, por ejemplo agentes de contraste como se han definido anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida, adicional, un método para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas de la presente invención comprende la etapa adicional de comparar los niveles de ácido nucleico o proteína medidos o la actividad biológica medida con un nivel de control. La expresión "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 normal o control canceroso, como se ha definido anteriormente en el presente documento. El estado, la naturaleza, la cantidad y la condición del nivel de control pueden ajustarse según las necesidades. Preferentemente puede usarse un nivel de control sano o benigno. El término "comparar" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier método adecuado para valorar, calcular, evaluar o procesar los datos.

En otra realización más como una etapa adicional más, una decisión acerca de la presencia o el estadio del cáncer o la progresión del cáncer puede basarse en los resultados de la etapa de comparación. Un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede diagnosticarse o pronosticarse o una progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede diagnosticarse o pronosticarse en dicho método según las definiciones

correspondientes proporcionadas anteriormente en el presente documento en el contexto de PDE4D7 como marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En otra realización la presente invención se refiere a un método para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- (a) ensayar en al menos una muestra obtenida de al menos un individuo que se sospecha que padece cáncer maligno de próstata sensible a hormonas para determinar la expresión del producto de expresión de PDE4D7 o la proteína PDE4D7;
- (b) ensayar en al menos una muestra de control obtenida de al menos un individuo que no padece cáncer maligno de próstata sensible a hormonas para determinar la expresión de producto de expresión de PDE4D7 o la proteína PDE4D7;
- (c) determinar la diferencia en la expresión de las etapas (a) y (b); y
- (d) decidir acerca de la presencia o el estadio de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c).

En una realización, las etapas 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.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho método diferencia entre un cáncer benigno y uno maligno de próstata sensible 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 la expresión del gen de referencia, y
- (d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima de valor de punto de corte es indicativo de un tumor maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre -2 y +2, preferentemente aproximadamente 0.

El nivel de PDE4D7 puede determinarse según el nivel de ácido nucleico, proteína o actividad como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se prefiere la determinación de la cantidad del transcrito o transcritos y/o proteína de PDE4D7. Además puede determinarse el nivel de un gen constitutivo en la muestra.

La expresión "gen de referencia" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier gen adecuado, por ejemplo, a cualquier gen, producto génico, producto de expresión, proteína o variante proteica expresado de forma estable y detectable de forma continua en el organismo elegido. La expresión también incluye productos génicos tales como proteínas, péptidos, polipéptidos expresados, así como variantes modificadas de los mismos. La invención también incluye por lo tanto proteínas de referencia procedentes de un gen de referencia. También están abarcados todo tipo de transcritos que pueden proceder del gen de referencia así como modificaciones del mismo o parámetros secundarios ligados al mismo. Como alternativa o adicionalmente, pueden usarse también otros parámetros de referencia para fines de referencia, por ejemplo concentraciones metabólicas, tamaños celulares, etc.

La expresión puede llevarse a cabo preferentemente en una misma muestra, es decir el nivel de PDE4D7 y del gen de referencia se determina en la misma muestra. Si el ensayo se lleva a cabo en la misma muestra, puede realizarse un enfoque de una única detección o de detección múltiple como se describe en el presente documento. Preferentemente, para una detección múltiple pueden usarse los oligonucleótidos y sondas que tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 10, 11 y 12. Para la realización de la detección múltiple puede modificarse la concentración de cebadores y/u oligonucleótidos sonda. Asimismo, la concentración y presencia de ingredientes adicionales como tampones, iones, etc. pueden modificarse, por ejemplo aumentarse o reducirse en comparación con indicaciones de los fabricantes.

En una realización específica de la presente invención, puede determinarse la expresión de más de un gen de referencia o gen expresado de forma estable. Por ejemplo puede determinarse la expresión de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30 o más genes de referencia. Los resultados de dichas mediciones pueden calcularse por separado, o pueden combinarse para obtener un índice de expresión promedio. Asimismo, el patrón de expresión del gen de referencia puede determinarse y/o usarse como la base de etapas posteriores. Dicho patrón puede basarse en comportamientos de expresión conocidos de genes en determinados estadios o estados de cáncer, en particular cáncer de próstata.

Además, los resultados de expresión pueden compararse con resultados ya conocidos de casos o bases de datos de referencia. La comparación puede incluir adicionalmente 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, puede determinarse la expresión de un marcador de cáncer adicional o gen no expresado de forma estable. Por ejemplo, puede determinarse la expresión de un gen, que se sabe que se reduce durante cáncer de próstata resistente a hormonas, o que se sabe que aumenta durante cáncer de próstata sensible a hormonas.

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

Los resultados de expresión puede normalizarse según cualquier método adecuado conocido por el experto en la materia, por ejemplo según métodos estadísticos de normalización como la puntuación convencional, ensayo de T de Student, ensayo residual estudentizado, ensayo de momento normalizado o ensayo de variación de coeficientes. Normalmente, dichos ensayos o fórmulas correspondientes, que serían conocidos por los expertos en la materia, se usarían para normalizar los datos de expresión para permitir la diferenciación entre variaciones reales en los niveles de expresión génica y variaciones debidas a los procesos de medición.

Basándose en los resultados de expresión obtenidos en las etapas (a) y (b) y/o los resultados normalizados obtenidos en la etapa (c) puede llevarse a cabo una comparación con un valor de punto de corte para expresión de PDE4D7. El valor de punto de corte por encima del cual el nivel de expresión de PDE4D7 es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, incluyendo por lo tanto formas tumorales benignas de próstata o situaciones sanas o formas de tejido sano, está entre aproximadamente $-3 y + 3$, $-3 y + 2,75$, $-3 y + 2,5$, $-3 y + 2,25$, $-3 y + 2$, $-3 y + 1,75$, $-3 y + 1,5$, $-3 y + 1,25$, $-3 y + 1$, $-3 y + 0,75$, $-3 y + 0,5$, $-3 y + 0,25$, $-3 y 0$, $-2,75 y + 3$, $-2,5 y + 3$, $-2,25 y + 3$, $-2 y + 3$, $-1,75 y + 3$, $-1,5 y + 3$, $-1,25 y + 3$, $-1 y + 3$, $-0,75 y + 3$, $-0,5 y + 3$, $-0,25 y + 3$, o $0 y + 3$. Se prefiere más un valor de punto de corte de aproximadamente 0, por ejemplo, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 o -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2 o -0,1. En una realización particularmente preferida, dicho punto de corte va a usarse con una fosfodiesterasa diferente como gen de referencia. Aún más preferentemente, dicho punto de corte va a usarse con un gen de PDE4D5 como un gen de referencia.

En una realización preferida de la presente invención el valor del punto de corte es un valor de punto de corte para PDE4D7 en muestras de sangre, por ejemplo muestras de suero o plasma, muestras de orina o muestras de sedimentos de orina. En una realización particularmente preferida de la presente invención el valor de punto de corte es un valor de punto de corte para la proteína o polipéptido de PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento en una muestra de orina. En otra realización particularmente preferida de la presente invención el valor de punto de corte es un valor de punto de corte para la proteína o el polipéptido de PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento 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 punto de corte es un valor de punto de corte para la proteína o el polipéptido de PDE4D7 o cualquier derivado del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento en una muestra de sedimentos de orina y células contenidas en una muestra de sedimentos de orina, o exosomas secretados de células contenidas en una muestra de sedimento de orina.

Si la expresión de PDE4D7 medida y/o normalizada está por debajo del valor de punto de corte indicado esto puede verse como un indicio de que el individuo está sano con respecto a tumores de próstata o padece solamente tumores benignos de próstata, pero no cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método de adquisición de datos para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- (a) ensayar en un individuo para determinar la expresión de PDE4D7; y
- (b) comparar la expresión como se ha determinado en la etapa (a) con un nivel de control.

El ensayo para determinar la expresión de PDE4D7 puede llevarse a cabo según etapas definidas anteriormente en el presente documento. Preferentemente el ensayo puede llevarse a cabo como medición de niveles de ácido nucleico o proteína de PDE4D7 o determinando la actividad biológica de PDE4D7, más preferentemente según las opciones anteriormente descritas en el presente documento para dichas mediciones. El ensayo puede llevarse a cabo en un individuo, es decir *in vivo*, o fuera del individuo, es decir *ex vivo* o *in vitro*. La expresión "nivel de control" como se usa en el contexto del método de adquisición de datos se refiere a la expresión del marcador de PDE4D7 u otros marcadores adecuados en un control normal o un control canceroso, como se ha definido anteriormente en el presente documento. El estado, la naturaleza, la cantidad y la condición del nivel de control pueden ajustarse según las necesidades. Preferentemente puede usarse un nivel de control sano, normal. Puede llevarse a cabo una comparación de la expresión con un nivel de control según cualquier método adecuado de valoración, cálculo, evaluación o procesamiento de datos y se dirige particularmente a la detección de diferencias entre dos conjuntos de datos. Puede llevarse a cabo adicionalmente una evaluación estadística de la significación de la diferencia. El experto en la materia conoce métodos estadísticos adecuados. Los datos y la información obtenidos pueden

almacenarse, acumularse o procesarse mediante métodos informáticos o por ordenador adecuados o de herramientas conocidas por los expertos en la materia y/o presentarse de una manera apropiada para permitir que el practicante use los datos para una o más etapas de deducción o conclusión posteriores.

5 En otro aspecto la presente invención se refiere a un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- 10 (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7,
(b) ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7,
(c) determinar la diferencia de la expresión de PDE4D7 de las etapas (a) y (b); y
(d) decidir acerca de la presencia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c).

15 El inmunoensayo se basa preferentemente en el uso de un anticuerpo que se une específicamente con PDE4D7, por ejemplo uno o más de los anticuerpos de PDE4D7 mencionados en el presente documento. Como alternativa, 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 ensayo enzimático como se describen en el presente documento.

20 En un aspecto adicional la presente invención se refiere a un inmunoensayo para diferenciar entre un tumor benigno de próstata y un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende las etapas de

- 25 (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 punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre aproximadamente -2 y +2. Preferentemente, el valor de punto de corte es aproximadamente 0.

30 El nivel de PDE4D7 puede determinarse preferentemente según el nivel de proteína o actividad como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de proteína PDE4D7 con la ayuda de anticuerpos específicos de PDE4D7, por ejemplo uno o más de los anticuerpos de PDE4D7 mencionados en el presente documento. Como alternativa, 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 la cantidad de ácidos nucleicos, o métodos de ensayo enzimático como se ha descrito en el presente documento.

40 Además puede determinarse el nivel de un gen de referencia como se ha definido anteriormente en el presente documento en una muestra. Para la detección de un gen de referencia puede determinarse la cantidad del producto de expresión del gen (es decir proteína), preferentemente con la ayuda de uno o más anticuerpos adecuados conocidos por el experto en la materia. Como alternativa, 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 ensayo enzimático como se han descrito en el presente documento.

45 Basándose en los resultados de expresión obtenidos en las etapas (a) y (b) y/o los resultados normalizados obtenidos en la etapa (c) puede llevarse a cabo una comparación con un valor de punto de corte para la expresión de PDE4D7. El valor del punto de corte por encima del que el nivel de expresión de PDE4D7 es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, excluyendo de este modo formas tumorales benignas de próstata o situaciones sanas o formas de tejido sano, está entre aproximadamente -3 y +3, -3 y +2,75, -3 y +2,5, -3 y +2,25, -3 y +2, -3 y +1,75, -3 y +1,5, -3 y +1,25, -3 y +1, -3 y +0,75, -3 y +0,5, -3 y +0,25, -3 y 0, -2,75 y +3, -2,5 y +3, -2,25 y +3, -2 y +3, -1,75 y +3, -1,5 y +3, -1,25 y +3, -1 y +3, -0,75 y +3, -0,5 y +3, -0,25 y +3, o 0 y +3. Se prefiere más un valor de punto de corte de aproximadamente 0, por ejemplo, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 o -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2 o -0,1. En una realización particularmente preferida, dicho punto de corte va a usarse con una fosfodiesterasa diferente como gen de referencia. Aún más preferentemente, dicho punto de corte va a usarse con un gen de PDE4D5 como gen de referencia.

60 El valor del punto de corte puede ser un valor de punto 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., como se describe posteriormente en el presente documento.

65 Si la expresión de PDE4D7 medida y/o normalizada está por debajo del valor de punto de corte indicado esto puede verse como un indicio de que el individuo está sano con respecto a tumores de próstata o padece solamente tumores benignos de próstata, pero no cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. El valor puede indicar adicionalmente que el individuo padece un cáncer de próstata resistente a hormonas. Para investigar o excluir la

presencia de enfermedades de cáncer resistente a hormonas, puede ensayarse el nivel de biomarcador adecuado adicional, por ejemplo el nivel de PSA. En el caso de cáncer de próstata resistente a hormonas debe esperarse un nivel de PSA de >20 ng/ml.

- 5 En un aspecto adicional la presente invención se refiere a un método para identificar a un individuo para elegibilidad para terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
 (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o ensayar en una muestra
 10 de control para determinar la expresión de PDE4D7;
 (c) clasificar los niveles de expresión de la etapa (a) en relación con los niveles de la etapa (b); y
 (d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas donde la muestra del individuo se clasifica como poseedora de un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

15 El nivel de PDE4D7 puede determinarse según el nivel de ácido nucleico, proteína o actividad como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de transcrito o transcritos y/o proteína de PDE4D7. Además puede determinarse el nivel de un gen de referencia como se ha descrito anteriormente en el presente documento en una muestra. Pueden llevarse a cabo ensayos para determinar la
 20 expresión de un gen de referencia en la misma muestra usada para la determinación de PDE4D7. Si el ensayo se lleva a cabo en la misma muestra, puede realizarse un enfoque de detección sencilla o detección múltiple. Preferentemente, para una detección múltiple pueden usarse los oligonucleótidos y las sondas que tienen la secuencia de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12. Para la realización de la detección múltiple puede modificarse la concentración de cebadores y/u oligonucleótidos sonda. Además, la concentración y presencia de ingredientes
 25 adicionales como tampones, iones, etc. puede modificarse, por ejemplo aumentarse o reducirse en comparación con las indicaciones del fabricante. Como alternativa, el ensayo para determinar la expresión de un gen de referencia puede llevarse a cabo en una muestra diferente, preferentemente en una muestra de control como se ha definido anteriormente en el presente documento. Preferentemente, dicha muestra de control puede ser una muestra de control del mismo individuo que la muestra de ensayo, o una muestra de control procedente de una fuente o un
 30 individuo diferente. La muestra de control puede ser una muestra procedente del mismo tejido, preferentemente tejido de próstata, o puede proceder de un tipo tisular diferente. Son ejemplos de tipos tisulares alternativos preferidos tejido de próstata del estroma, tejido epitelial de la vejiga y tejido epitelial de la uretra. Asimismo, el ensayo de la muestra de ensayo para determinar la expresión de un gen de referencia y el ensayo de muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7 pueden combinarse.

35 En una realización adicional la muestra de control también puede ensayarse para determinar la expresión del gen de referencia. En caso de que se ensaye más de una muestra para determinar la expresión de un gen de referencia, los resultados de expresión obtenidos pueden compararse y/o promediarse o normalizarse según cualquier método estadístico adecuado conocido por los expertos en la materia.

40 La expresión "clasificar los niveles de expresión de la etapa (a) en relación con los niveles de la etapa (b)" como se usa en el presente documento significa que la expresión en una muestra de ensayo 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. Según el resultado de la comparación se indica que la muestra de ensayo proporciona
 45 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. La expresión significa además que la expresión en una muestra de ensayo para PDE4D7 y la expresión en la misma muestra de ensayo para un gen de referencia se comparan, por ejemplo después de la normalización frente a un gen adicional como referencia de normalización. Según el resultado de la comparación se indica que la muestra de ensayo proporciona una expresión similar al gen
 50 de referencia, una expresión aumentada en comparación con el gen de referencia o una expresión reducida en comparación con el gen de referencia.

Según la clasificación de los resultados de expresión puede considerarse que un individuo es elegible para una
 55 terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas cuando los niveles de expresión de PDE4D7 están aumentados. El nivel de expresión se considera "aumentado" cuando la expresión del gen de PDE4D7 en la muestra de ensayo está elevada, 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, 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 de PDE4D7 está elevada en,
 60 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 elevada 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 constitutivos.

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

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
- (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7;
- (c) determinar la diferencia de la expresión de PDE4D7 de la etapa (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b); y
- (d) estratificar a un individuo o una cohorte de individuos para una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

El ensayo de la expresión de PDE4D7 puede llevarse a cabo preferentemente mediante la determinación de la cantidad de la proteína PDE4D7 o la determinación del nivel de actividad de PDE4D7 como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de proteína PDE4D7 con la ayuda de anticuerpos específicos de PDE4D7, por ejemplo uno o más de los anticuerpos de PDE4D7 mencionados en el presente documento. Como alternativa, 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 ensayo enzimático como se describen en el presente documento. Además puede determinarse el nivel de un gen de referencia como se ha descrito anteriormente en el presente documento en una muestra. Puede llevarse a cabo ensayo para determinar la expresión de un gen de referencia en la misma muestra usada para la determinación de PDE4D7. Si el ensayo se llevó a cabo en la misma muestra, puede realizarse una única detección o un enfoque de detección múltiple o en paralelo. Preferentemente, para una detección en paralelo o múltiple pueden usarse anticuerpos primarios o secundarios marcados de forma diferente.

Como alternativa, el ensayo para determinar la expresión de un gen de referencia puede llevarse a cabo en una muestra diferente, preferentemente en una muestra de control como se ha definido anteriormente en el presente documento. Preferentemente, dicha muestra de control puede ser una muestra de control del mismo individuo que la muestra de ensayo, o una muestra de control procedente de una fuente o un individuo diferente. La muestra de control puede ser además una muestra procedente del mismo tejido, preferentemente tejido prostático, o procedente de un tipo tisular diferente. Son ejemplos de tipos tisulares alternativos preferidos tejido de próstata del estroma, tejido epitelial de la vejiga y tejido epitelial de la uretra. Asimismo, el ensayo de la muestra de ensayo para determinar la expresión de un gen de referencia y el ensayo de la muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7 pueden combinarse.

En una realización adicional la muestra de control también puede ensayarse para determinar la expresión del gen de referencia. En caso de que se ensayara más de una muestra para determinar la expresión de un gen de referencia, los resultados de expresión obtenidos pueden compararse y/o promediarse o normalizarse según cualquier método estadístico adecuado conocido por los expertos en la materia.

La expresión "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 en el presente documento significa que la expresión en una muestra de ensayo para PDE4D7 y la expresión en una muestra de control para PDE4D7 se comparan, por ejemplo después de normalización frente a referencias de normalización adecuadas. Según el resultado de la comparación se indica que la muestra de ensayo 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. La expresión significa además que como alternativa o adicionalmente la expresión en una muestra de ensayo para PDE4D7 y la expresión en la misma muestra de ensayo para un gen de referencia se comparan, por ejemplo después de la normalización frente a un gen adicional como referencia de normalización. Según el resultado de la comparación se indica que la muestra de ensayo 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.

La expresión "estratificar a un individuo o una cohorte de individuos para terapia de cáncer de próstata" como se usa en el presente 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, preferentemente una terapia contra cáncer de próstata resistente a hormonas de acuerdo con el resultado del ensayo de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento, 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. Según 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 terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas cuando los niveles de expresión de PDE4D7 están aumentados. El nivel de expresión se considera "aumentado" cuando la expresión del gen de PDE4D7 en la muestra de ensayo está elevada en, por ejemplo 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, 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 de PDE4D7 está elevada en, 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 elevada 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 con respecto a la expresión de genes o marcadores adicionales, por ejemplo genes constitutivos.

Un individuo que se considera elegible para una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o que está estratificado para una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas como se ha descrito anteriormente en el presente documento puede recibir cualquier tratamiento terapéutico adecuado para esta forma de cáncer de próstata conocida por los expertos en la materia. En particular, la expresión "terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier terapia de cáncer de próstata adecuada conocida por los expertos en la materia y preferentemente incluye castración quirúrgica por la retirada de los testículos como el principal órgano de producción de hormonas sexuales masculinas, castración química mediante, por ejemplo, supresión de la generación de andrógenos o mediante la inhibición de la actividad receptora de andrógenos, citotóxica, quimioterapia, radioterapia (Terapia de Radiación de Haz Externo, Braquiterapia), crioterapia, terapias focales como ablación por HIFU (Ablación por Ultrasonidos de Alta Frecuencia), o ablación térmica.

Normalmente, se puede juzgar que un individuo considerado elegible para terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas debido a expresión de PDE4D7 aumentada padece un cáncer de próstata sensible a hormonas o es propenso a desarrollar un cáncer de próstata sensible a hormonas en el futuro, por ejemplo en los siguientes 1 a 24 meses. Un individuo identificado o estratificado de forma correspondiente puede tratarse con una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención, por ejemplo, como se define posteriormente en el presente documento. En una realización adicional un individuo identificado de forma correspondiente puede tratarse con una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención en combinación con una terapia de cáncer adicional. La expresión "terapia de cáncer adicional" se refiere a cualquier tipo de terapia de cáncer conocida por los expertos en la materia. Se prefieren formas de terapia de cáncer conocidas para cáncer de próstata resistente a hormonas. La expresión incluye, por ejemplo, todas las formas adecuadas de quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapias de anticuerpos, etc.

Como alternativa, un individuo identificado o estratificado de forma correspondiente también puede tratarse solamente con una o más terapias de cáncer tales como una quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapias de anticuerpos, etc. Se prefieren terapias de cáncer normalmente usadas para cáncer de próstata, más preferentemente terapias de cáncer usadas para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En una realización adicional de la presente invención el método de clasificación para elegibilidad o el inmunoensayo para estratificación como se ha descrito anteriormente en el presente documento también puede usarse para supervisar el tratamiento de un individuo, por ejemplo un individuo que se ha clasificado como aquejado de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas. El proceso de supervisión puede llevarse a cabo como determinación de la expresión durante un periodo de tiempo prolongado, 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. Las etapas de determinación pueden llevarse 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 puede ajustarse cualquier esquema de tratamiento como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, por ejemplo incrementarse o atenuarse, o alterarse de cualquier manera adecuada en correspondencia con los resultados del proceso de supervisión.

El ensayo para la expresión de PDE4D7 puede llevarse a cabo según etapas como se han definido anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el ensayo puede llevarse a cabo como medición de los niveles de proteínas de PDE4D7, más preferentemente según las opciones anteriormente descritas en el presente documento para dichas mediciones. Como controles o muestras de control pueden usarse controles como se ha definido anteriormente en el presente documento. En una realización particularmente preferida las etapas de ensayo pueden basarse en el uso de un anticuerpo que se une específicamente con PDE4D7, por ejemplo un anticuerpo anti-PDE4D7 disponible en el mercado como NB300-652 o GTX14629. Un cáncer puede diagnosticarse o pronosticarse o puede diagnosticarse o pronosticarse una progresión de cáncer en dicho inmunoensayo o un individuo puede identificarse para elegibilidad para cáncer de próstata o un individuo o una cohorte de individuos puede estratificarse en un inmunoensayo según las definiciones correspondientes proporcionadas anteriormente en el presente documento en el contexto del PDE4D7 como marcador de cáncer. En consecuencia, dicho ensayo o dicha determinación de la expresión de PDE4D7 puede realizarse, o puede realizarse adicionalmente, mediante la medición de los niveles de ácido nucleico o proteínas o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7. Pueden llevarse a cabo mediciones similares con respecto al gen de referencia.

En una realización particularmente preferida de la presente invención el gen de referencia es un gen constitutivo o una fosfodiesterasa diferente. En organismos humanos, los ejemplos de "genes constitutivos" incluyen entre otros β -

actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), porfobilinógeno desanimasa (PBGD) y proteína ribosómica P1. Aparte de estos genes puede usarse cualquier otro gen adecuado como un gen constitutivo, siempre que el gen muestre una expresión o transcripción en un nivel estable, no modificado, en particular durante estadios diferentes del desarrollo de cáncer, más preferentemente durante estadios diferentes del desarrollo de cáncer de próstata, más preferentemente durante la transición de estados de cáncer de próstata sensible a hormonas a cáncer de próstata resistente a hormonas. Se prefiere particularmente el gen o transcrito o producto de expresión o proteína de GAPDH. Se prefiere en particular adicionalmente el gen o transcrito o producto de expresión o proteína de PBGD. Pueden obtenerse datos de expresión de un gen constitutivo 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, 5.000, 10.000 o más. También pueden obtenerse datos de expresión de bases de datos o de colecciones de datos disponibles para los expertos en la materia.

La expresión "fosfodiesterasa diferente" como se usa en el presente documento se refiere a otras fosfodiesterasas que no son PDE4D7. Dichas fosfodiesterasas, que van a ser adecuadas como genes de referencia, deberían expresarse de forma estable y proporcionar un producto génico detectable de forma continua, producto de expresión, proteína o variante proteica en el organismo elegido. Se prefieren particularmente fosfodiesterasas de la familia PDE4D, por ejemplo PDE4D1, PDE4D2, PDE4D3, PDE4D4, PDE4D5, PDE4D6, PDE4D8 y PDE4D9. Se prefiere más la fosfodiesterasa PDE4D5. En consecuencia la normalización y/o comparación con GAPDH, PBGD y en particular PDE45 pueden usarse preferentemente para los métodos de diagnóstico e inmunoensayos basados en punto de corte descritos anteriormente, los métodos de identificación o los inmunoensayos para diferenciar o estratificar individuos. Pueden llevarse a cabo etapas de determinación correspondientes en reacciones separadas o, de forma particularmente preferida, en reacciones múltiples. Para la realización de la detección múltiple puede modificarse la concentración de cebadores y/u oligonucleótidos sonda. Asimismo, la concentración y presencia de ingredientes adicionales como tampones, iones, etc. pueden modificarse, por ejemplo aumentarse o reducirse en comparación con indicaciones de los fabricantes.

En una realización adicional de la presente invención el método de identificación de un individuo para elegibilidad para terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basado en la expresión de PDE4D7 como se ha descrito anteriormente en el presente documento puede combinarse adicionalmente con uno o más métodos de identificación similares, basándose en la expresión de uno o más biomarcadores diferentes. Se prefiere la determinación del nivel de antígeno específico de próstata (PSA) en sangre. Por lo tanto, si se descubre que el nivel de PSA en sangre está en un intervalo de aproximadamente 2 a 5 o más ng/ml, preferentemente de aproximadamente 2,2 a 4,8 ng/ml o más, de 2,4 a 4,4 ng/ml o más, de 2,6 a 4,2 ng/ml o más, o de 2,8 a 4,0 ng/ml o más, más preferentemente de aproximadamente 2,5 a 4 ng/ml o más, puede considerarse que un individuo padece cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o sea probable que desarrolle cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en el futuro cercano, es decir en los siguientes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 14, 48 meses. El ensayo para determinar la expresión de PDE4D7 puede llevarse a cabo según las etapas definidas anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el ensayo puede llevarse a cabo como medición de niveles proteicos de PDE4D7, más preferentemente según las opciones descritas anteriormente en el presente documento para dichas mediciones. Como controles o muestras de control pueden usarse controles como se ha definido anteriormente en el presente documento. En una realización particularmente preferida las etapas de ensayo pueden basarse en el uso de un anticuerpo que se une específicamente con PDE4D7, por ejemplo un anticuerpo como se ha definido anteriormente en el presente documento o un anticuerpo anti-PDE4D7 disponible en el mercado como NB300-652 o GTX14629. Un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas puede diagnosticarse o pronosticarse o puede diagnosticarse o pronosticarse una progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en dicho inmunoensayo según las definiciones correspondientes proporcionadas anteriormente en el presente documento en el contexto de la PDE4D7 como marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En una realización preferida de la presente invención el diagnóstico, la detección, la supervisión o el pronóstico como se ha mencionado anteriormente va a llevarse a cabo en una muestra obtenida de un individuo. La expresión "muestra obtenida de un individuo" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier material biológico obtenido mediante métodos adecuados conocidos por los expertos en la materia de un individuo. La muestra usada en el contexto de la presente invención debería recogerse preferentemente de una manera clínicamente aceptable, más preferentemente de manera que se conserven los ácidos nucleicos (en particular ARN) o las proteínas.

Las muestras biológicas pueden incluir tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, sudor, esputo o saliva, semen y orina, así como heces o muestras de excrementos. Además, la muestra biológica puede contener un estrato celular procedente de o una población celular que incluye una célula epitelial, preferentemente una célula epitelial cancerosa o una célula epitelial procedente de tejido que se sospecha que es canceroso. Aún más preferentemente la muestra biológica puede contener una población celular procedente de un tejido glandular, por ejemplo la muestra puede proceder de la próstata de un individuo varón. Adicionalmente, las células pueden purificarse de tejidos y fluidos corporales si es necesario, y después usarse como la muestra biológica.

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

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 determinados tipos celulares, por ejemplo células de próstata, funcionalizados por ejemplo con partículas magnéticas. El material concentrado por las partículas magnéticas puede usarse posteriormente para etapas de detección y análisis como se han descrito anteriormente o se describen posteriormente en el presente documento.

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

Asimismo, las células, por ejemplo células tumorales, pueden enriquecerse mediante procesos de filtración de muestras de fluidos o líquidos, por ejemplo, sangre, orina, sudor, etc. Dichos procesos de filtración también pueden combinarse con etapas de enriquecimiento basadas en interacciones específicas de ligando como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

En una realización particularmente preferida de la presente invención una muestra puede ser una muestra tisular, una muestra de biopsia, 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 en circulación o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata. Una muestra de sangre puede ser, por ejemplo, una muestra de suero o una muestra de plasma.

En otro aspecto más la presente invención se refiere a una composición farmacéutica inhibidora para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en: (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7; (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7; (e) un miARN específico para PDE4D7; (f) una molécula antisentido de PDE4D7; (g) un ARNip específico para PDE4D7; (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7; (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

La expresión "un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que es capaz de reducir la actividad de PDE4D7. Dicho compuesto puede ser cualquier interactor directo de PDE4D7, que tiene influencia negativa sobre la actividad catalítica de PDE4D7. Dicho compuesto puede ser preferentemente un antagonista de la actividad catalítica de PDE4D7.

La expresión "un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que es capaz de reducir la capacidad de PDE4D7 mediante una interacción con un interactor directo de PDE4D7 ("interactor indirecto") o mediante una ruta de trabajo indirecta que no implica una interacción con PDE4D7. Dicho compuesto puede ser cualquier interactor directo de un interactor de PDE4D7. El efecto proporcionado por el interactor directo de un interactor de PDE4D7 puede ser negativo si el interactor tiene por sí mismo un efecto negativo sobre la actividad de PDE4D7, o negativo, si el interactor PDE4D7 tiene un efecto positivo sobre la actividad de PDE4D7.

Se prefieren particularmente inhibidores de fosfodiesterasas, en particular PDE4, más específicamente de PDE4D, o más específicamente de PDE4D7. Son ejemplos de inhibidores de fosfodiesterasa adecuados que pueden incluirse individualmente o en cualquier combinación en una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención: Roflumilast, Piclamilast, Awd12-281, Ariflo, Sch351591, Cilomilast, Rolipram, Ro 20-1724, Etazolat, Clorhidrato, CP80633, ICI63197, maleato de irsogladina, mesopram, YM976, Sch35159, V11294a, Arofilina, Denbufilina e inhibidor de fosfodiesterasa 4. Los expertos en la materia conocen ejemplos adicionales de inhibidores adecuados y estos también están previstos por la presente invención. Los expertos en la materia también conocerían detalles acerca de la estructura, eficacia, formaciones adecuadas, etc. de los inhibidores y/o estos pueden proceder de libros de textos o publicaciones adecuados, por ejemplo Joseph A. Beavo, Sharron H. Francis, Miles D Houslay, Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in Health and Disease, CRC Press 2006.

Se prefieren particularmente en el contexto de composiciones farmacéuticas inhibidoras los siguientes compuestos inhibidores: Rolipram, Ro 20-1724, CP80633, ICI63197, YM976, Sch35159 e inhibidor de fosfodiesterasa 4.

Rolipram es un inhibidor completo selectivo de AMPc fosfodiesterasa (PDE4) con una CI50 de 2,0 μ M). Rolipram diferencia entre dos estados conformacionales de isoenzimas PDE4.

Ro 20-1724, es un inhibidor ampliamente usado de nucleótido cíclico fosfodiesterasa, selectiva para PDE4 con una CI50 de 2,0 μ M.

CP80633 es un inhibidor selectivo de fosfodiesterasa de tipo 4 con valores de CI50 de 1,9, > 100, > 100, > 100 y > 100 µM para PDE4 de pulmón humano, PDE1 de pulmón, PDE2 de pulmón, PDE3 de corazón y PDE-V de plaquetas respectivamente. CP80633 no presenta selectividad de isozimas de PDE4 significativa. CP80633 inhibe la hidrólisis de AMPc en monocitos de sangre periférica humana aislada, eosinófilos y linfocitos T y presenta efectos antiinflamatorios y broncodilatadores *in vivo*.

ICI63197 es un potente inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) 4 con una CI50 de 35 nM (para la inhibición de la unión de [3H]-rolipram a cerebro de rata).

YM976 es un inhibidor de PDE4 activo por vía oral con una CI50 de 2,2 nM). Muestra baja actividad emetogénica, que se sugiere que se debe a escasa penetración cerebral.

El inhibidor de fosfodiesterasa 4 es un compuesto de pirazol que actúa como un inhibidor de la unión al sitio activo de alta afinidad de fosfodiesterasas IVB e IVD con una CI50 de 33 nM y 21 nM, respectivamente. Se ha mostrado que es mucho más potente que Rolipram para PDEIVB y PDEIVD (con CI50 = 570 nM y 1,1 µM, respectivamente), y presenta mayor selectividad con respecto a PDEIB, PDEIIA, PDEIIIB, PDEIVA, PDEVIIB, PDEVIII, PDEIXA y PDEXIA (CI50 > 30 µM) e inhibe mínimamente PDEXA con una CI50 de 6,9 µM.

Los compuestos inhibidores como se han definido anteriormente pueden formularse, dosificarse, usarse o administrarse según los detalles proporcionados en el presente documento. En particular, puede usarse la siguiente Tabla de inhibidores para la determinación de concentraciones, formulaciones, adyuvantes, etc. necesarios:

Tabla de inhibidores

Compuesto	CI 50	Fabricante
Rolipram	1 µM	Calbiochem
Ro 20-1724	2 µM	Calbiochem
CP80633	1,9 µM	Tocris
ICI63197	35 nM	Tocris
YM976	2,2 nM	Tocris
Inhibidor de fosfodiesterasa 4	33 nM	Calbiochem

Como alternativa, dichos integrados indirectos de acción negativa pueden provocar una modificación del comportamiento de unión de proteínas de unión directa, lo que conduce a una reducción de la actividad de PDE4D7. Normalmente los interactores indirectos de acción negativa pueden tener un efecto inhibitor sobre activadores de PDE4D7. Son ejemplos de dichos interactores actividades enzimáticas que degradan activadores de PDE4D7, o proteínas capaces de unirse con e inactivar activadores de PDE4D7. Como alternativa, dichas interacciones pueden modular de forma positiva las actividades que conducen a una degradación de PDE4D7, por ejemplo proteinasas. Los expertos en la materia conocerían ejemplos adicionales y su implementación.

Como alternativa, una inhibición indirecta de la actividad de PDE4D7 puede ser proporcionada por compuestos que desactivan, interfieren con o alteran la expresión del gen o genes endógenos de PDE4D7. Son ejemplos de dichos compuestos interactores específicos de factores de transcripción de PDE4D7 que inhiben y/o evitan la unión de factores de transcripción y la maquinaria de transcripción basal con los promotores del gen de PDE4D7, actividades desestabilizantes específicas del o de los ARNm de PDE4D7 o factores que inhiben los factores de corte y empalme específicos para PDE4D7. Los expertos en la materia conocerían ejemplos adicionales y su implementación.

Un "ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de una proteína de un marcador tumoral" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier ácido nucleico capaz de expresar una forma mutante de una proteína o un polipéptido de origen natural. Por lo tanto la expresión se refiere a un ácido nucleico que codifica una variante o variantes de PDE4D7, que comprende una modificación antimórfica, en particular que afecta de forma adversa a PDE4D7. Normalmente, dicho comportamiento puede producirse si la variante antimórfica puede interactuar con PDE4D7 pero bloquea algún aspecto de su función. Preferentemente, dichas variantes pueden comprender o carecer de dominios específicos de PDE4D7, por ejemplo uno o más dominios de interacción o dimerización de proteína-proteína, dominios de ensamblaje de complejo, uno o más dominios asociados a membrana, etc.

La expresión "miARN específico para PDE4D7" se refiere a una molécula de ARN monocatenaria corta de normalmente 18-27 nucleótidos de longitud, que regula la expresión génica de PDE4D7. Los miARN están codificados por genes a partir de cuyo ADN se transcriben pero no se traducen a una proteína. En un contexto natural los miARN se transcriben en primer lugar como transcritos primarios o pri-miARN con un recubrimiento terminal y una cola de poli-A y se procesan a estructuras de tallo-bucle de 70 nucleótidos cortas, conocidas como pre-miARN en el núcleo celular. Este procesamiento se realiza en animales mediante un complejo proteico conocido como el complejo Microprocesador, que consiste en la nucleasa Drosha y la proteína de unión ARN bicatenario Pasha. Estos pre-miARN se procesan después a miARN maduros en el citoplasma mediante interacción con la endonucleasa Dicer, que también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

Después de la integración en un complejo RISC activo, los miARN pueden formar pares de bases con sus moléculas de ARNm complementarias e inhibir la traducción o pueden inducir degradación de ARNm mediante los miembros catalíticamente activos del complejo RISC, por ejemplo proteínas argonauta. Las moléculas de miARN maduras son normalmente al menos parcialmente complementarias de moléculas de ARNm correspondientes al producto de expresión de la presente invención, y regulan negativamente de forma completa o parcial la expresión génica. Preferentemente, los miARN según la presente invención pueden ser 100 % complementarios de sus secuencias diana. Como alternativa pueden tener 1, 2 o 3 desapareamientos, por ejemplo en los restos terminales o en la parte central de la molécula. Las moléculas de miARN según la presente invención pueden tener una longitud de entre aproximadamente 18 y 27 nucleótidos, por ejemplo, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27 nucleótidos. Se prefieren de 21 a 23 unidades.

Los miARN que tienen 100 % de complementariedad pueden usarse preferentemente para la degradación de ácidos nucleicos según la presente invención, mientras que los miARN que muestran menos del 100 % de complementariedad pueden usarse preferentemente para el bloqueo de procesos de traducción.

La expresión "molécula antisentido de PDE4D7" se refiere a ácidos nucleicos correspondientes a las secuencias comprendidas en la SEQ ID NO: 1 o 6 o la cadena complementaria de las mismas. Preferentemente, la molécula antisentido de la invención comprende una secuencia complementaria de al menos una parte de un producto de expresión de PDE4D7 según la presente invención. Aunque pueden usarse moléculas antisentido complementarias de la región codificante de PDE4D7, se prefieren las complementarias de la región transcrita y no traducida.

En general, puede usarse tecnología antisentido para controlar, es decir, reducir o terminar la expresión génica mediante ADN o ARN antisentido, o mediante la formación de triple hélice. En una realización, puede generarse una molécula antisentido de forma interna por el organismo, por ejemplo de forma intracelular mediante la transcripción a partir de una secuencia exógena. Puede transcribirse un vector o una parte del mismo produciendo un ácido nucleico antisentido de la invención. Dicho vector contendría una secuencia que codifica el ácido nucleico antisentido de la invención. Dicho vector puede permanecer episómico o integrarse en el cromosoma, siempre que pueda transcribirse para producir la molécula antisentido deseada. Pueden construirse vectores correspondientes mediante métodos de tecnología de ADN recombinante conocidos por los expertos en la materia. Los vectores pueden ser plasmídicos, víricos, u otros conocidos en la técnica, usados para replicación y expresión en células de vertebrados, por ejemplo, vectores como se han definido anteriormente en el presente documento.

En otra realización, la molécula antisentido puede administrarse por separado. Como ejemplo, la parte codificante 5' de un ácido nucleico de PDE4D7 según la presente invención puede usarse para diseñar un oligonucleótido de ARN o ADN antisentido de aproximadamente 6 a 50 nucleótidos de longitud. Preferentemente, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos de longitud.

Los ácidos nucleicos antisentido de la invención normalmente comprenden una secuencia complementaria de al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen de interés. Sin embargo, no es necesaria la complementariedad absoluta, aunque se prefiere. Una secuencia "complementaria de al menos una parte de un transcrito de ARN" como se indica en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para poder hibridar con el ARN, formando una formación de doble o triple cadena estable en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. En general, cuanto mayor sea el ácido nucleico hibridante, más desapareamientos de bases con una secuencia de ARN de la invención puede contener y aún formar una doble cadena o triple cadena estable. Un experto en la materia puede determinar un grado tolerable de desapareamiento mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Preferentemente pueden usarse moléculas antisentido complementarias del extremo 5' del transcrito, por ejemplo, la secuencia no traducida 5' hasta e incluyendo el codón de inicio AUG para la inhibición de la traducción. En una realización preferida adicional, también pueden usarse secuencias complementarias de las secuencias no traducidas 3' de ARNm.

Una molécula antisentido según la presente invención puede ser ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarias o bicatenarias. Una molécula antisentido, preferentemente un oligonucleótido antisentido o cualquier molécula de ácido nucleico antisentido adicional según la presente invención o una molécula de ARNip según la presente invención puede modificarse en el resto de base, resto de azúcar o cadena principal de fosfato, por ejemplo para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. La molécula puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir los receptores de células hospedadoras *in vivo*), o agentes que faciliten el transporte a través de la membrana celular o la barrera hematoencefálica, agentes de escisión desencadenados por hibridación o agentes intercalantes. La molécula puede en consecuencia conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agentes de reticulación desencadenado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión desencadenado por hibridación, etc.

La molécula antisentido o el oligonucleótido antisentido, molécula de miARN o ARNip, puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo,

5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetil-aminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-6-N-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético, 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. La molécula también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero sin limitación, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. En otra realización, la molécula comprende como alternativa o adicionalmente al menos una cadena principal de fosfato modificada, por ejemplo un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquil fosfotriéster y un formacetal o análogo del mismo.

En otra realización, la molécula antisentido, por ejemplo el oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido alfa-anomérico, es decir, un oligonucleótido que forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que las cadenas se sitúan paralelas entre sí.

La expresión "ARNip específico para PDE4D7" se refiere a un tipo particular de moléculas antisentido, concretamente dobles cadenas de ARN inhibidor pequeño que inducen la ruta de interferencia de ARN (iARN) para regular negativamente la expresión génica del marcador tumoral según la Tabla 1. Estas moléculas de ARNip pueden variar en longitud y pueden ser de entre aproximadamente 18-28 nucleótidos de longitud, por ejemplo tener una longitud de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos. Preferentemente, la molécula tiene una longitud de 21, 22 o 23 nucleótidos. La molécula de ARNip según la presente invención puede contener diversos grados de complementariedad con su ARNm diana, preferentemente en la cadena antisentido. Los ARNip pueden tener bases salientes no emparejadas en el extremo 5' o 3' de la cadena con sentido y/o la cadena antisentido. El término "ARNip" incluye dobles cadenas de dos cadenas separadas, así como cadenas individuales que pueden formar estructuras en horquilla que comprenden una región bicatenaria. Preferentemente el ARNip puede ser bicatenario en donde la molécula de ARNip bicatenaria comprende una primera y una segunda cadena, cada cadena de la molécula de ARNip es de aproximadamente 18 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, la primera cadena de la molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que tiene suficiente complementariedad con el ARN diana mediante interferencia de ARN y la segunda cadena de dicha molécula de ARNip comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la primera cadena.

Los expertos en la materia conocen métodos para diseñar ARNip adecuados dirigidos a un ácido nucleico diana dado.

La expresión "aptámero específico para el producto de expresión o específico para la proteína de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un péptido corto o péptidos cortos capaces de interactuar y unirse específicamente con la proteína o proteínas PDE4D7. El aptámero o aptámeros peptídicos pueden ser capaces preferentemente de unirse específicamente con una proteína o proteínas o un polipéptido o polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. El aptámero o aptámeros peptídicos también pueden ser capaces de unirse específicamente con una proteína o proteínas o un polipéptido o polipéptidos que comprenden una secuencia o secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia o secuencias de ADN que son al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o a una proteína o a un 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. Normalmente, un aptámero o aptámeros peptídicos son un bucle peptídico variable, que comprende por ejemplo de 10 a 20 aminoácidos. En el contexto de la presente invención el aptámero o aptámeros peptídicos puede unirse preferentemente en uno o ambos extremos con una estructura de armazón. La estructura de armazón puede ser cualquier molécula, preferentemente una proteína, que tenga buenas propiedades de solubilidad. Los expertos en la materia conocerían 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 peptídico de aptámero puede insertarse preferentemente en un sitio activo reductor de la molécula de armazón. Como alternativa, pueden usarse proteína A estafilocócica y dominios de la misma y derivados de estos dominios, tales como proteína Z o lipocalinas como estructuras de armazón en el contexto de la presente invención. Pueden generarse aptámeros peptídicos según cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia, por ejemplo mediante enfoques de dos híbridos de levadura.

En una realización preferida el aptámero peptídico anteriormente mencionado es capaz de unirse con una proteína o un polipéptido de PDE4D7, preferentemente proteína o polipéptido correspondiente a la SEQ ID NO: 2 y de reducir la actividad biológica y/o la actividad enzimática de esta proteína o estas proteínas en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o en al menos 98 % o 99 % en comparación con un nivel de control obtenido de una muestra no tratada.

Una "molécula pequeña capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto orgánico pequeño que está preferentemente biológicamente activo, es decir

una biomolécula, pero preferentemente no es un polímero. Dicho compuesto orgánico puede tener cualquier forma o propiedad química adecuada. El compuesto puede ser un compuesto natural, por ejemplo metabolitos secundarios o un compuesto artificial, que se ha diseñado y generado de novo. En una realización de la presente invención, una molécula pequeña es capaz de bloquear la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y su interactante. Los expertos en la materia conocen métodos y técnicas para la identificación y preparación de moléculas pequeñas así como ensayos para el ensayo de moléculas pequeñas.

La expresión "peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7" en el contexto de la presente invención se refiere a una cadena de tipo proteico pequeña diseñada para imitar un péptido y capaz de unirse con la proteína PDE4D7. Dicho peptidomimético puede surgir de una modificación de un péptido existente, por ejemplo un péptido o aptámero peptídico como se ha definido anteriormente en el presente documento, para alterar las propiedades de la molécula. Un peptidomimético puede surgir de una modificación que cambia la estabilidad o capacidad de unión de la molécula. Estas modificaciones indican típicamente cambios del péptido que no se producirán de forma natural. Por ejemplo, un peptidomimético según la presente invención puede tener cadenas principales peptídicas alteradas o puede comprender aminoácidos no naturales. Preferentemente, un peptidomimético según la presente invención puede representar una molécula fosfodiesterasa, en particular PDE4D7, o una proteína de interacción o inmovilización. En una realización de la presente invención un peptidomimético puede bloquear la interacción entre PDE, en particular PDE4D7 y su interactante. Los expertos en la materia conocen métodos y técnicas para la preparación de peptidomiméticos así como ensayos para el ensayo de peptidomiméticos.

Una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención también puede comprender un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7, por ejemplo un anticuerpo o variante de anticuerpo como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización preferida dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser capaz de inhibir la actividad biológica y/o actividad enzimática de PDE4D7.

El experto en la materia también sería consciente de la posibilidad de dirigirse a y destruir células y tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en virtud de anticuerpos conjugados específicos para PDE4D7. Por lo tanto, en una realización específica de la presente invención el anticuerpo o fragmento del mismo como se ha definido anteriormente en el presente documento puede conjugarse con un agente terapéutico o citotóxico. La expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier compuesto, fármaco, molécula pequeña o medicamento, que es capaz de conferir un efecto terapéutico a una célula, a un tejido o al organismo completo. Los expertos en la materia conocen ejemplos de dichos agentes. La expresión "agente citotóxico" se refiere a cualquier compuesto, fármaco, molécula pequeña que es capaz de conferir un efecto tóxico a una célula o a un tejido. Dichos agentes pueden comprender, por ejemplo, compuestos que activan sistemas efectores citotóxicos endógenos, así como radioisótopos, holotoxinas, toxinas modificadas, subunidades catalíticas de toxinas o cualquier molécula o enzima que no esté presente normalmente en o sobre la superficie de una célula que en condiciones definidas provoque la muerte de la célula. La expresión también puede incluir radioisótopos conocidos en la técnica, anticuerpos adicionales (o partes que contienen fijación de complemento de los mismos) que se unen con un sistema efector citotóxico endógeno inherente o inducido, timidina quinasa, endonucleasa, RNasa, toxina alfa, ricina, abrina, exotoxina A de *Pseudomonas*, toxina diftérica, saporina, momordina, gelonina, proteína antivírica de fitolaca, alfa-sarcina y toxina del cólera. La expresión también se refiere a profármacos citotóxicos. Por "profármaco citotóxico" se entiende un compuesto no tóxico que es convertido por una enzima, normalmente presente en la célula, en un compuesto citotóxico. Los profármacos citotóxicos que pueden usarse según la invención incluyen derivados de glutamilo de agente alquilante de mostaza de ácido benzoico, derivados de fosfato de etopósido o mitomicina C, arabinósido de citosina, daunorrubicina, y derivados de fenoxiacetamida de doxorubicina.

En una realización de la invención la composición farmacéutica puede comprender además compuestos adicionales que son activos contra células cancerosas. Asimismo, en otra realización de la invención la composición farmacéutica puede comprender además inhibidores de hormonas, preferentemente anti-andrógenos o antagonistas de andrógenos como espironolactona, acetato de ciproterona, flutamida, nilutamida, bicalutamida, ketoconazol, finasterida o dutasterida.

En una realización adicional la presente invención también prevé procedimiento de exploración y métodos para la identificación de un aptámero específico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7, un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7, un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; un miARN específico para PDE4D7; una molécula antisentido de PDE4D7; un ARNip específico para PDE4D7 y una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7 como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Dichos procedimientos de exploración pueden comprender las etapas de (a) producir células que expresan la PDE4D7 como un polipéptido bien como proteína secretada o bien en la membrana celular o como componente intracelular, (b) poner en contacto el polipéptido en la etapa (a) con una muestra de ensayo que contiene potencialmente una molécula de interacción, por ejemplo un aptámero específico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7,

un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7, un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; un miARN específico para PDE4D7; una molécula antisentido de PDE4D7; un ARNip específico para PDE4D7 o una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la PDE4D7 y (c) identificar una molécula de interacción observando la unión y/o inhibición o modulación de la actividad de PDE4D7.

Como alternativa, dichos procedimientos de exploración pueden comprender las etapas de (a) poner en contacto una muestra de ensayo que contiene potencialmente una molécula de interacción directa o indirecta, por ejemplo, un aptámero específico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7, un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7, un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; un miARN específico para PDE4D7; una molécula antisentido de PDE4D7; un ARNip específico para PDE4D7 y una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la PDE4D7 con una o más células que expresan la PDE4D7 como un transcrito, (b) detectar el nivel de expresión de dicha secuencia; y (c) identificar una molécula de interacción observando la unión o una modulación o reducción del nivel de expresión de PDE4D7.

La presente invención también abarca un aptámero específico para el producto de expresión o proteína de PDE4D7, un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7, un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; un miARN específico para PDE4D7; una molécula antisentido de PDE4D7; un ARNip específico para PDE4D7 y una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la PDE4D7 que puede obtenerse o se obtiene mediante un procedimiento de exploración o método como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Además, en otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7; (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7; (e) un miARN específico para PDE4D7; (f) una molécula antisentido de PDE4D7; (g) un ARNip específico para PDE4D7; (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7; (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y/o (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para la preparación de una composición farmacéutica inhibidora para el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende la administración de (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7; (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 y un equivalente biológicamente activo de la misma; (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7; (e) un miARN específico para PDE4D7; (f) una molécula antisentido de PDE4D7; (g) un ARNip específico para PDE4D7; (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7; (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y/o (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 a un individuo, en particular a un individuo que padece cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o al que se le ha pronosticado que va a desarrollar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

En otro aspecto más la presente invención se refiere a una composición farmacéutica estimulante para su uso en el tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado de un grupo que consiste en: (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un agonista alostérico de la actividad enzimática de PDE4D7; (b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7; (c) la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; (d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7; (e) un inhibidor de miARN específico para miARN de PDE4D7, (f) un agente de desmetilación; y (g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa.

La expresión "un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que es capaz de aumentar la actividad de PDE4D7 para degradar AMPc mediante una interacción directa con PDE4D7. Dicho compuesto puede ser cualquier interactor directo de PDE4D7, que tiene influencia positiva en la actividad catalítica de PDE4D7. Dicho compuesto puede ser preferentemente un agonista alostérico de la actividad catalítica de PDE4D7, por ejemplo un modulador alostérico homotrópico. Son agonistas alostéricos preferidos de PDE4D7 AMPc o análogos de AMPc. Otros compuestos de estimulación directa previstos por la presente invención son iones, preferentemente cationes mono y bivalentes biológicamente activos como Ca^{2+} , Mg^{2+} .

La expresión “un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7” como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que es capaz de aumentar la actividad de PDE4D7 para degradar AMPc mediante una interacción con un interacto directo de PDE4D7 (“interactor indirecto”) o mediante una ruta de trabajo indirecta que no implica una interacción con PDE4D7. Dicho compuesto puede ser cualquier interacto directo de un interacto de PDE4D7. El efecto proporcionado por el interacto directo de un interacto de PDE4D7 puede ser positivo si el interacto de PDE4D7 en sí mismo tiene un efecto positivo sobre la actividad de PDE4D7, o negativo, si el interacto de PDE4D7 tiene un efecto negativo sobre la actividad de PDE4D7. Normalmente los interactores indirectos que actúan de forma positiva pueden estimular el efecto agonista de interactores directos, por ejemplo provocar el aumento de la concentración de compuestos de acción alostérica como AMPc o análogos de los mismos inhibiendo procesos de degradación de AMPc no conferidos por PDE4D7, elevando la producción de AMPc, etc.

Como alternativa, dichos integradores indirectos de acción positiva puede provocar una modificación del comportamiento de unión de proteínas de unión directa, lo que conduce a un aumento de la actividad de PDE4D7. Normalmente los interactores indirectos de acción negativa pueden tener un efecto inhibitor sobre inhibidores de PDE4D7. Son ejemplos de dichos interactores actividades enzimáticas que degradan inhibidores de PDE4D7, o proteínas capaces de unirse con e inactivar inhibidores de PDE4D7. Como alternativa, dichos interactores pueden inhibir actividades que conducen a una degradación de PDE4D7, por ejemplo inhibidores de proteinasa. Los expertos en la materia conocerían ejemplos adicionales y su implementación.

Como alternativa, una estimulación indirecta de la actividad de PDE4D7 puede ser proporcionada por compuestos que activan, protegen o mantienen la expresión del gen de PDE4D7 endógeno. Son ejemplos de dichos compuestos factores de transcripción específicos de PDE4D7, actividades estabilizantes de ARNm específicas de PDE4D7 o factores de corte y empalme de PDE4D7. Los expertos en la materia conocerían ejemplos adicionales y su implementación.

La “proteína PDE4D7” comprendida en la composición farmacéutica estimulante puede ser una proteína PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento. En particular, puede ser una proteína que es codificada por la variante de corte y empalme 7 de la fosfodiesterasa humana PDE4D, más preferentemente puede tener la secuencia de aminoácidos definida en el N.º de referencia de Genbank: AF536976 (versión AF536976.1, GI:22901883 a fecha de 3 de marzo de 2009), y aún más preferentemente puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. La “proteína PDE4D7” como se usa en este contexto también comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 y secuencias de aminoácidos que son codificadas por secuencias de nucleótidos que son al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1. Las variantes homologadas de PDE4D7, en particular las mencionadas anteriormente, tienen preferentemente funcionalidad de PDE4D7, es decir son capaces de degradar AMPc. En una realización adicional de la invención las variantes homólogas de PDE4D pueden adicionalmente o como alternativa tener un patrón de localización similar o idéntico a PDE4D7 en una célula o en un tipo tisular.

En una realización preferida adicional la región u homología entre las variantes homólogas de PDE4D7 y PDE4D7 pueden estar confinadas a la parte C terminal de la proteína. Por ejemplo, la variante homóloga puede comprender un dominio N terminal que está presente en PDE4D7 y un resto de proteína que tiene un grado de homología con PDE4D7 como se ha indicado anteriormente en el presente documento. La parte N terminal de la variante homóloga puede comprender los aminoácidos 1 a 120, a 110, 1 a 100, 1 a 90, 1 a 80, 1 a 70, 1 a 60, 1 a 50, 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20 o 1 a 10 procedentes de PDE4D7.

La expresión “equivalente biológicamente activo de PDE4D7” como se usa en el presente documento se refiere a una proteína PDE4D7 que es capaz de realizar todas o una mayoría de las funciones de PDE4D7. Preferentemente, se refiere a proteínas que son capaces de degradar AMPc. En una realización adicional de la invención los equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 pueden adicionalmente o como alternativa tener un patrón de localización similar o idéntico a PDE4D7 en una célula o en un tipo tisular. Los equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 también pueden comprender variantes de PDE4D7 como se han definido anteriormente en el presente documento.

PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 según la presente invención pueden producirse de forma recombinante mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. La presente invención, por lo tanto, también abarca métodos para la producción de PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7.

En consecuencia, la presente invención contempla vectores que contienen los polinucleótidos que codifican PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento, células hospedadoras, y la producción de PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 mediante técnicas recombinantes.

Un vector adecuado puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plasmídico, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes para replicación o defectuosos en replicación. En este último caso, se producirá en general propagación vírica solamente en células hospedadoras complementarias. Los polinucleótidos que codifican PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 pueden unirse con un vector o vehículo que contiene un marcador seleccionable para propagación en un hospedador. Un inserto polinucleotídico correspondiente puede unirse operativamente con un promotor apropiado, tal como el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y promotores de LTR retrovíricos o el promotor de PSA. Los expertos en la materia conocen otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión pueden contener además sitios para inicio de la transcripción, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por las construcciones incluirá preferentemente un codón de inicio de la traducción en el comienzo y un cordón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado de forma apropiada en el final del polipéptido para traducir.

Los polipéptidos o proteínas pueden ser glucosilados o pueden ser no glucosilados o pueden modificarse de otro modo. Además, los polipéptidos o proteínas también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador. Asimismo, el polipéptido, la proteína o el péptido pueden modificarse mediante acetilación, pegilación, hesilación, formilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión química específica, escisión proteolítica, un enlace con un ligando celular u otra proteína o hapilación, es decir, una fusión con un polímero de homo-aminoácido (HAP) rico en glicina, etc. Dichas modificaciones puede llevarse a cabo mediante técnicas adecuadas conocidas por el experto en la materia. Adicionalmente, el polipéptido, péptido o variante puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Además, PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 de la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en este campo, por ejemplo usando un sintetizador peptídico.

El "ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7" comprendido en la composición farmacéutica estimulante como se ha definido anteriormente en el presente documento se refiere a cualquier elemento transportador adecuado, por ejemplo como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que comprende un gen de PDE4D7 expresable. Preferentemente, dicho elemento transportador puede comprender la secuencia como se ha definido en el N.º de referencia de Genbank: AF536976 (versión AF536976.1, GI:22901883 a fecha de 3 de marzo de 2009), más preferentemente la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO: 1. Dicho elemento transportador también puede comprender secuencias de nucleótidos que muestran un alto grado de homología con PDE4D7, por ejemplo secuencias de ácido nucleico que son al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1 o secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos que son al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, el vehículo puede comprender la secuencia genómica de PDE4D, preferentemente la secuencia definida en la entrada de base de datos ENSEMBL ENSG00000113448 (Versión ENSG00000113448.8, Ensembl versión 53 – marzo de 2009), que corresponde a la SEQ ID NO: 6, o que puede obtenerse del N.º de referencia de Genbank AC008934 (Versión AC008934.5, GI:17386235 a fecha de 24 de marzo de 2009) en combinación con el N.º de referencia de Genbank AC034234 (Versión AC034234.4, GI:18390182 a fecha de 24 de marzo de 2009) o que puede obtenerse de Wang *et al.*, 2003, Cell Signal., 15(9): 883-91. Más preferentemente, el vehículo puede comprender la secuencia genómica de PDE4D como se define en la SEQ ID NO: 6.

Asimismo, equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 como se han definido anteriormente en el presente documento pueden estar comprendidos en un vehículo de la presente invención.

El polinucleótido que codifica PDE4D7 puede unirse preferentemente con un vector que contiene un marcador seleccionable para propagación en una célula humana. En una realización preferida, el inserto polinucleotídico puede unirse operativamente a un promotor de PSA.

En una realización de la presente invención pueden proporcionarse ácidos nucleicos que codifican y expresan PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento mediante productos terapéuticos vivos. La expresión "producto terapéutico vivo" significa que PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de PDE4D7 como se han definido anteriormente en el presente documento se expresan en cualquier portador vivo adecuado. En consecuencia, la presente invención se refiere a polinucleótidos correspondientes que son adecuados para expresión en una célula viva. La presente invención también se refiere a vectores que contienen dichos polinucleótidos, células hospedadoras apropiadas y la producción de polipéptidos por técnicas recombinantes en dichas células hospedadoras.

La expresión "portador vivo" se refiere a cualquier célula hospedadora viva o virus apropiado conocido por el experto en la materia. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas tales como *Escherichia coli* o *Lactobacillus*, células fúngicas, tales como células de levadura, protozoos, células de insecto o células animales. Preferentemente, la expresión se refiere a bacterias atenuadas, células

fúngicas atenuadas o protozoos atenuados. Los ejemplos representativos de virus apropiados incluyen virus del grupo de adenovirus, retrovirus o lentivirus, preferentemente virus atenuados del grupo de adenovirus, retrovirus o lentivirus. En una realización preferida, pueden usarse células bacterianas probióticas, en particular células probióticas de *Escherichia coli* o *Lactobacillus*. Más preferentemente, pueden usarse células de *Escherichia coli* Nissle 197 y aún más preferentemente células de *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus zeae* 393.

El “inhibidor de miARN específico para miARN de PDE4D7” comprendido en la composición farmacéutica estimulante como se ha definido anteriormente en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de ácido nucleico complementaria de una molécula de miARN o microARN de PDE4D7. El término “complementario” como se usa en el presente documento se refiere a una complementariedad perfecta entre el ácido nucleico inhibidor de miARN (molécula con sentido) y el miARN (molécula antisentido) sin ningún desapareamiento, así como a situaciones en las que el ácido nucleico contiene cualquier desapareamiento de bases y/o nucleótidos adicionales o ausentes en comparación con la molécula de miARN. En otras realizaciones, las dos moléculas comprenden uno o más desapareamientos de bases o difieren en sus números totales de nucleótidos (debido a adiciones o supresiones). En realizaciones adicionales, la molécula de ácido nucleico inhibidora de miARN “complementaria” comprende al menos diez nucleótidos contiguos que muestran complementariedad perfecta con una secuencia comprendida en la molécula de miARN.

Normalmente las moléculas de ácido nucleico inhibidoras de miARN son moléculas de ADN o ARN de origen natural o moléculas de ácido nucleico sintéticas que comprenden en su secuencia uno o más nucleótidos modificados que pueden ser del mismo tipo o de uno o más tipos diferentes.

Se prevé, por ejemplo, por la presente invención que dicha molécula de ácido nucleico inhibidora de miARN comprende al menos una unidad de cadena principal ribonucleotídica y al menos una unidad de cadena principal desoxirribonucleotídica. Asimismo, la molécula de ácido nucleico inhibidora de miARN puede contener una o más modificaciones de la cadena principal de ARN en el grupo 2'-O-metilo o grupo 2'-O-metoxietilo (también denominado “2'-O-metilación”), que evitan la degradación por nucleasa en el medio de cultivo y, lo que es más importante, también evitan la escisión endonucleolítica por la nucleasa de complejo de silenciamiento inducido por ARN, lo que conduce a inhibición irreversible del miARN. Otra posible modificación, que es funcionalmente equivalente a 2'-O-metilación, implica ácidos nucleicos bloqueados (LNA) que representan análogos de ácido nucleico que contienen uno o más monómeros de nucleótidos de LNA, como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Otra clase de silenciadores de la expresión de miARN para usar en el contexto de la presente invención comprende oligonucleótidos modificados químicamente denominados “antagomir”, que representan moléculas de ARN monocatenarias conjugadas con colesterol. Las moléculas pueden comprender entre 19 y 25 nucleótidos. Preferentemente, la molécula comprende 20, 21, 23 o 24 nucleótidos. Más preferentemente, la molécula comprende 23 nucleótidos (pueden obtenerse más detalles en Krutzfeldt *et al.*, 2005, Nature, 438: 685-689).

En otra realización de la presente invención los inhibidores de miARN como se han definido anteriormente en el presente documento pueden proporcionarse en forma de vectores de expresión para introducir en un tejido o células. Como alternativa, dichos vectores también pueden introducirse en productos terapéuticos vivos como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Normalmente, pueden producirse ARN a partir de transgenes proporcionados en forma de vectores o vehículos de transfección o expresión transitoria. Por ejemplo, los inhibidores de miARN competitivos pueden proporcionarse como transcritos expresados a partir de promotores fuertes, que contienen más de un, preferentemente múltiples, sitios de unión en tándem para un microARN de interés. Una “esponja de microARN” como se ha descrito en Ebert *et al.*, 2007, Nat. Methods, 4: 721-726 es un ejemplo ilustrativo, no limitante, de esta técnica.

El “agente de desmetilación” comprendido en la composición farmacéutica estimulante como se ha definido anteriormente en el presente documento se refiere a un agente capaz de desmetilar estructuras de cromatina, preferentemente regiones promotoras, más preferentemente el promotor de PDE4D7. Son ejemplos de agentes de desmetilación para usar en el contexto de la presente invención 5-aza-2'-desoxicitidina y 5-azacitidina, que reactivan genes silenciados de forma inapropiada por cambios estructurales de la cromatina que implican metilación de ADN y que pueden invertir estos cambios y, por lo tanto, restaurar las rutas celulares principales. Esto da como resultado normalmente la re-expresión y reversión de algunos aspectos del estado transformado. 5-azacitidina y 5-aza-2'-desoxicitidina normalmente inactivan ADN citosina C5-metiltransferasas mediante la formación de complejos estables entre los restos de 5-aza-2'-desoxicitidina en ADN y la enzima, imitando de este modo un intermedio de estado de transición estable cuando se une a la enzima metiltransferasa.

Un agente adicional, que puede estar comprendido en una composición farmacéutica estimulante según la presente invención, por sí solo o en combinación con 5-aza-2'-desoxicitidina y/o 5-azacitidina, es tricostatina A (TSA).

El “factor de desplazamiento de fosfodiesterasa” comprendido en la composición farmacéutica estimulante como se ha definido anteriormente en el presente documento se refiere a un compuesto que es capaz de alterar o romper la interacción de fosfodiesterasas, en particular PDE4D7, con un compañero de interacción o interactores. Dicho

proceso puede conducir en última instancia a una asociación de PDE, en particular PDE4D7, con diferentes compañeros de interacción que antes y, en consecuencia, a una redistribución de PDE. Dichos nuevos compañeros de interacción pueden inmovilizar PDE, en particular PDE4D7, y de forma correspondiente modificar los comportamientos celulares, por ejemplo provocar influencias en unión a receptor u otras actividades corriente abajo.

5 Son ejemplos de compañeros proteicos que pueden estar implicados en dicha reacción de desplazamiento y/o son capaces de inmovilizar la PDE, en particular PDE4D7, proteínas de anclaje como AKAP, proteínas de almacén como DISC1, beta-arrestina o RACK1, proteínas reguladoras como XAP2/AIP/ARA9, proteínas de unión a AMPc como subunidades de PKA-R o EPAC o receptores como el adrenoceptor beta1, así como enzimas como ERK.

10 Son factores de desplazamiento de fosfodiesterasa preferidos péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas, anticuerpos y aptámeros.

Un "péptido" en el contexto de un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa se refiere a un tramo de aminoácidos presentes en o que representan la molécula de fosfodiesterasa, en particular PDE4D7, o una proteína de interacción o inmovilización como se ha definido anteriormente en el presente documento. El tramo de aminoácidos
15 comprendido en el péptido puede tener una longitud de 5 a 100 aminoácidos, preferentemente de 10 a 50 aminoácidos, más preferentemente de 20 a 30 aminoácidos. Los tramos pueden ser completamente idénticos a la PDE o proteína interactora o una parte de la misma o pueden comprender variaciones de secuencia. Por ejemplo, la secuencia peptídica puede comprender restos de aminoácidos modificados en hasta 25 % de todas las posiciones,
20 preferentemente modificaciones que no cambian las propiedades estructurales o las propiedades de unión de la molécula. La secuencia de aminoácidos presente en el péptido puede representar como alternativa dominios espaciales de la PDE o proteína interactora y de forma correspondiente comprende una yuxtaposición de tramos de aminoácidos que no están unidos en la secuencia primaria de las moléculas.

Un "peptidomimético" en el contexto de un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa se refiere a una cadena de tipo proteico pequeña diseñada para imitar un péptido. Dicho peptidomimético puede surgir de una modificación de un péptido existente, por ejemplo un péptido como se ha definido anteriormente en el presente documento, para
25 alterar las propiedades de la molécula. Un peptidomimético puede surgir de una modificación que cambia la estabilidad o capacidad de unión de la molécula. Estas modificaciones implican típicamente cambios en el péptido que no se producirán de forma natural. Por ejemplo, un peptidomimético según la presente invención puede tener cadenas principales peptídicas alteradas o puede comprender aminoácidos no naturales. Preferentemente, un peptidomimético según la presente invención puede representar una molécula de fosfodiesterasa, en particular
30 PDE4D7, o una proteína de interacción o inmovilización como se ha definido anteriormente en el presente documento.

35 En una realización de la presente invención un peptidomimético puede bloquear la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y su interactor. En otra realización de la presente invención un peptidomimético puede potenciar la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y su interactor.

40 Los expertos en la materia conocen métodos y técnicas para la preparación de peptidomiméticos así como ensayos para el análisis de peptidomiméticos.

Una "molécula pequeña" en el contexto de un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa se refiere a un compuesto orgánico pequeño que está preferentemente biológicamente activo, es decir una biomolécula, pero
45 preferentemente no es un polímero. Dicho compuesto orgánico puede tener cualquier forma o propiedad química adecuada. El compuesto puede ser un compuesto natural, por ejemplo un metabolito secundario o un compuesto artificial, que se ha diseñado y generado de novo. En una realización de la presente invención una molécula pequeña es capaz de bloquear la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y su interactor. En otra realización de la presente invención una molécula pequeña puede potenciar la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y
50 su interactor. El experto en la materia conoce métodos y técnicas para la identificación y preparación de moléculas pequeñas así como ensayos para el análisis de moléculas pequeñas.

Un "anticuerpo" o un "aptámero" en el contexto de un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa se refiere a un anticuerpo específico de PDE, o variante de anticuerpo o fragmento como se ha definido anteriormente en el
55 presente documento, o a un aptámero específico de PDE47 como se ha definido anteriormente en el presente documento, que tiene la capacidad de alterar o romper la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y uno o más de sus interactores. Como alternativa, los términos también pueden referirse a anticuerpos o aptámeros que se unen con uno o más de los interactores de PDE4D7, como se ha descrito anteriormente en el presente documento, que tienen de forma similar la capacidad de alterar o romper la interacción entre PDE, en particular PDE4D7, y uno o
60 más de sus interactores. Se han descrito anteriormente en el presente documento métodos para la producción o ensayo de anticuerpos o aptámeros y/o son conocidos para los expertos en la materia.

En una realización preferida adicional dicha composición farmacéutica inhibidora como se ha definido anteriormente o dicha composición farmacéutica estimulante como se ha definido anteriormente puede usarse para el tratamiento
65 de cáncer de próstata dependiendo del nivel de expresión de PDE4D7, en donde dicho nivel de expresión se determina y/o supervisa según 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; y
 (c) normalizar el nivel de expresión medido de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen de referencia. El nivel de PDE4D7 puede determinarse según el nivel de ácido nucleico, proteína o actividad como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se prefiere la determinación de la cantidad de transcrito o transcritos y/o proteína de PDE4D7. Además, puede determinarse el nivel de un gen de referencia como se ha definido anteriormente en el presente documento en una muestra. Un gen de referencia preferido en el contexto de esta realización es PDE4D5, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

La expresión “dependiendo del nivel de expresión de PDE4D7” significa que la elección de la administración de una composición farmacéutica inhibidora o una composición farmacéutica estimulante puede realizarse después de haberse determinado el nivel de PDE4D7 en una muestra, preferentemente en comparación con un gen de referencia como PDE4D5.

En una realización particularmente preferida de la presente invención para niveles aumentados y/o crecientes de PDE4D7 va a administrarse una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención y para niveles reducidos y/o decrecientes de PDE4D7 va a administrarse una composición farmacéutica estimulante según la presente invención.

El término “aumentado” como se usa en este contexto significa que el nivel de expresión del gen de PDE4D7 en una muestra de ensayo está elevado en, por ejemplo, 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, 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 de PDE4D7 está elevada en, 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 elevada 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 con respecto a la expresión de genes o marcadores adicionales, por ejemplo genes constitutivos. Como una muestra de control preferida o punto de referencia puede usarse también un tejido de control no canceroso, sano, tejido o células procedentes de un individuo sano o tejidos de tumor benigno o datos procedentes de los mismos, etc. Como alternativa puede usarse también cualquier otra muestra de control o punto de control.

El término “creciente” se refiere a valores de expresión determinados de forma correspondiente que tienden a aumentar a lo largo de un determinado de tiempo, es decir, que se hacen mayores después de etapas de determinación repetidas, por ejemplo cada 4 semanas, 6 semanas, dos meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 1,5 años, 2 años, 2,5 años, etc. Un nivel de expresión de PDE4D7 “creciente” puede elevarse en consecuencia en 0,5 hasta más del 100 % en cada sesión de ensayo, preferentemente elevarse en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, etc. El aumento en sí mismo depende de la frecuencia de ensayo y la significación puede ajustarse en consecuencia, como conocerá el experto en la materia.

En una realización preferida un nivel de PDE4D7 aumentado o creciente puede determinarse en los estadios tempranos de desarrollo de cáncer de próstata, es decir, hasta el estadio tumoral de cáncer de próstata sensible a hormonas. Como alternativa, determinaciones histológicas pueden proporcionar información independiente acerca de la estadificación de un tumor de próstata. Dependiendo de dicha determinación independiente puede diagnosticarse un estadio de tumor benigno de próstata o un estadio de tumor dependiente de hormonas. En esta situación un nivel de PDE4D7 aumentado o creciente (en comparación con un control o estadio no canceroso o sano) puede desencadenar la administración de una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención.

Como alternativa, puede determinarse adicionalmente el nivel de PSA. En caso de que se encuentre un nivel bajo de PSA de menos 2,0 – 3,0 ng/ml un nivel aumentado o creciente de PDE4D7 puede desencadenar la administración de una composición farmacéutica inhibidora según la presente invención.

El término “reducido” como se usa en este contexto significa que el nivel de expresión de gen de PDE4D7 en una muestra de ensayo está reducida en, por ejemplo, 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, 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 de PDE4D7 está reducida en, 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 reducida 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 con respecto a la expresión de genes o marcadores adicionales, por ejemplo genes constitutivos. Como una muestra de control preferida o punto de referencia puede usarse un

control canceroso, en particular un tejido de cáncer de próstata sensible a hormonas o dependiente de hormonas o datos procedentes del mismo. Como alternativa puede usarse también cualquier muestra de control o punto de control.

El término “decreciente” se refiere a valores de expresión determinados de forma correspondiente que tienden a hacerse menores a lo largo de un periodo de tiempo determinado, es decir que se hacen menores después de etapas de determinación repetidas, por ejemplo, 4 semanas, 6 semanas, dos meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 1,5 años, 2 años, 2,5 años, etc. Un nivel de expresión de PDE4D7 “creciente” puede en consecuencia elevarse en 0,5 hasta más del 100 % en cada sesión de ensayo, preferentemente elevarse en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, etc. La reducción en sí misma depende de la frecuencia de ensayo y la significación puede ajustarse en consecuencia, como conocerá el experto en la materia.

En una realización preferida un nivel de PDE4D7 reducido o decreciente puede determinarse después de un aumento de PDE4D7 hasta que se haya determinado el estado tumoral de cáncer de próstata sensible a hormonas. Como alternativa, las determinaciones histológicas pueden proporcionar información independiente acerca de la estadificación de un tumor de próstata. Dependiendo de dicha determinación independiente puede diagnosticarse un estadio de tumor sensible a hormonas. En esta situación un nivel de PDE4D7 reducido o decreciente (en comparación con el estadio tumoral de partida) puede desencadenar la administración de una composición farmacéutica estimulante según la presente invención.

Como alternativa, el nivel de PSA en sangre puede determinarse adicionalmente. En caso de que se encuentre un nivel bajo de PSA de aproximadamente 20 ng/ml, por ejemplo 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ng/ml, etc. y/o mayor y un nivel de PDE4D7 reducido o decreciente puede desencadenar la administración de una composición farmacéutica estimulante según la presente invención.

En una realización específica adicional la presente invención prevé un método de supervisión del desarrollo de cáncer de próstata que abarca la determinación de PDE4D7, preferentemente en combinación con la determinación de un gen de referencia como se ha descrito anteriormente en el presente documento durante un periodo de tiempo determinado, es decir, después de etapas de determinación repetidas, por ejemplo cada 4 semanas, 6 semanas, dos meses, 4 meses, 6 meses, 8 meses, 12 meses, 1,5 años, 2 años, 2,5 años, 3 años, 4 años o cualquier otro periodo de tiempo adecuado, etc. El método puede proporcionar datos que muestran un aumento o una reducción del nivel de PDE4D7 en comparación con controles, por ejemplo, controles no cancerosos, controles cancerosos o con datos anteriores obtenidos del mismo individuo. Estos datos pueden usarse para representar o desarrollar una curva de expresión de PDE4D7 a lo largo del tiempo. Con la ayuda de métodos estadísticos adecuados conocidos por los expertos en la materia puede determinarse la posición dentro de dicha curva. Dependiendo de la posición dentro de dicha curva, es decir, en una parte de aumento o una parte de reducción de dicha curva, puede diagnosticarse la presencia o el desarrollo futuro de cáncer de próstata sensible a hormonas/dependiente a hormonas o cáncer de próstata resistente a hormonas. De forma correspondiente, se prevé el uso de composiciones farmacéuticas inhibitoras según la presente invención, o composiciones farmacéuticas estimulantes según la presente invención. Preferentemente, puede combinarse cualquiera de dichas determinaciones con la determinación de biomarcadores secundarios, por ejemplo, marcadores para cáncer de próstata, en particular PSA. En el caso de niveles de PSA bajos (hasta 2,0 a 4,0 ng/ml), los datos de PDE4D7 pueden ser análisis con respecto a cáncer de próstata temprano, es decir, cáncer de próstata benigno o dependiente de hormonas/sensible a hormonas. En el caso de niveles de PSA mayores (mayores de aproximadamente 20 ng/ml, por ejemplo aproximadamente 30, 40 o 50 ng/ml) los datos de PDE4D7 pueden analizarse con respecto a cáncer de próstata más avanzado, es decir cáncer de próstata resistente a hormonas.

Puede administrarse una composición farmacéutica según la presente invención a un paciente, sujeto o individuo con la ayuda de diversos sistemas de suministro conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de introducción pueden ser tópicos, entéricos o parenterales y pueden incluir vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, por inhalación, epidural y oral. La composición puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de embolada, mediante absorción a través de revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) o mediante inhalación y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Un método preferido de administración local es mediante inyección directa.

En otra realización la composición farmacéutica puede suministrarse directamente a órganos internos, cavidades corporales y similares mediante el uso de dispositivos de captura de imágenes usados para guiar una aguja de inyección directamente al sitio de interés. La composición farmacéutica también puede administrarse a sitios de enfermedad en el momento de la intervención quirúrgica. En otra realización más, la composición puede suministrarse en un sistema de liberación controlada.

Preferentemente la composición farmacéutica está en una forma, que es adecuada para administración oral, local o sistémica. En una realización preferida la composición farmacéutica se administra por vía local, oral o sistémica.

En una realización específica de la presente invención la composición farmacéutica inhibidora puede administrarse después de haberse llevado a cabo un inmunoensayo para estratificar a un individuo, o un método para identificar a un individuo para elegibilidad para cáncer de próstata como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en particular tras la clasificación de un individuo como poseedor de un nivel aumentado de PDE4D7. En una realización adicional la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de los ingredientes de la composición farmacéutica de la presente invención como se ha definido anteriormente en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dicho vehículo es farmacéuticamente aceptable, es decir no es tóxico para un receptor a la dosificación y concentración empleada.

En general, los ingredientes se proporcionan por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobrecito que indican la cantidad de agente activo.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse como formas neutras o salinas.

Preferentemente, la composición farmacéutica puede administrarse directamente o en combinación con cualquier adyuvante adecuado conocido por los expertos en la materia. La composición de la presente invención puede administrarse a un animal, preferentemente a un mamífero. Se pretende que “mamífero” como se usa en el presente documento tenga el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia. Particularmente, “mamífero” abarca seres humanos.

El término “administrado” significa administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la composición anteriormente mencionada. Por “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra, preferentemente este efecto es la reducción y degradación de PDE4D7. La dosis exacta dependerá del fin del tratamiento, y podrá ser determinada por un experto en la materia usando técnicas conocidas. Como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente, pueden ser necesarios ajustes para suministro sistémico frente a localizado, edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, momento de administración, interacción farmacológica y la gravedad de la afección, y serán determinables con experimentación rutinaria por los expertos en la materia.

La concentración de los principios activos o compuestos de una composición farmacéutica según la presente invención puede ajustarse adicionalmente al régimen de dosificación pretendido, la duración de uso pretendida, la cantidad y relación exacta de todos los ingredientes de la composición y factores y parámetros adicionales conocidos por los expertos en la materia.

Los agentes o compuestos activos según la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con otros tratamientos. En una realización preferida la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en combinación con un tratamiento antineoplásico, por ejemplo un tratamiento anticáncer de próstata tradicional.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede comprender cualquier conservante adecuado conocido por el experto en la materia.

Asimismo, las preparaciones según la invención también pueden comprender compuestos, que tienen una acción antioxidativa, de eliminación de radicales libres, anti-eritematosa, antiinflamatoria o antialérgica, para complementar o potenciar su acción.

En otra realización preferida de la presente invención pueden fusionarse componentes activos de la composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento con una proteína vehículo adecuada, por ejemplo, con proteínas receptoras de Ig Fc o receptores de Ig poliméricos. Preferentemente pueden proporcionarse como proteínas de fusión formas negativas dominantes de PDE4D7 o equivalentes biológicamente activos de la misma como se ha definido anteriormente en el presente documento. El compañero de fusión puede proporcionarse en el extremo N o C.

Si la composición farmacéutica según la presente invención va a administrarse en forma de una célula viva o un producto terapéutico vivo como se ha definido anteriormente en el presente documento, pueden administrarse células transformadas y preparadas a un paciente en cualquier forma adecuada conocida por los expertos en la materia. Preferentemente pueden administrarse productos terapéuticos vivos en forma de una composición que comprende un microorganismo, por ejemplo un *Lactobacillus* como se ha descrito anteriormente, en una cantidad entre 10^2 y 10^{12} células, preferentemente de 10^3 a 10^8 células.

En una realización preferida adicional de la presente invención la relación entre dos o más ingredientes en la composición farmacéutica o medicamento puede ajustarse convenientemente según el conocimiento del experto.

Puede emplearse opcionalmente ensayos adecuados para ayudar a identificar relaciones y/o intervalos de dosificación óptimos para ingredientes de composiciones farmacéuticas de la presente invención. La dosis precisa y la relación entre los ingredientes de la composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento para emplear en la formulación, dependerán, entre otras cosas, de la vía de administración, y el tipo exacto de enfermedad o trastorno, y deberían decidirse según el criterio del practicante y las circunstancias de cada paciente. Las dosis o relaciones de ingredientes eficaces pueden extrapolarse de curvas de respuesta a dosis procedentes de sistemas de ensayo *in vitro* o el modelo (animal).

Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un kit médico que comprende el ingrediente de una composición farmacéutica inhibidora o estimulante según la presente invención. Preferentemente, la presente invención se refiere a un kit médico para el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de actividad enzimática de PDE4D7; (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7; (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma; (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7; (e) un miARN específico para PDE4D7; (f) una molécula antisentido de PDE4D7; (g) un ARNip específico para PDE4D7; (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7; (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

Puede usarse un kit médico en el contexto de la administración de la composición farmacéutica como se ha definido anteriormente en el presente documento. En particular, puede usarse un kit según la presente invención para el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

Los ingredientes de un kit médico pueden, según la presente invención, estar comprendidos en uno o más recipientes o entidades separadas. Pueden formularse preferentemente como composiciones farmacéuticas o medicamentos, más preferentemente pueden formularse como se ha descrito anteriormente en el presente documento en el contexto de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, por ejemplo pueden comprender vehículos farmacéuticos adecuados, etc. Se prefieren en particular formulaciones para administración tópica como se ha mencionado anteriormente en el presente documento en el contexto de composiciones farmacéuticas de la invención. El kit médico según la presente invención también puede comprender opcionalmente una documentación que indica el uso o empleo del kit médico y sus componentes. Preferentemente, las instrucciones comprendidas en el kit de la presente invención pueden comprender opciones de tratamiento recomendadas, regímenes de dosificación, etc. El kit médico también puede comprender un folleto con instrucciones y/o puede proporcionar información adicional acerca del uso, la dosificación, etc.

El kit médico de la presente invención puede administrarse a un paciente según cualquier régimen de dosificación adecuado conocido por el experto en la materia. El kit médico o los componentes del kit pueden proporcionarse preferentemente una vez a la semana, más preferentemente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o 6 veces a la semana y más preferentemente diariamente y/o 2 veces al día o con más frecuencia, a menos que se indique otra cosa. Durante la progresión del tratamiento las dosificaciones pueden proporcionarse en intervalos temporales muchos más largos y en caso de necesidad pueden proporcionarse en intervalos temporales mucho más cortos, por ejemplo, varias veces al día. En un caso preferido una respuesta al tratamiento puede supervisarse usando métodos descritos en el presente documento y métodos adicionales conocidos por los expertos en la materia y las dosificaciones pueden optimizarse en consecuencia, por ejemplo, en el tiempo, la cantidad y/o la composición. El progreso puede supervisarse mediante evaluación periódica. También se prevé que el kit médico se emplea en enfoques de co-terapia, es decir, en la coadministración con otros medicamentos o fármacos, por ejemplo antibióticos, medicamentos antivíricos o inmunoglobulinas IgG o IgA, medicamentos antineoplásicos citotóxicos y, preferentemente en el caso de una composición médica incluyendo una composición farmacéutica inhibidora, medicamentos anti-hormonales, más preferentemente anti-andrógenos como se ha mencionado anteriormente en el presente documento.

En un aspecto adicional, específico, la presente invención se refiere a un kit que comprende ingredientes para la determinación de la expresión de PDE4D7 como se ha definido anteriormente en el presente documento junto con ingredientes de un kit médico para el tratamiento de cáncer de próstata sensible a hormonas maligno como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En una realización adicional, particularmente preferida, de la presente invención el cáncer para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar o cuya progresión se diagnostica, detecta, supervisa o pronostica o que va a tratarse con una composición farmacéutica como se ha mencionado anteriormente o mediante un método de tratamiento según la presente invención es un cáncer de próstata de estadio I a IV sensible a hormonas, un cáncer de próstata recurrente sensible a hormonas o un cáncer de próstata metastásico sensible a hormonas.

Un "cáncer de próstata de estadio I a IV sensible a hormonas" como se usa en el presente documento indica un cáncer de próstata que puede clasificarse según la clasificación de TNM por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) en estadios I a IV. Preferentemente, la expresión se refiere a la clasificación de cáncer de próstata que persigue el siguiente programa de clasificación de Tumor de Próstata Primario - T:

TX. El tumor primario no puede evaluarse.

T0. Sin pruebas de tumor primario.

T1. Tumor clínicamente imperceptible no palpable o visible por captura de imágenes.

T1a. Hallazgo histológico relacionado con tumor en 5 % o menos del tejido resecado.

T1b. Hallazgo histológico relacionado con tumor en más del 5 % de tejido resecado.

T1c. Tumor identificado por biopsia de aguja (por ejemplo, debido a PSA elevado).

T2. Tumor restringido a la próstata (tumor hallado en uno o ambos lóbulos por biopsia de aguja, pero no palpable o visible por captura de imágenes, se clasifica como T1c).

T2a. El tumor implica la mitad de un lóbulo o menos.

T2b. El tumor implica más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos.

T2c. El tumor implica ambos lóbulos.

T3. El tumor se extiende a través de la cápsula prostática (invasión en el ápice prostático o en (pero no más allá de) la cápsula prostática, no se clasifica como T3, sino como T2).

T3a. Extensión extracapsular (unilateral o bilateral).

T3b. El tumor invade una vesícula o las vesículas seminales.

T4. El tumor está fijado o invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello de la vejiga, esfínter externo, recto, músculos elevadores o pared pélvica.

N1. El tumor invade un ganglio o ganglios linfáticos regionales.

M1a. El tumor invade un ganglio o ganglios linfáticos no regionales.

M1b. El tumor invade un hueso o huesos.

M1c. El tumor invade otro sitio o sitios.

G. Gradación histopatológica.

GX. El grado no puede evaluarse.

G1. Bien diferenciado (anaplasia ligera) (Gleason 2-4).

G2. Moderadamente diferenciado (anaplasia moderada) (Gleason 5-6).

G3-4. Escasamente diferenciado/indiferenciado (anaplasia notable) (Gleason 7-10),

en donde las categorías T son ensayos de examen físico, captura de imágenes, endoscopia, biopsia y bioquímicos, las categorías N son exámenes físicos y ensayos de captura de imágenes y las categorías M son examen físico, captura de imágenes, estudios esqueléticos y ensayos bioquímicos y en donde los estadios I a IV de cáncer maligno de próstata corresponden al siguiente esquema:

Estadio I:	T1a; N0; M0; G1
Estadio II:	T1a; N0; M0; G2, 3-4, o

	T1b. c; N0; M0; cualquier G, o
	T1. T2; N0; M0; cualquier G
Estadio III	T3; N0; M0; cualquier G
Estadio IV	T4; N0; M0; cualquier G, o
	Cualquier T; N1; M0; cualquier G, o
	Cualquier T; cualquier N; cualquier G,

En donde el estadio IV no incluye cáncer de próstata resistente a hormonas.

5 Un "cáncer de próstata recurrente sensible a hormonas" como se usa en el presente documento indica un cáncer de próstata cuyo crecimiento y progresión está regulado y depende de una hormona sexual masculina. Un ejemplo preferido de dicha hormona sexual masculina es un andrógeno.

10 Un "cáncer de próstata metastásico sensible a hormonas" como se usa en el presente documento indica cáncer de próstata cuyo crecimiento y progresión no está regulado y es independiente de una hormona sexual masculina. Un ejemplo preferido de dicha hormona sexual masculina es andrógeno.

15 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para fines ilustrativos. Se entiende por tanto que el ejemplo y las figuras no deben interpretarse como limitantes. El experto en la materia será capaz claramente de prever modificaciones adicionales de los principios expuestos en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1 - ensayo de RT-PCR cuantitativa

20 A partir de los individuos y muestras representados en la Fig. 1A y B se aisló ARN y se transcribió mediante procedimientos convencionales a ADNc.

qRT-PCR: Materiales y métodos

25 Las muestras de ARN se trataron con DNasa para asegurar que no hubo ninguna contaminación de ADN. Antes de la síntesis de ADNc las muestras de ARN se trataron con Dnasal (In Vitrogen) durante 30 min a 37 °C. Después se trataron 1 µg de la muestra de ARN con Superscript Vilo (In Vitrogen) para sintetizar el ADN de primera cadena para análisis por qPCR según las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se trataron después con RnasaH1 durante 30 min a 37 °C.

30 El ADN resultante se diluyó hasta una concentración final de 50-60 ng/µl, de los que 5 µl se añadieron a cada pocillo de reacción de una placa de reacción óptica de 96 pocillos.

35 Se realizaron reacciones de PCR cuantitativa usando una máquina ABI Prism 7300 en un volumen de reacción de 15 µl según el siguiente protocolo:

40 7,5 µl de SuperMix de qPCR Platinum-UDG con ROX (InVitrogen)
2,2 µl de agua sin nucleasa
0,1 µl 100 pmol / µl de Sonda
0,1 µl 100 pmol / µl de Cebador Directo
0,1 µl 100 pmol / µl de Cebador Inverso

El volumen total en cada pocillo de reacción fue de 15 µl incluyendo ADNc.

45 La PCR en sí misma se realizó durante 40 ciclos con el siguiente programa:

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

Cebadores y sondas de qRT-PCR (TAQMAN)

50 Se usaron los siguientes cebadores y sondas oligonucleotídicos para RT-PCR en PDE4D7:

Cebador directo: 5'-TGCCTCTGAGGAAACACTAC-3' (SEQ ID NO: 3), Cebador Inverso 5'-GCTGAATATTGCGACATGAAAG-3' (SEQ ID NO: 4) que da lugar a un producto de la longitud 101.
Como sonda se usó la secuencia 5'-CCAGTAATGAAGAGGAAGACCCTTTCCGC-3' (SEQ ID NO: 5).

55

Los conjuntos de sonda se diseñaron para dirigirse a las regiones N terminales únicas de la isoforma de PDE. El amplicón se diseñó para que estuviera dentro del intervalo óptimo para ensayos Taqman en tecnología ABI Prism. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado para maximizar la integridad de los datos. También se incluyó una sonda de referencia de GAPDH frente a la que se referenciaron todos los datos consecutivos.

5 *qRT-PCR: análisis de datos*

Se llevó a cabo un enfoque de $-ddCt$ para normalizar y comparar diferentes experimentos de RT-PCR. Se obtuvieron valores Ct mediante la observación de umbral manual donde cada conjunto de sondas se amplificó exponencialmente a una eficacia comparable. En particular, se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- 1.) La diferencia en el número de ciclos (Ct) entre la referencia y el gen de interés (GAPDH restado del Gen de interés) se calculó para proporcionar el dCt de la muestra experimental (ES).
- 2.) Se seleccionó una muestra como patrón para comparar frente a (LNCaP) (C) y se calculó su dCt .
- 3.) El cambio en la diferencia del número de ciclos pudo obtenerse mediante $dCt(ES) - dCt(C) = ddCt$
- 4.) Los valores de expresión comparables finales pudieron obtenerse mediante 2^{-ddCt} para tener en cuenta la duplicación de ADN después de cada ciclo, mostrando de este modo la cantidad de ARNm en comparación con LNCaP.

Esta operación proporcionó un valor en comparación con LNCaP (que tendrá el valor de 1), es decir se consideró que cualquier valor > 1 era un aumento de la expresión, se consideró que un valor de < 1 era una reducción de la expresión.

Se supuso en consecuencia que las eficacias de extensión de todas las reacciones de PCR están dentro de un determinado intervalo, dando como resultado un valor de 1.

25 *Enfoque de porcentaje para normalizar y comparar diferentes experimentos de RT-PCR*

Para cada conjunto de sondas se obtuvo un valor de Ct (número de ciclo). Este se generó encontrando un valor basal que intersecaba con las curvas de amplificación durante su fase exponencial. Los valores basales se generaron de forma dinámica según las curvas obtenidas en cada experimento. Después se restaron los valores de Ct (intersección o ciclo) de los GOI del valor de Ct del patrón de GAPDH.

Según la fórmula $Ct(GAPDH) - Ct(GOI) = dCt$, dado que los valores de Ct de GOI son siempre mayores que el gen de referencia el valor de dCt dio como resultado números negativos, es decir, un valor de $-dCt$. Basándose en el efecto de duplicación de cada ciclo se determinaron los valores absolutos según el Valor de Expresión Comparativa $= 2^{-dCt}$.

Debido a los valores muy pequeños obtenidos a partir de este cálculo el valor se multiplicó por 1000 para fines de manipulación.

A partir de la Fig. 2 puede obtenerse un Diagrama de Cajas de niveles de expresión relativos de PDE4D7 frente a GAPDH de muestras de tejido de próstata normal, benigno y maligno. En particular, en esta figura se muestra una comparación entre muestras de tejido normal/de control (7), muestras de tejido benigno (31) y muestras de tejido maligno (10). Los resultados se obtuvieron basándose en un ensayo de T (de 2 colas) con un valor de p de benigno frente a maligno (diferencia de medianas) de 0,00025. La Fig. muestra que hay un aumento significativo de la expresión relativa entre tejido normal y benigno por un lado y tejido maligno de próstata por otro lado.

Se proporciona en la Fig. 3 un Diagrama de Dispersión de niveles de expresión relativos de PDE4D7 frente a GAPDH de muestras de tejido de próstata normal, benigno y maligno. En esta figura se indican los valores de expresión relativos individuales de PDE4D7 en tejidos de próstata normal, benigno y maligno. Los valores de expresión se proporcionan como relativos a la expresión de GAPDH. Los resultados muestran que la aplicación de un punto de corte arbitrario de 4,7 proporciona una especificidad de ensayo de diagnóstico para diferenciación entre muestras de próstata benignas y malignas de 92 % a una sensibilidad de 70 %.

Se proporciona en la Fig. 4 un análisis de curva ROC correspondiente de expresión de PDE4D7 en muestras de próstata benigna frente a maligna. Aquí, los valores de expresión de PDE4D7 relativos de muestras de tejido de próstata benigna frente a maligna se analizaron representando las clasificaciones FP frente a TP basándose en la expresión de PDE4D7 relativa (en comparación con GAPDH) en tejidos de próstata benigno frente a maligno (véase diagrama de cajas anterior). La ABC (área bajo la curva) se calculó con 0,91.

Para fines ilustrativos y de comparación se indica un diagrama de cajas de valores de PSA en sangre humana de 90 hombres con estadios benignos y diferentes de enfermedad de próstata maligna en la Fig. 5. En esta figura, se llevó a cabo una comparación entre hombres con una enfermedad benigna de próstata (30), hombres con enfermedad maligna de próstata (30), que presentaban cánceres pequeños y hombres con enfermedad maligna de próstata (30), que presentaban cánceres significativos. Esta figura muestra que el aumento de expresión entre tumores benignos de próstata y tumores malignos es menos pronunciado en comparación con los resultados de PDE4D7.

Se proporciona en la Fig. 6 un análisis de curva ROC correspondiente de niveles de PSA en sangre en hombres con estadios benignos frente a diferentes de enfermedad maligna de próstata. Aquí, los valores de expresión de PSA en sangre de hombres con muestras de próstata benigna (30) frente a maligna (30) cánceres pequeños, (30 significativos, véase diagrama de cajas anterior) se analizaron representando las clasificaciones de FP frente a TP basándose en los valores de PSA en sangre en enfermedad benigna frente a maligna. La ABC (área bajo la curva) se calculó con 0,7.

Ejemplo 2 – Detección de PDE4D7 y PDE4D5 en ensayos de RT-PCR cuantitativa con muestras de tejido humano (paneles I y II de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Orígene)

La expresión génica relativa de PDE4D7 humana y PDE4D5 humana como gen de referencia se evaluó en diversos paneles de pacientes.

Materiales y Métodos

Se proporcionan detalles acerca de las muestras usadas en las mediciones de qPCR del experimento de expresión de genes de PDE en las Tablas 1 y 2 a continuación:

Tabla 1. Panel I de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Orígene (HPRT501, Orígene Inc.):

sexo	edad	tejido	apariencia	diagnóstico	grado tumoral	normal	lesión	tumor
Hombre	67	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	100	0	0
Hombre	68	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	100	0	0
Hombre	53	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	100	0	0
Hombre	65	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	100	0	0
Hombre	48	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	100	0	0
Hombre	68	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	100	0	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	100	0	0
Hombre	60	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	100	0
Hombre	70	Próstata / Próstata	Lesión	Carcinoma de vejiga	AJCC G3: Poco diferenciado	0	100	0
Hombre	74	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	100	0
Hombre	66	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	100	0
Hombre	72	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	100
Hombre	63	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	25	75	0
Hombre	55	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	100	0
Hombre	70	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	100	0
Hombre	68	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	100	0
Hombre	66	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 2+2=4/10	0	100	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	No indicado	0	100	0
Hombre	71	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	100	0
Hombre	56	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	100	0
Hombre	61	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	100	0
Hombre	63	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	25	15	60
Hombre	70	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	25	5	70
Hombre	68	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	30	0	65
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	10	0	70
Hombre	59	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+5=9/10	10	0	80
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	5	0	85
Hombre	63	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	5	0	80
Hombre	53	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	100	0
Hombre	66	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+5=8/10	0	100	0
Hombre	61	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	100	0
Hombre	65	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	0	100	0
Hombre	64	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	100	0
Hombre	48	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+5=9/10	5	0	75
Hombre	65	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	0	0	90
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	10	0	80
Hombre	51	Próstata / Próstata	Lesión	Carcinoma de vejiga, urotelial	AJCC G4: no diferenciado	0	100	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata, atípica	NULO	0	100	0
Hombre	62	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	72	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	71	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0

sexo	edad	tejido	apariciencia	diagnóstico	grado tumoral	normal	lesión	tumor
Hombre	76	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia glandular de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	71	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	45	55	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	56	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	85	Próstata / Próstata	Lesión	Adenoma de próstata	NULO	0	100	0
Hombre	72	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	NULO	0	100	0

Tabla 2. Panel II de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Origen (HPRT502, Origen Inc.):

sexo	edad	tejido	apariciencia	diagnóstico de muestra a partir de verificación de patología	grado tumoral	normal	lesión	tumor
Hombre	53	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	48	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	68	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	76	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	53	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	68	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	74	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	72	Próstata / Próstata	Normal	Dentro de los límites normales	No aplicable	100	0	0
Hombre	62	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	50	0	50
Hombre	54	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	20	0	60
Hombre	56	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	25	75
Hombre	56	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	10	0	90
Hombre	55	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	45	0	40
Hombre	63	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	20	0	80
Hombre	53	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	40	0	60
Hombre	64	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	68	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	95
Hombre	63	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	60	0	40
Hombre	66	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	5	60
Hombre	70	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	25	0	65
Hombre	65	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	30	70
Hombre	64	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	0	90
Hombre	54	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	30	0	40
Hombre	64	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	80
Hombre	62	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	0	95
Hombre	62	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	0	90
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	62	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+5=8/10	0	0	80
Hombre	53	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	58	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de	Puntuación de	0	0	90

sexo	edad	tejido	apariciencia	diagnóstico de muestra a partir de verificación de patología	grado tumoral	normal	lesión	tumor
		Próstata		próstata	Gleason: 4+3=7/10			
Hombre	57	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+5=9/10	0	60	40
Hombre	65	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	55	45
Hombre	53	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	0	0	95
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	73	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	52	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	0	0	85
Hombre	64	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	0	90
Hombre	54	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 5+4=9/10	0	0	90
Hombre	61	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+2=5/10	20	0	80
Hombre	61	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	100	0
Hombre	54	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	0	80
Hombre	62	Prostate / Ganglio linfático	Tumor	Adenocarcinoma de próstata, metastásico	No indicado	0 0	95	
Hombre	64	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	0	0	90
Hombre	87	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 5+4=9/10	0	0	80
Hombre	56	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	0	0	90
Hombre	71	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 2+3=5/10	0	0	80
Hombre	56	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	10	0	90
Hombre	56	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 5+4=9/10	40	0	60

Los paneles I y II de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Orígene usados para los experimentos descritos a continuación comprenden muestras que proceden todas de pacientes varones (edades 48-87). La columna "tejido" define el tejido que se ha tomado durante la cirugía. La columna "apariciencia" indica el estado patológico de la sección tisular que se usó para aislar ARN, y que se usó finalmente para mediciones por qPCR. "Normal" en ese contexto significa tejido normal, adyacente (NAT), que es un tejido tomado de material quirúrgico (habitualmente, por Prostatectomía Radical o TURP (Resección Transuretral de la Próstata)) pero que aparece con morfología e histología normal/sana y se usa por lo tanto como un control. La definición de "Lesión" es la siguiente: Tejido no neoplásico que no es normal, porque hay algún tipo de anomalía diagnóstica patológica (pero no tumor). Esto incluye hispatologías tales como inflamación o hiperplasia benigna (ejemplos: Colitis, enfermedad de Crohn, Endometriosis, Enfisema, Bronquitis). "Tumor" se define como tejido neoplásico que podría ser benigno o maligno basándose en diagnóstico patológico (por ejemplo Adenoma, Adenocarcinoma, Sarcoma). La columna "diagnóstico" describe la razón programada para cirugía (por ejemplo, cáncer de vejiga para el paciente 9, pero también se tomó tejido de cáncer de próstata). La columna "grado tumoral" describe la Puntuación de Gleason si es aplicable (es decir en el caso de tejido tumoral). Las columnas "normal", "lesión" y "tumor" definen el porcentaje de tejido correspondiente hallado en histología dentro de la sección tisular usada para aislamiento de ARN. El panel I de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Orígene incluye 7 muestras normales (tejido adyacente normal, NAT), 11 muestras de hiperplasia (BPH – Hiperplasia prostática benigna), 20 muestras de lesión y 10 muestras de tumor de próstata. De las muestras tumorales, 7 son de tumores que tuvieron una puntuación de Gleason de 7 o más. El panel II de Tejido de Cáncer de Próstata Humano de Orígene incluye 8 muestras normales (tejido normal adyacente), 1 muestra de hiperplasia (BPH – Hiperplasia prostática benigna) y 39 muestras tumorales de próstata. De las muestras tumorales, 10 se originan de donantes clasificados con puntuación de Gleason de hasta 6, y 29 son de tumores que tuvieron una puntuación de Gleason de 7 o más.

Secuencias de cebadores usadas para PDE4D5 humana:

secuencia de cebador con sentido: GCAGCATGAGAAGTCCAAGA (SEQ ID NO: 7),

secuencia de cebador antisentido: TGTATGTGCCACCGTGAAAC (SEQ ID NO: 8)

5 secuencia de sonda: TCGGTTTCTCCCAAGCTCTCTCCAGTGATAAACCGA (marcada con FAM) (SEQ ID NO: 9).

Secuencias de cebadores usadas para PDE4D7 humana:

10 secuencia de cebador con sentido: CGGAATGGAACCCTA TCTTGTC (SEQ ID NO: 10);

secuencia de cebador antisentido: TTGGTCGTTGAATGTTCTCTGAT (SEQ ID NO: 11);

secuencia de sonda: CCTCTCGCCTTCAGACAGTTGGAACAAGGAGAGG (marcada con FAM) (SEQ ID NO: 12).

15 Los cebadores específicos de PDE4D7 y PDE4D5 (SEQ ID NO: 7, 8, 10 y 11) se premezclaron con las sondas de FAM para realizar PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) y se usaron en una dilución 1:20 según la descripción del fabricante (PrimerDesign, Reino Unido). Las muestras de ADNc humanas (véase Tablas 1 y 2) se dispusieron en placas de microtitulación (MT) de 96 pocillos, listas para pPCR, convencionales. 48 muestras de tejido procedentes de 48 pacientes diferentes, se dispusieron en placas MT de 96 pocillos, conteniendo cada uno de los 48 pocillos usados por placa aproximadamente 2-3 ng de ADNc transcrito de forma inversa a partir de ARN.

El contenido de ADNc de cada pocillo se normalizó basándose en la qPCR en un gen “constitutivo” como beta-actina, GAPDH, beta-2-microglobulina, de modo que no fue necesaria normalización adicional del contenido de ADNc.

25 A cada uno de los pocillos usados de la placa de MT se añadieron 15 µl de mezcla maestra GeneAmp de Applied Biosystems (2x), 13,5 µl de agua sin RNasa/DNasa y 2 µl de mezcla de cebadores PrimerDesign PerfectProbe (PrimerDesign, Reino Unido). Todas las muestras se analizaron con el siguiente protocolo de PCR: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C, 30 s a 50 °C registrando al mismo tiempo la fluorescencia, 15 s a 72 °C y las tres últimas etapas se repitieron 50 veces.

35 Para todos los cálculos de valores de expresión génica relativos, se usó el siguiente procedimiento: se excluyeron valores de C_T de 40 o más o por debajo de 16 por razones de escasa calidad. (Los genes examinados aquí tuvieron un valor de C_T promedio de ~31). Para normalizar los valores de C_T entre diferentes placas de qPCR, se calculó el valor de la mediana de C_T de las muestras de tejido “normales” y se determinaron los valores de expresión relativa para las muestras de “lesión”, “hiperplasia”, así como “tumor” en relación con este valor calculando la relación entre valores de C_T de muestras de “lesión”, hiperplasia”, así como “tumor” y el valor de C_T de muestras de tejido “normales”. Normalmente esto dio como resultado valores de expresión relativa de ~1. En caso de que se analizara la expresión génica múltiples veces (usando múltiples placas del mismo panel), se promediaron los valores de expresión relativos de cada muestra individual.

Expresión relativa de PDE4D5 humana en tejido de próstata humano

45 El nivel de expresión génica de la isoforma de PDE4D5 humana se determinó según los tejidos de próstata humanos como se ha descrito anteriormente. Los niveles de expresión relativos se determinaron en cuatro tejidos de próstata definidos (“Normal”, “Lesión”, “Hiperplasia”, “Tumor”). Los niveles de expresión para los grupos “Lesión”, “Hiperplasia” y “Tumor” se calcularon como se ha perfilado anteriormente como un valor normalizado formando la relación de valores de C_T para cada tejido de paciente individual de los grupos “Lesión”, “Hiperplasia”, “Tumor” frente al valor de C_T mediano del grupo “Normal”. Se realizó lo mismo para cada tejido de paciente individual del grupo “Normal” de modo que el valor de expresión mediano para este grupo es 1.

55 Como puede obtenerse a partir de las Figs. 7 y 8, no pudo detectarse ninguna expresión diferente significativa para PDE4D5 humana para tejidos de próstata aberrantes (Lesión, Hiperplasia y Tumor) en comparación con tejido de próstata normal. Todos los valores de p para comparación de tejidos aberrantes pero no cancerosos (Lesión, Hiperplasia) frente a tejido Tumoral fueron > 0,5.

Expresión relativa de PDE4D7 humana en tejido de próstata humano

60 El nivel de expresión génica de la isoforma de PDE4D7 humana se determinó según los tejidos de próstata humanos como se ha descrito anteriormente. Los niveles de expresión relativos se determinaron en cuatro tejidos de próstata definidos (“Normal”, “Lesión”, “Hiperplasia”, “Tumor”). Los niveles de expresión representados para los grupos “Lesión”, “Hiperplasia” y “Tumor” se calcularon como se ha perfilado anteriormente como un valor normalizado formando la relación de valores de C_T para cada tejido de paciente individual de los grupos “Lesión”, “Hiperplasia”, “Tumor” frente al valor de C_T mediano del grupo “Normal”. Lo mismo se realizó para cada tejido de paciente individual del grupo “Normal” de modo que el valor de expresión mediano para este grupo es 1.

Se realizó un ensayo de t de Student para ver si la expresión del gen de PDE4D7 humano está en promedio elevado significativamente en tejidos tumorales diferentes en comparación con tejido prostático normal. Los valores de p procedentes de diferentes comparaciones por pares fueron: ensayo de t de Benigno (Lesión + Hiperplasia) frente a Tumor; $p = 0,0035$; ensayo de T de Normal frente a Tumor: $p = 0,092$; ensayo de T de Hiperplasia frente a Tumor: $p = 0,040$; y ensayo de T de Lesión frente a Tumor: $p = 0,031$.

Como puede obtenerse a partir de las Figs. 9 y 10 y los valores de p indicados, podría detectarse una expresión diferente significativa para PDE4D7 humana para tejidos de próstata aberrantes (Lesión, Hiperplasia) en comparación con tejido de próstata maligno.

Análisis de Curva Operativa del Receptor (ROC) de la expresión de PDE4D7

Posteriormente, se realizó un análisis de Curva Operativa del Receptor (ROC) para determinar la ABC (Área bajo la Curva) para diferentes comparaciones por pares. Las curvas de Característica Operativa del Receptor de expresión del gen de PDE-4D7 para evaluar la potencia de diagnóstico se muestran en la Fig. 11. El análisis de ROC proporcionó pruebas de que la diferenciación entre tejido de próstata benigno y maligno basándose en los niveles de expresión de PDE4D7 es posible con una especificidad (Tasa de Falso Positivo) de $>80\%$ a niveles de sensibilidad (Tasa de Falso Negativo) de $\sim 80\%$.

El Índice de PDE de Próstata (PPI) – Expresión relativa de PDE4D7 humana en tejido de próstata humano normalizado frente a PDE4D5 humana para diferenciar eficazmente entre enfermedades de próstata benignas y malignas.

El nivel de expresión génica de las isoformas de PDE4D7 humana y PDE4D5 humana se determinó en tejidos prostáticos humanos como se ha descrito anteriormente. Los niveles de expresión relativos se determinaron en cuatro tejidos de próstata definidos ("Normal", "Lesión", "Hiperplasia", "Tumor"). El nivel de expresión relativo de PDE4D7 se calculó restando los valores de C_T individuales de PDE4D7 de los valores de C_T individuales para PDE4D5. Normalmente esto conduce a una distribución de los valores de expresión "Normales" alrededor de 0 (entre -2 y +2). Además, el valor de punto de corte óptimo entre muestras no tumorales ("Normal", "Lesión", "Hiperplasia") y de tumor ("Tumor") es entre -1 y +1.

Este enfoque permite provechosamente la comparación de valores de C_T de PDE4D7 frente a un control interno, concretamente PDE4D5. No es por lo tanto necesario normalizar muestras de grupos de pacientes clínicos relevantes frente a varias muestras normales que pueden no estar siempre disponibles en una situación de ensayo real. Este ensayo puede realizarse como un ensayo sencillo con PDE4D5 humana como un control de referencia interno para formar el Índice de PDE de Próstata que se define como $\Delta(C_T[PDE4D5 \text{ humana}] - C_T[PDE4D7 \text{ humana}])$.

El Índice de PDE de Próstata se realizó experimentalmente de modo que el punto de corte más óptimo para la diferenciación entre enfermedades malignas y benignas de próstata es entre -2 y +2, preferentemente 0 (cero). El valor de punto de corte de ensayo puede establecerse basándose en datos históricos medidos en muestras clínicas recogidas de forma retrospectiva. La interpretación del PPI es tal que cualquier valor positivo conduce a un mayor riesgo de presencia de un tumor maligno en un paciente, mientras que cualquier valor negativo conduce a un riesgo reducido de presencia de una neoplasia pero indica más bien la presencia de una lesión no maligna en la próstata.

Se realizó un ensayo de T de Student para determinar la significación estadística de la diferencia de los valores de expresión medios entre diferentes grupos de pacientes clínicos. El ensayo de T de Student indica que la probabilidad de que el valor medio de los grupos "Lesión + Hiperplasia" sea diferente por casualidad es $p=2,28E-11$. Para diferenciación entre los grupos "Normal" y "Tumor" $p=0,0003$.

Como puede obtenerse a partir de las Figs. 12 y 13 y los valores de p indicados, podría detectarse una expresión diferente muy significativa para PDE4D7 humana para tejidos prostáticos aberrantes (Lesión, Hiperplasia) en comparación con tejido de próstata maligno.

Análisis de Curva Operativa de Receptor (ROC) de la expresión de PDE4D7

Posteriormente, se realizó un análisis de Curva Operativa de Receptor (ROC) para determinar la ABC (Área Bajo la Curva) para diferentes comparaciones por pares. Las curvas de Características Operativas de Receptor de expresión del gen de PDE-4D7 para evaluar la potencia de diagnóstico se muestran en la Fig. 14. El análisis de ROC proporcionó pruebas de que la diferenciación entre tejido benigno y maligno de próstata basándose en el Índice de PDE de Próstata es posible con una especificidad (Tasa de Falso Positivo) de $>80\%$ a niveles de sensibilidad (Tasa de Falso Negativo) de $\sim 80\%$.

El Ensayo de Índice de PDE de Próstata – Ensayo de qPCR Múltiple de PDE4D5 humana y PDE4D7 humana

Para simplificar el procedimiento de ensayo para determinar el PPI de la expresión tanto de PDE4D5 como de PDE4D7 se desarrolló un ensayo múltiple para determinar los valores de C_T para ambos genes en una única reacción de qPCR.

Se usaron los mismos cebadores y sondas para PDE4D5 y PDE4D7 humanas que anteriormente, siendo el único cambio un marcador fluorescente diferente de la sonda para PDE4D5 humana. En particular, el colorante de FAM de la sonda se intercambió con un colorante Cy5 (con emisión máxima a 670 nm, frente a una emisión máxima a 518 nm de FAM) para poder medir ambos genes en un único ensayo de qPCR múltiple. Se obtuvieron cebadores de PDE4D5 y PDE4D7 de PrimerDesign, Reino Unido, y se suministraron con las sondas premezcladas.

Se descubrió que la relación de 1:1,5 de PDE4D5 : PDE4D7 actuaba de forma óptima para ensayos de cebadores/sondas premezclados. Los inventores añadieron en consecuencia 1 y 1,5 μ l de los ensayos de cebadores/sondas premezclados respectivamente a la mezcla de PCR total con un volumen de ensayo final de 30 μ l.

El procedimiento de PCR se realizó según las instrucciones del fabricante: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 15 s a 95 °C, 30 s a 50 °C registrando al mismo tiempo la fluorescencia (FAM y Cy5), 15 s a 72 °C y las últimas tres etapas se repitieron 50 veces.

Se realiza un ensayo de T de Student para determinar la significación estadística para la diferencia de los valores de expresión medios entre diferentes grupos de pacientes clínicos. El ensayo de T de Student indica que la probabilidad de que el valor medio de los grupos "Lesión + Hiperplasia" sea diferente por casualidad es $p=5,70E-11$.

Como puede obtenerse a partir de las Figs. 15 y 16 y los valores de p indicados, podría detectarse una expresión diferente muy significativa para PDE4D7 humana para tejidos de próstata aberrantes (Lesión, Hiperplasia) en comparación con tejido maligno de próstata basándose en la medición del ensayo múltiple para determinar el Índice de PDE de Próstata.

Análisis de Curva Operativa del Receptor (ROC) de expresión de PDE4D7

Posteriormente, se realizó un análisis de Curva Operativa de Receptor (ROC) para determinar la ABC (Área Bajo la Curva) para diferentes comparaciones por pares. Las curvas de Características Operativas del Receptor de la expresión del gen de PDE-4D7 para evaluar la potencia de diagnóstico se muestran en la Fig. 17. El análisis de ROC proporcionó pruebas de que la diferenciación entre tejido benigno y maligno de próstata basándose en el Índice de PDE de Próstata es posible con una especificidad (Tasa de Falso Positivo) de >80 % a niveles de sensibilidad (Tasa de Falso Negativo) de ~80 %.

Ejemplo 3 – El efecto de Rolipram en la proliferación de células de cáncer de próstata

Para el ensayo de Xcelligence se cultivaron células LNCaP a 37 °C, CO₂ 5 %, a partir de un valor de siembra de 5000 células. El volumen de siembra en placas final fue de 200 μ l. Se obtuvieron placas de 96 pocillos E-Plate de Roche (Cat. N.º 05232368001). Los datos de crecimiento se obtuvieron durante mediciones de impedancia eléctrica en tiempo real. Se realizaron mediciones 12 horas después de la fase de siembra en placas inicial del ensayo, es decir, 12 horas – 60 horas – para examinar el potencial proliferativo y no el cambio morfológico. Las células se ensayaron sin la presencia de andrógenos. La significación de las tasas de crecimiento diferencial se calcularon usando ensayo de T de Valores por Triplicado solamente. Como puede obtenerse a partir de la Fig. 18, la incubación de células de cáncer de próstata de LNCaP con 10 μ M del inhibidor selectivo de PDE4 Rolipram conduce a una supresión significativa ($p<0,01$) de la proliferación celular en medición en tiempo real del crecimiento celular. El nivel de inhibición promedio de la proliferación celular es de aproximadamente 50 %, lo que conduciría a una CI50 del compuesto de ~10 μ M. En comparación con una CI50 *in vitro* para 50 % de inhibición de PDE4 *in vitro* de ~2 μ M, una CI50 *in vivo* de 10 μ M permite a los inventores concluir que el efecto de inhibición de la proliferación se debe en gran medida a su actividad PDE4.

Para el ensayo de crecimiento de MTT se cultivaron células LNCaP a 37 °C, CO₂ 5 %, a partir de un valor de siembra de 5000 células. El volumen de siembra en placas final fue de 200 μ l. El ensayo de proliferación se obtuvo de Promega (Cat. N.º G3582). Los datos de crecimiento se obtuvieron durante mediciones de Abs A590. Las mediciones se realizaron 48 horas después de la siembra inicial en placas. Las células se ensayaron sin la presencia de andrógenos. La significación de las lecturas de A590 finales se calcularon usando solamente ensayo de T de Valores por Triplicado. Como puede obtenerse a partir de la Fig. 19, la incubación de células de cáncer de próstata LNCaP con 10 μ M del inhibidor selectivo de PDE4 Rolipram conduce a una supresión significativa ($p<0,01$) de la proliferación celular en una medición de puntos finales del crecimiento celular. El nivel de inhibición promedio de la proliferación celular es de aproximadamente 50 %, lo que conduciría a una CI50 del compuesto de ~10 μ M. En comparación con una CI50 *in vitro* para 50 % de inhibición de PDE4 *in vitro* de ~2 μ M, una CI50 *in vivo* de 10 μ M

permite a los inventores concluir que el efecto de inhibición de la proliferación se debe en gran medida a su actividad PDE4.

La solicitud comprende los siguientes artículos adicionales:

Artículo 1: Fosfodiesterasa 4D7 (PDE4D7) para su uso como un marcador para cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde la expresión del marcador está aumentada cuando se compara la expresión en tejido de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas con la expresión en tejido normal o tejido de tumor benigno de próstata.

Artículo 2: Una composición para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o un ligando de afinidad peptídico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7.

Artículo 3: La composición del artículo 2, en donde dicho ligando de afinidad de ácido nucleico o ligando de afinidad peptídico se modifica para actuar como un agente de contraste.

Artículo 4: La composición del artículo 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 PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

Artículo 5: Uso de PDE4D7 como un marcador para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

Artículo 6: Un método para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra.

Artículo 7: El método del artículo 6, en donde la etapa de determinación se realiza mediante la medición de niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7.

Artículo 8: El método del artículo 7, en donde dicho método comprende la etapa adicional de comparar los niveles de ácido nucleico o proteína medidos o la actividad biológica medida con un nivel de control.

Artículo 9: Un método para diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas en donde dicho método diferencia entre un cáncer benigno y uno maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende las etapas de

- (a) determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra mediante la medición del nivel o niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7;
- (b) determinar el nivel de expresión de un gen constitutivo en una muestra mediante la medición del nivel o niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de un gen constitutivo, preferentemente GAPDH;
- (c) normalizar el nivel o niveles de ácido nucleico o proteína medidos o la actividad biológica medida de PDE4D7 con respecto a la expresión del gen constitutivo, preferentemente GAPDH; y
- (d) comparar el nivel de expresión normalizado con un valor de punto de corte predeterminado, en donde dicho valor de punto de corte es de entre aproximadamente 0,1 y 100, preferentemente aproximadamente 4,7, elegido para excluir el tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

Artículo 10: Un método de adquisición de datos para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- (a) ensayar en un individuo para determinar la expresión de PDE4D7; y
- (b) comparar la expresión como se ha determinado en la etapa (a) con un nivel de control.

Artículo 11: El uso del artículo 2 o el método de uno cualquiera de los artículos 6 a 10, en donde el diagnóstico, la detección, la supervisión, el pronóstico o la adquisición de datos van a llevarse a cabo en una muestra obtenida de un individuo.

Artículo 12: Un inmunoensayo para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos las etapas de:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7,
- (b) ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7,
- (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de las etapas (a) y (b); y
- (d) decidir acerca de la presencia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c),

en donde dichas etapas de ensayo se basan en el uso de un anticuerpo que se une específicamente con PDE4D7.

Artículo 13: El uso o método del artículo 11 o el inmunoensayo del artículo 12, en donde dicha muestra es una muestra tisular, una muestra de biopsia, 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 en circulación.

Artículo 14: Una composición farmacéutica que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:

- (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7;
- (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7;
- (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
- (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7;
- (e) un miARN específico para PDE4D7;
- (f) una molécula antisentido de PDE4D7;
- (g) un ARNip específico para PDE4D7;
- (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7;
- (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y
- (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

Artículo 15: Una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:

- (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7;
- (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7;
- (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
- (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7;
- (e) un miARN específico para PDE4D7;
- (f) una molécula antisentido de PDE4D7;
- (g) un ARNip específico para PDE4D7;
- (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7;
- (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y
- (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

Artículo 16: Uso de

- (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7;
- (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7;
- (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
- (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7;
- (e) un miARN específico para PDE4D7;
- (f) una molécula antisentido de PDE4D7;
- (g) un ARNip específico para PDE4D7;
- (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7;
- (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y/o

(j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7,

5 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

10 Artículo 17: Uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

15 Artículo 18: La fosfodiesterasa del artículo 1, la composición de uno cualquiera de los artículos 2 a 4, el uso del artículo 5, 11 o 13, el método de uno cualquiera de los artículos 6 a 11 o 13, el inmunoensayo del artículo 12 o 13, la composición farmacéutica del artículo 14 o 15, o el uso del artículo 16 o 17, en donde dicho cáncer maligno de próstata sensible a hormonas es un cáncer de próstata de estadio I – IV sensible a hormonas, un cáncer de próstata recurrente sensible a hormonas o un cáncer de próstata metastásico sensible a hormonas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en un método para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar *in vivo* cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar *in vivo* la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o un ligando de afinidad peptídico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7.
2. El uso *in vitro* o *ex vivo* de una composición que comprende un ligando de afinidad de ácido nucleico y/o un ligando de afinidad peptídico para el producto de expresión o la proteína de PDE4D7 para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.
3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde dicho ligando de afinidad de ácido nucleico o ligando de afinidad peptídico se modifica para actuar como un agente de contraste.
4. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 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 PDE4D7, un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.
5. Uso de PDE4D7 como un marcador para un diagnóstico, una detección, una supervisión o un pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para un diagnóstico, una detección, una supervisión o un pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.
6. Un método *in vitro* o *ex vivo* para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos la etapa de determinar el nivel de PDE4D7 en una muestra.
7. Un método *in vitro* o *ex vivo* para diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho método diferencia entre un tumor benigno de próstata y un cáncer maligno de próstata sensible 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 punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre aproximadamente -2 y +2, preferentemente aproximadamente 0.
8. Un método *in vitro* o *ex vivo* de adquisición de datos para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para diagnosticar, detectar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende al menos las etapas de:
 - (a) ensayar en un individuo para determinar la expresión de PDE4D7; y
 - (b) comparar la expresión como se ha determinado en la etapa (a) con un nivel de control.
9. Un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar cáncer maligno de próstata sensible a hormonas o para detectar, diagnosticar, supervisar o pronosticar la progresión hacia cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende al menos las etapas de:
 - (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7,
 - (b) ensayar en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7,
 - (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de las etapas (a) y (b); y
 - (d) decidir acerca de la presencia o el estadio del cáncer o la progresión del cáncer basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c),
- en donde dichas etapas de ensayo se basan en el uso de un anticuerpo que se une específicamente con PDE4D7.
10. Un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para diferenciar entre un tumor benigno de próstata y un cáncer maligno de próstata sensible 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 punto de corte predeterminado elegido para excluir tumor benigno de próstata, en donde un nivel de expresión normalizado por encima del valor de punto de corte es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, en donde dicho valor de punto de corte está entre aproximadamente -2 y +2, preferentemente aproximadamente 0.

11. Un método *in vitro* o *ex vivo* para identificar a un individuo para determinar su elegibilidad para terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas, que comprende:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
- (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7;
- (c) clasificar los niveles de expresión de la etapa (a) en relación con los niveles en la etapa (b); y
- (d) identificar al individuo como elegible para recibir una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas donde la muestra del individuo se clasifica como poseedora de un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

12. Un inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* para estratificar a un individuo o una cohorte de individuos con una enfermedad de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende:

- (a) ensayar en una muestra obtenida de un individuo para determinar la expresión de PDE4D7;
- (b) ensayar en dicha muestra para determinar la expresión de un gen de referencia y/o en una muestra de control para determinar la expresión de PDE4D7;
- (c) determinar la diferencia en la expresión de PDE4D7 de las etapas (a) y la expresión de PDE4D7 y/o el gen de referencia en la etapa (b); y
- (d) estratificar a un individuo o una cohorte de individuos para una terapia de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas basándose en los resultados obtenidos en la etapa (c), donde la muestra del individuo tiene un nivel aumentado de expresión de PDE4D7.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 u 11, o el inmunoensayo de la reivindicación 10 o 12, en donde dicho ensayo o determinación de la expresión se realiza, o se realiza adicionalmente, mediante la medición de niveles de ácido nucleico o proteína o mediante la determinación de la actividad biológica de PDE4D7 o del gen de referencia.

14. El método o inmunoensayo de la reivindicación 13, en donde dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de comparar los niveles de ácido nucleico o proteína medidos o la actividad biológica medida con un nivel de control.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 11, 13 o 14, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12, 13 o 14, en donde dicho gen de referencia es una fosfodiesterasa diferente, preferentemente PDE4D5, o un gen constitutivo, preferentemente GAPDH o PBGD.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 11, 13 o 14, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 10, 12, 13 o 14, en donde dicho método o inmunoensayo comprende la etapa adicional de determinar el nivel de antígeno específico de próstata (PSA).

17. El método o inmunoensayo de la reivindicación 16, en donde un nivel de PSA de 2,5 a 4 ng/ml es indicativo de un cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 11 o 13 a 17, o el inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, o 12 a 17, en donde dicha muestra es una muestra tisular, una muestra de biopsia, 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 en circulación, o una muestra que contiene exosomas secretados de próstata.

19. Una composición farmacéutica inhibidora para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:

- (a) un compuesto que inhibe directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un antagonista de la actividad enzimática de PDE4D7;
- (b) un compuesto que inhibe indirectamente la actividad de PDE4D7;
- (c) una forma negativa dominante de la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
- (d) un ácido nucleico que codifica y expresa una forma negativa dominante de PDE4D7;
- (e) un miARN específico para PDE4D7;
- (f) una molécula antisentido de PDE4D7;
- (g) un ARNip específico para PDE4D7;

- (h) un aptámero específico para el producto de expresión de PDE4D7 o para la proteína PDE4D7;
- (i) una molécula pequeña o un peptidomimético capaz de unirse específicamente con la proteína PDE4D7; y
- (j) un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7.

5 20. Una composición farmacéutica estimulante para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata que comprende al menos un elemento seleccionado del grupo de:

- 10 (a) un compuesto que estimula o modula directamente la actividad de PDE4D7, preferentemente un agonista alostérico de la actividad enzimática de PDE4D7;
- (b) un compuesto que estimula o modula indirectamente la actividad de PDE4D7;
- (c) la proteína PDE4D7 o un equivalente biológicamente activo de la misma;
- (d) un ácido nucleico que codifica y expresa PDE4D7;
- 15 (e) un inhibidor de miARN específico para miARN de PDE4D7;
- (f) un agente de desmetilación de PDE4D7; y
- (g) un factor de desplazamiento de fosfodiesterasa PDE4D7.

20 21. La composición farmacéutica inhibidora para el uso de la reivindicación 19 o la composición farmacéutica estimulante para el uso de la reivindicación 20, en donde dicha composición farmacéutica inhibidora o estimulante va a usarse para el tratamiento de cáncer de próstata dependiendo del nivel de expresión de PDE4D7, en donde dicho nivel de expresión se determina y/o supervisa según las etapas (a) a (c) de la reivindicación 7.

25 22. La composición farmacéutica estimulante para el uso de la reivindicación 21, en donde para niveles aumentados y/o crecientes de PDE4D7 va a administrarse dicha composición farmacéutica inhibidora y para niveles reducidos y/o decrecientes de PDE4D7 va a administrarse dicha composición farmacéutica estimulante.

30 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 o 13 a 18, o el inmunoensayo de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en donde la terapia de cáncer de próstata comprende la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 19, o la administración de la composición farmacéutica de la reivindicación 18 en combinación con una terapia de cáncer adicional, preferentemente radioterapia o quimioterapia.

35 24. Uso de un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para una detección, un diagnóstico, una supervisión o un pronóstico *in vitro* o *ex vivo* de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

25 25. Un anticuerpo específico para la proteína PDE4D7 y/o una variante de anticuerpo específica para la proteína PDE4D7 para su uso en un método de tratamiento de cáncer maligno de próstata sensible a hormonas.

40 26. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, el método *in vitro* o *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 11, 13 a 18 o 23, el inmunoensayo *in vitro* o *ex vivo* de cualquiera de las reivindicaciones 9, 10, 12 a 18 o 23, la composición farmacéutica inhibidora para el uso de la reivindicación 19, el uso de la reivindicación 24 o el anticuerpo para el uso de la reivindicación 25, en donde dicho cáncer maligno de próstata sensible a hormonas es un cáncer de próstata de estadio I – IV sensible a hormonas, un cáncer de próstata recurrente sensible a hormonas o un cáncer de próstata metastásico sensible a hormonas.

45

FIGURA 1 A

edad	sexo	tejido	apariciencia	diagnóstico	grado tumoral	tnm	estadio	verificación
67	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpNXpMX	II	Dentro de los límites normales
68	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT3apN0pMX	III	Dentro de los límites normales
53	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2bpN0pMX	II	Dentro de los límites normales
65	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2apN0pMX	II	Dentro de los límites normales
48	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2apNXpMX	II	Dentro de los límites normales
68	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2apNXpMX	II	Dentro de los límites normales
76	Hombre	Próstata / Próstata	Normal	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT3apN0pMX	III	Dentro de los límites normales
60	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT1apN0pMX		Hiperplasia de próstata
70	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Carcinoma de vejiga, célula transitional	AJCC G3: poco diferenciado	pT1pNQpMX		Hiperplasia de próstata
74	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
66	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT2cpNXpMX	II	Prostatitis, crónica
72	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2apN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
63	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpNXpMX	II	Prostatitis
55	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
70	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
68	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
66	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 2+2=4/10	pT2apNXpMX	II	Prostatitis, aguda
76	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	No indicado	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
71	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
56	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2bpNXpMX	II	Hiperplasia de próstata
61	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT2cpN0pMX	II	Hiperplasia de próstata
63	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpNXpMX	II	Adenocarcinoma de próstata
70	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2cpNXpMX	II	Adenocarcinoma de próstata
68	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2cpN0pMX	II	Adenocarcinoma de próstata
61	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+3=6/10	pT2cpNXpMX	II	Adenocarcinoma de próstata
59	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+5=9/10	pT2cpN0pMX	II	Adenocarcinoma de próstata
61	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2bpN0pMX	II	Adenocarcinoma de próstata

FIGURA 1 B

63	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT2cpNXpMX	II	Adenocarcinoma de próstata
53	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT3apN0pMX	III	Hiperplasia de próstata, nodular
66	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+5=8/10	pT3apNXpMX	III	Hiperplasia de próstata
61	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+3=7/10	pT3bpNXpMX	III	Hiperplasia de próstata
65	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	pT3bpN0pMX	III	Prostatitis, crónica
64	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 3+4=7/10	pT3apNXpMX	III	Hiperplasia de próstata
48	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+5=9/10	pT3bpN0pMX	III	Adenocarcinoma de próstata
65	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	pT3apN0pMX	III	Adenocarcinoma de próstata
61	Hombre	Próstata / Próstata	Tumor	Adenocarcinoma de próstata	Puntuación de Gleason: 4+4=8/10	pT3apN1pMX	III	Adenocarcinoma de próstata
51	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Carcinoma de vejiga, urotelial	AJCC G4: indiferenciado	pT4bpN0pMX	IV	Hiperplasia de próstata
76	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia adenomatosa de próstata, atípica		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
62	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
72	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
71	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
76	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia glandular de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia glandular de próstata
71	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
76	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
76	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
56	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
85	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Adenoma de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata
72	Hombre	Próstata / Próstata	Lesión	Hiperplasia de próstata		No indicado	BHP	Hiperplasia de próstata

FIGURA 2

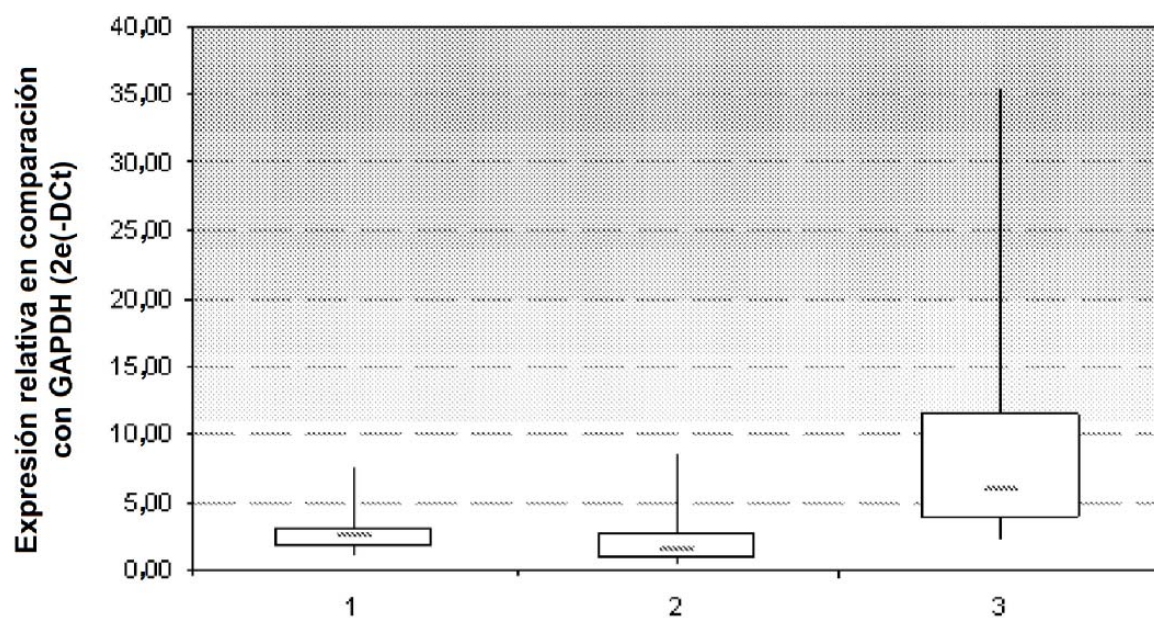


FIGURA 3

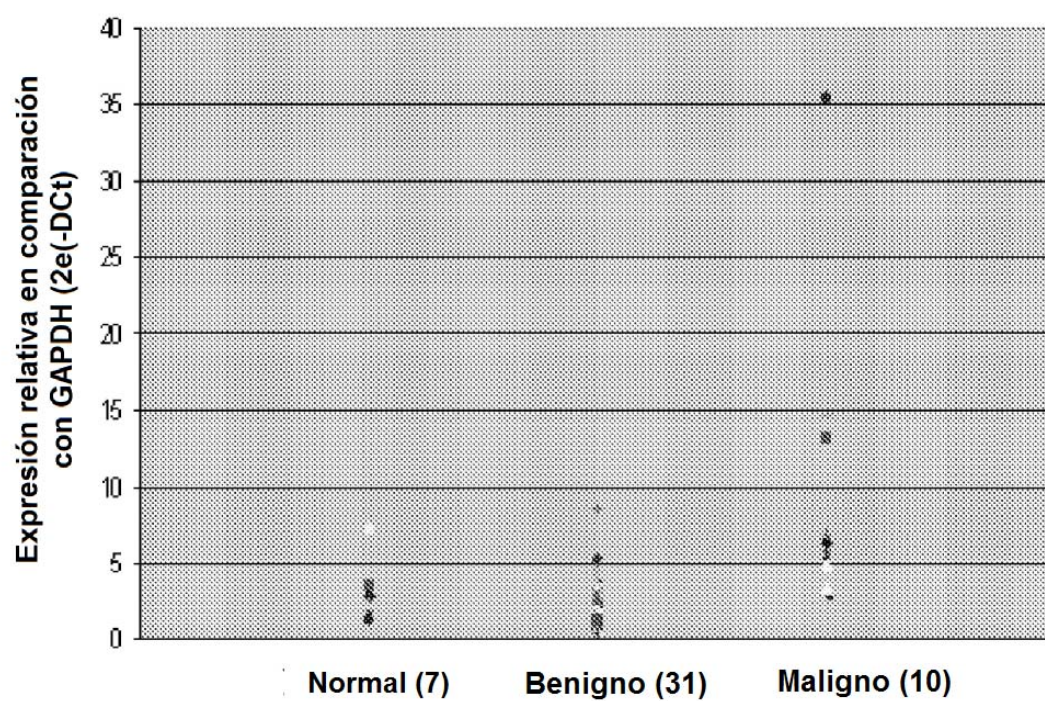


FIGURA 4

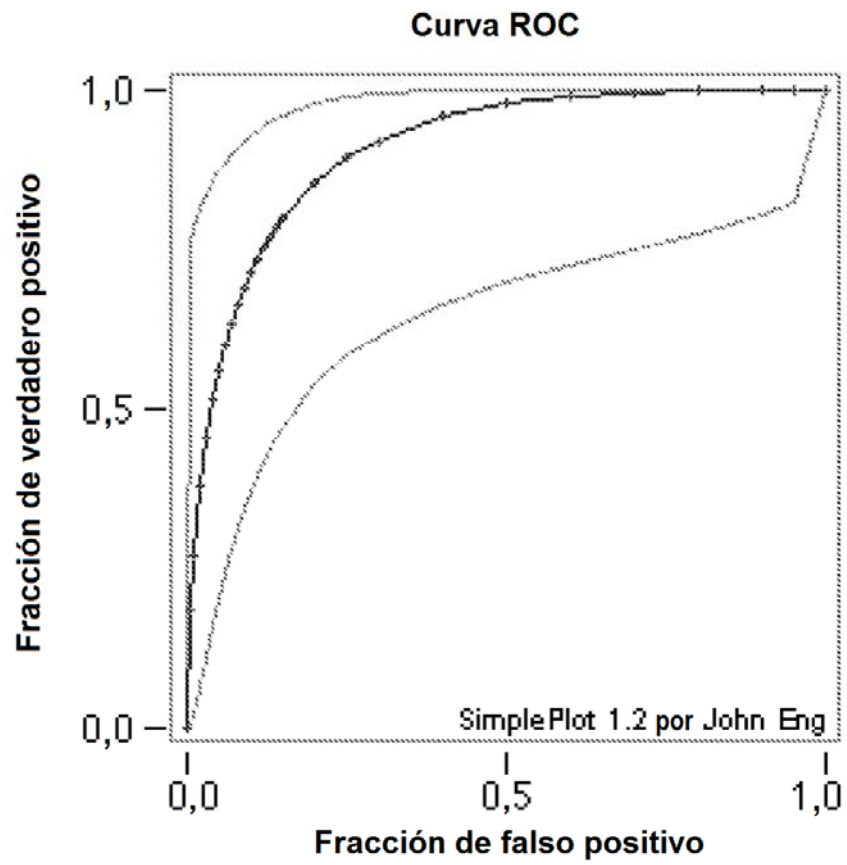


FIGURA 5

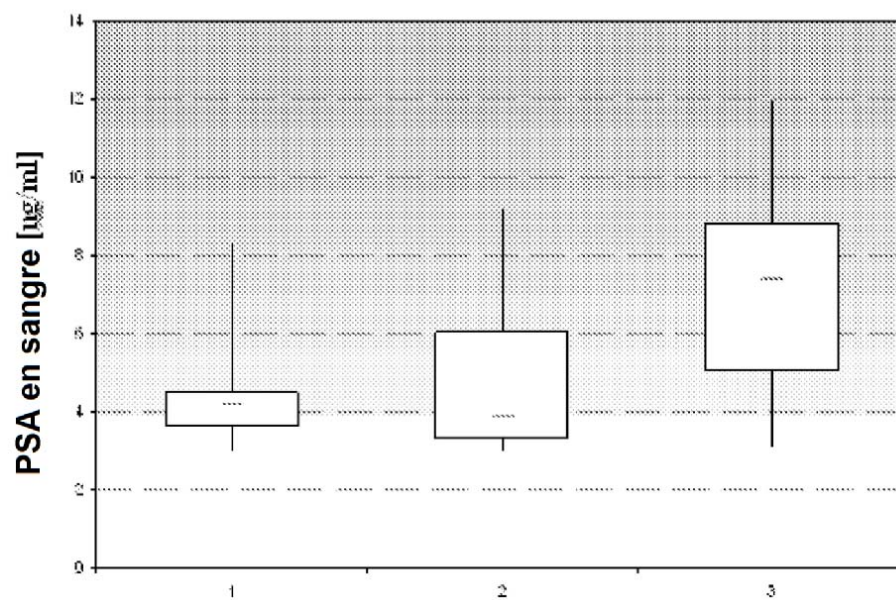


FIGURA 6

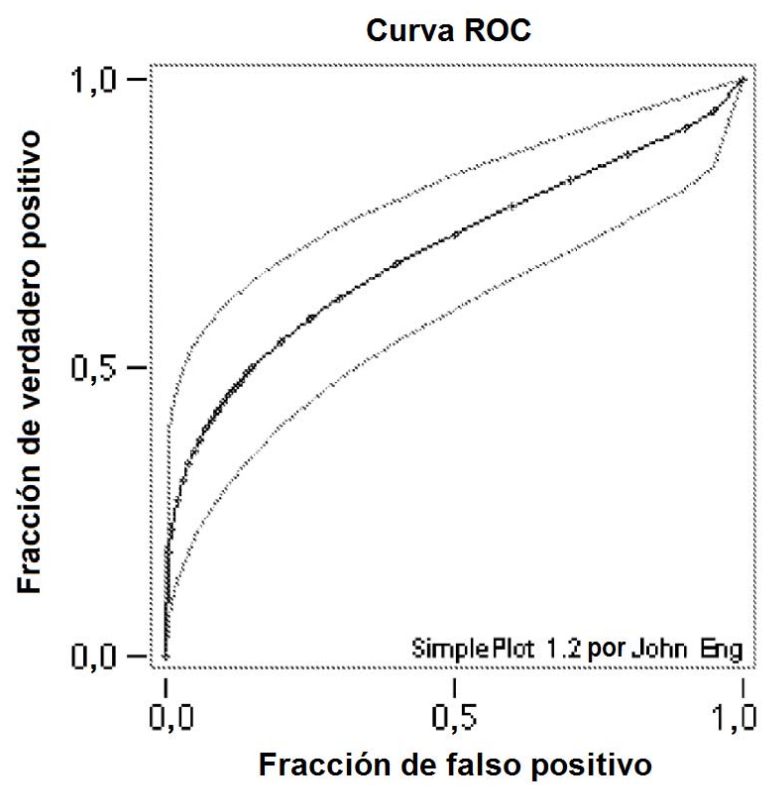


FIGURA 7

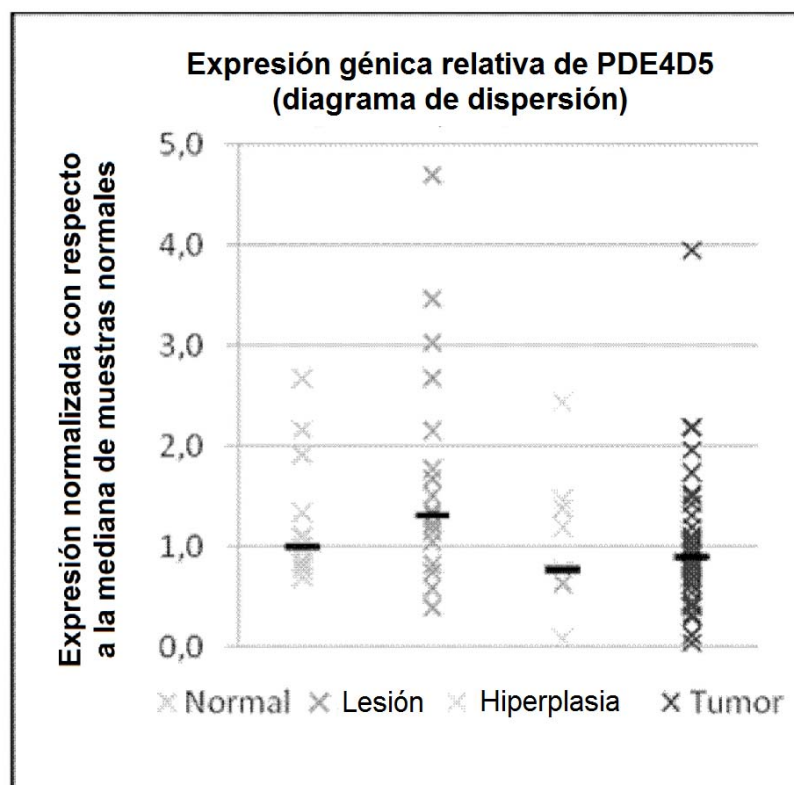


FIGURA 8

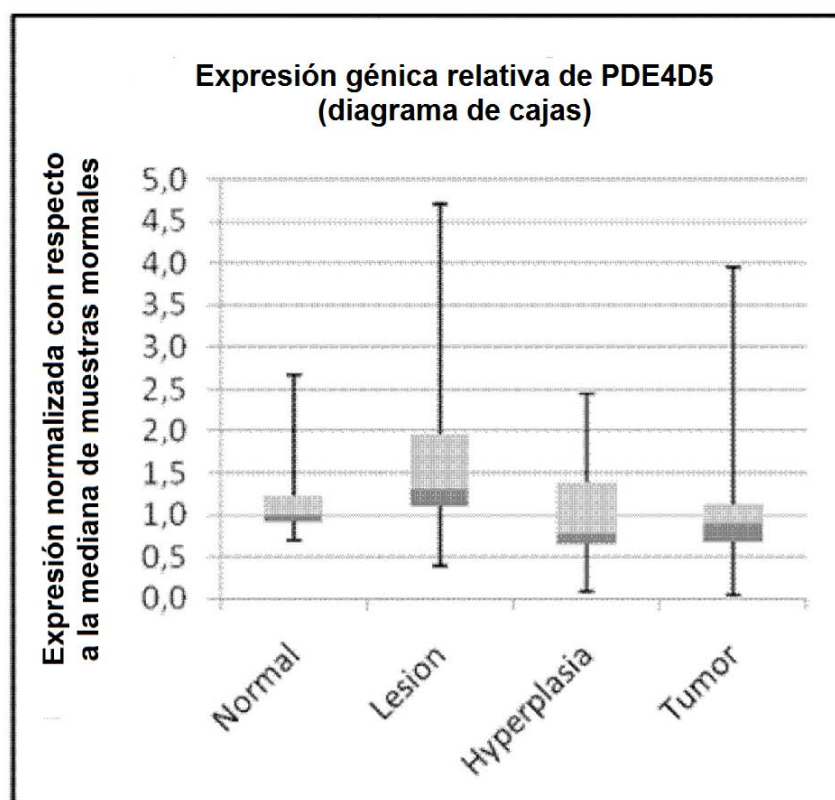


FIGURA 9

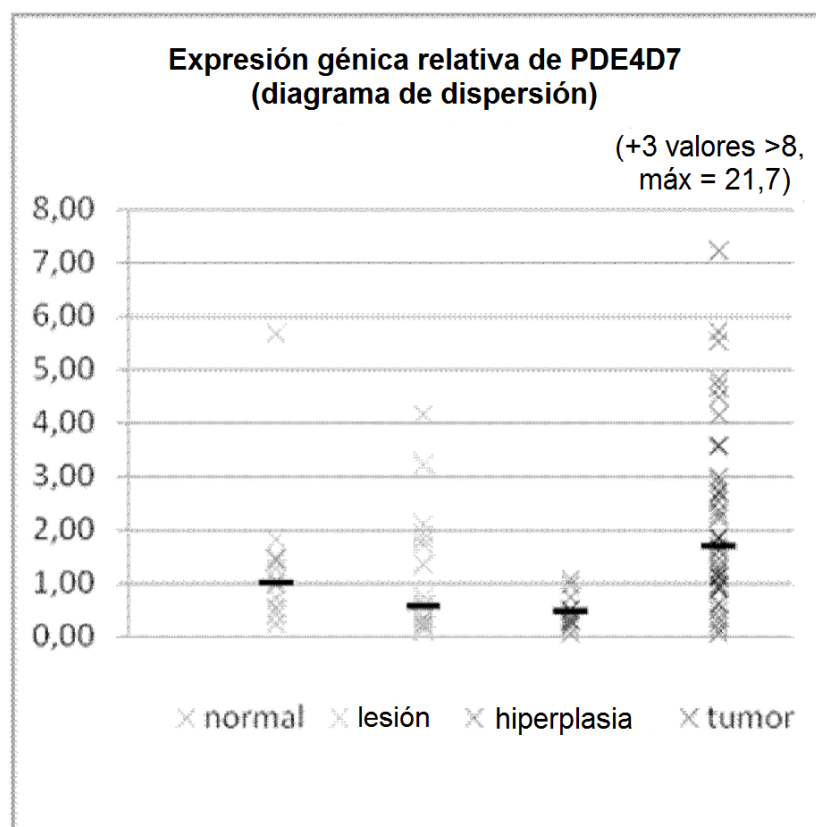


FIGURA 10

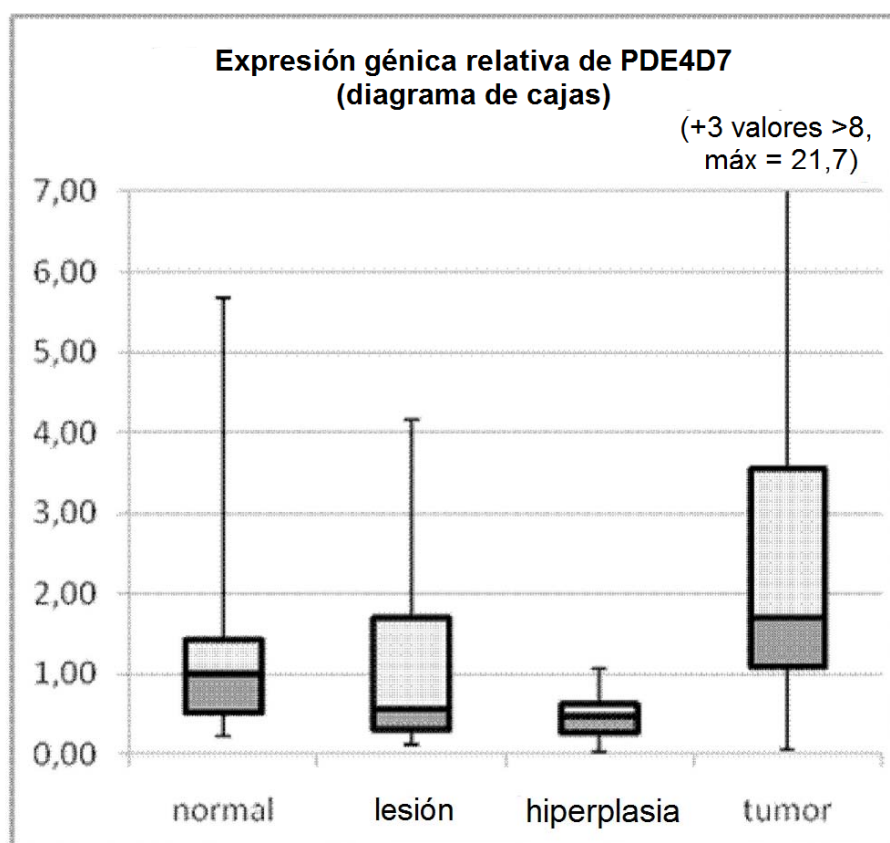


FIGURA 11

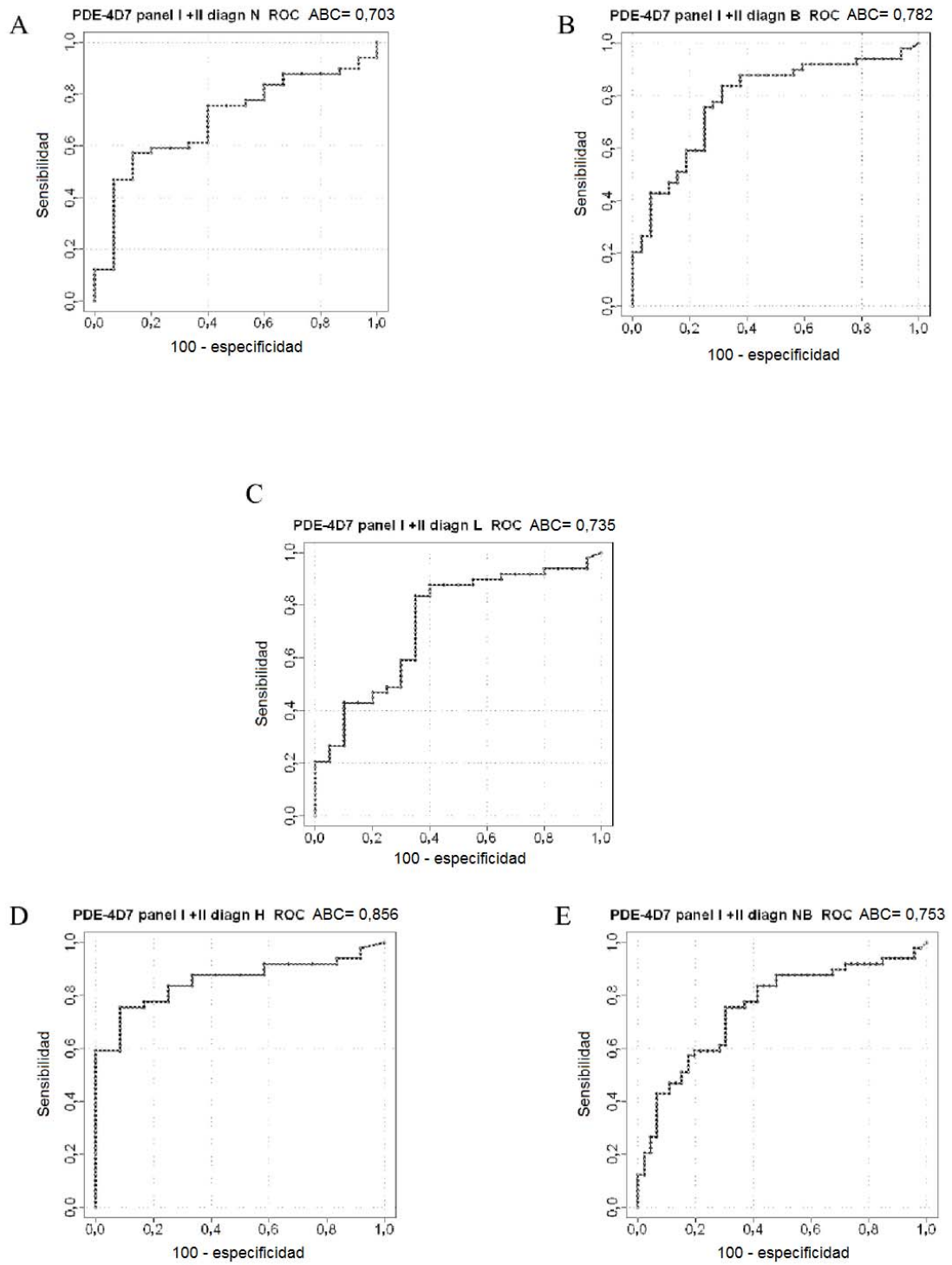


FIGURA 12

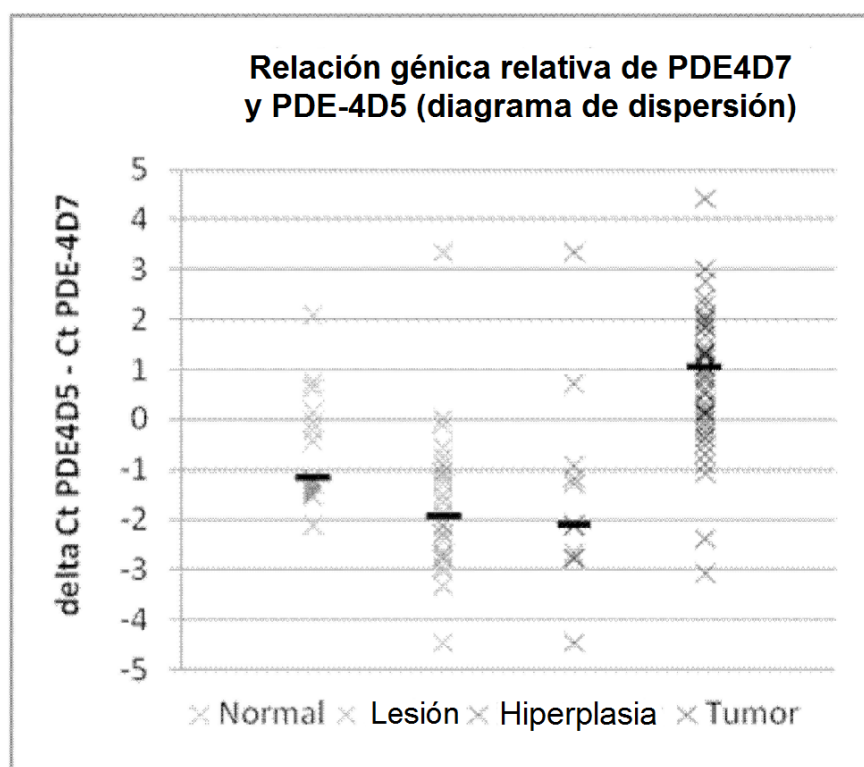


FIGURA 13

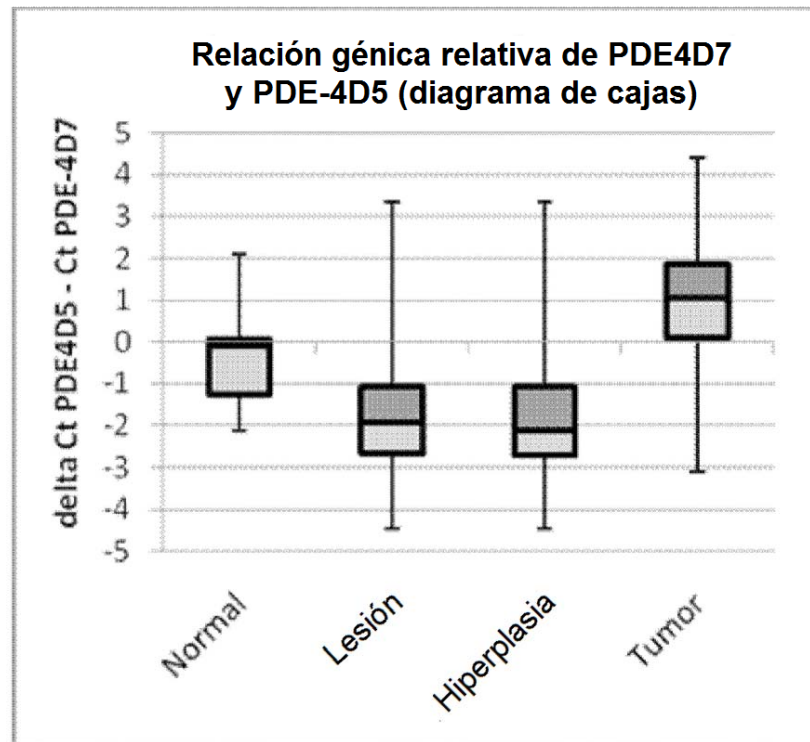


FIGURA 14

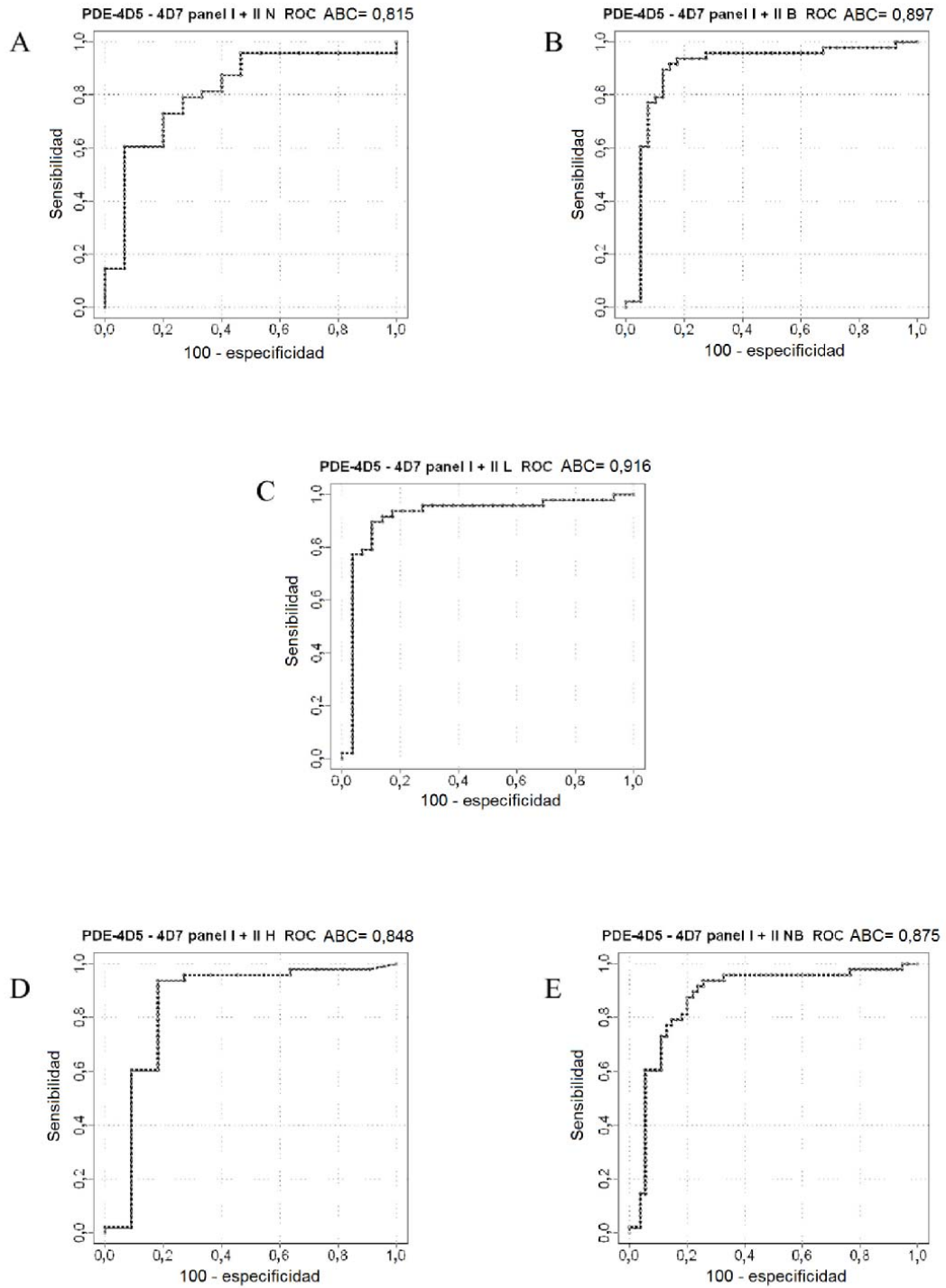


FIGURA 15

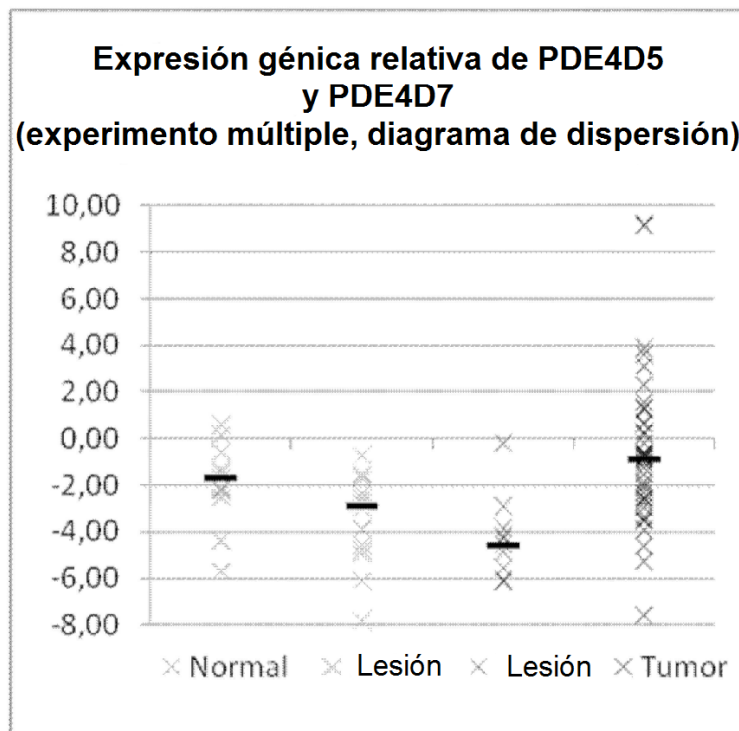


FIGURA 16

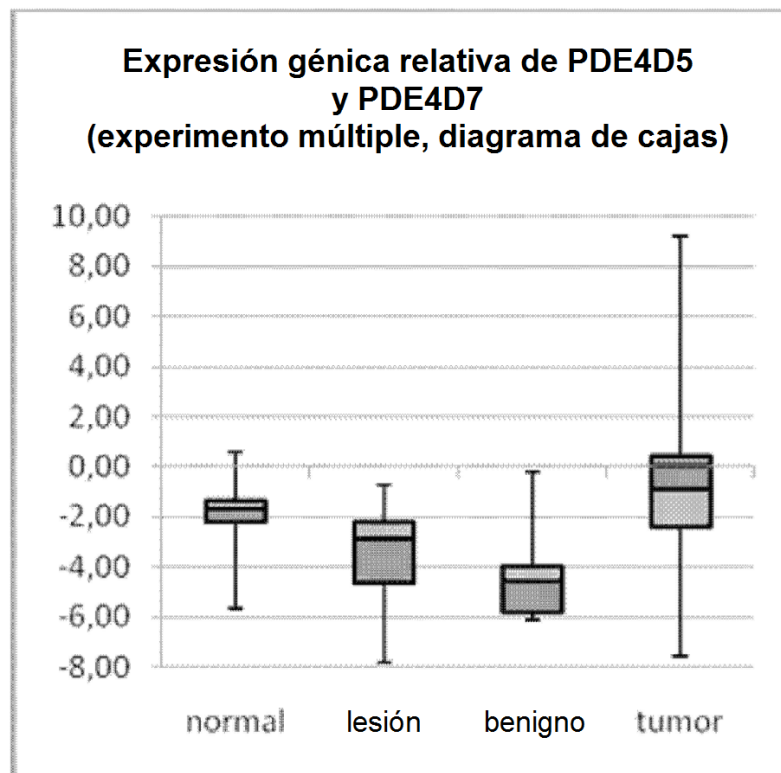


FIGURA 17

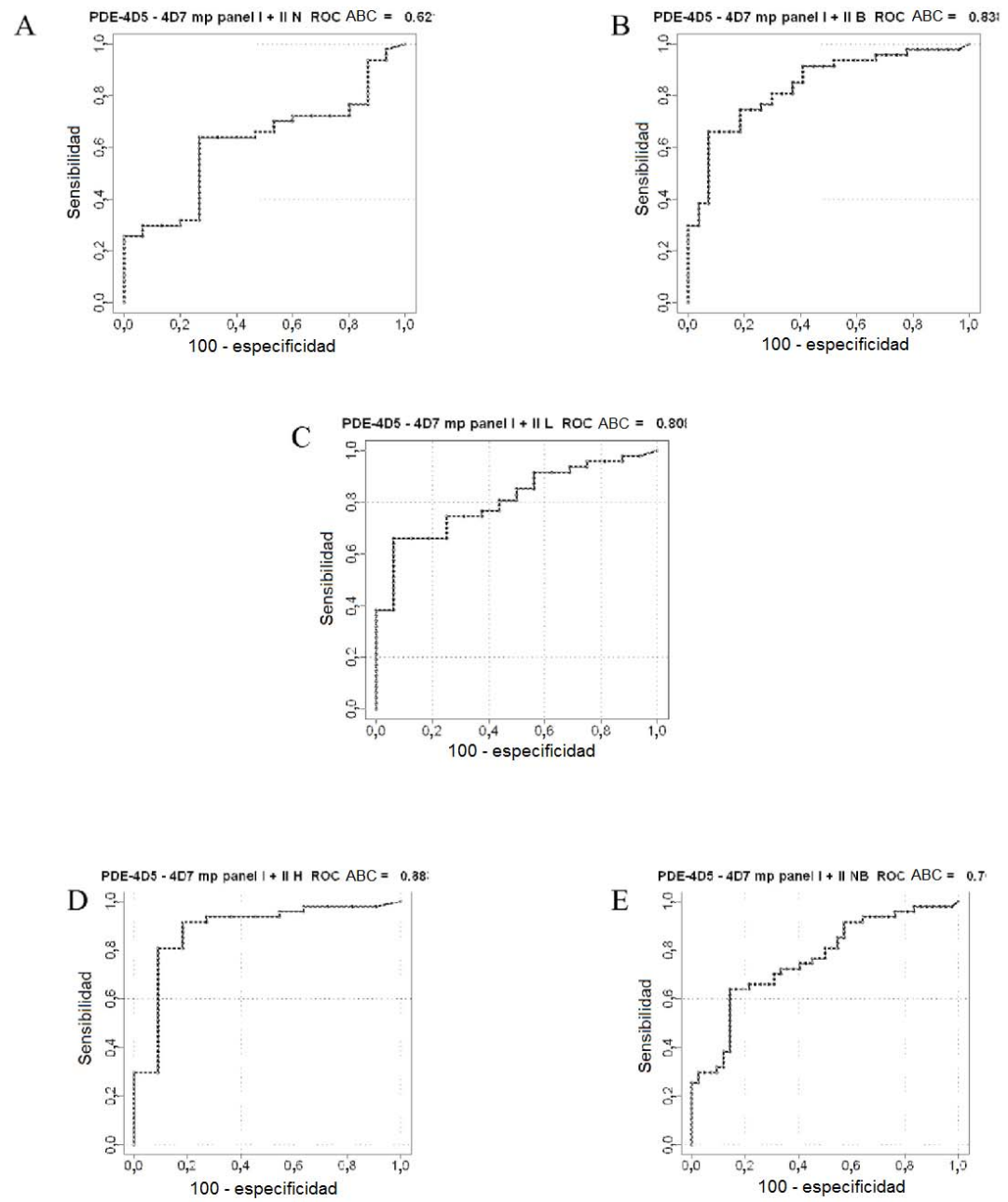


FIGURA 18

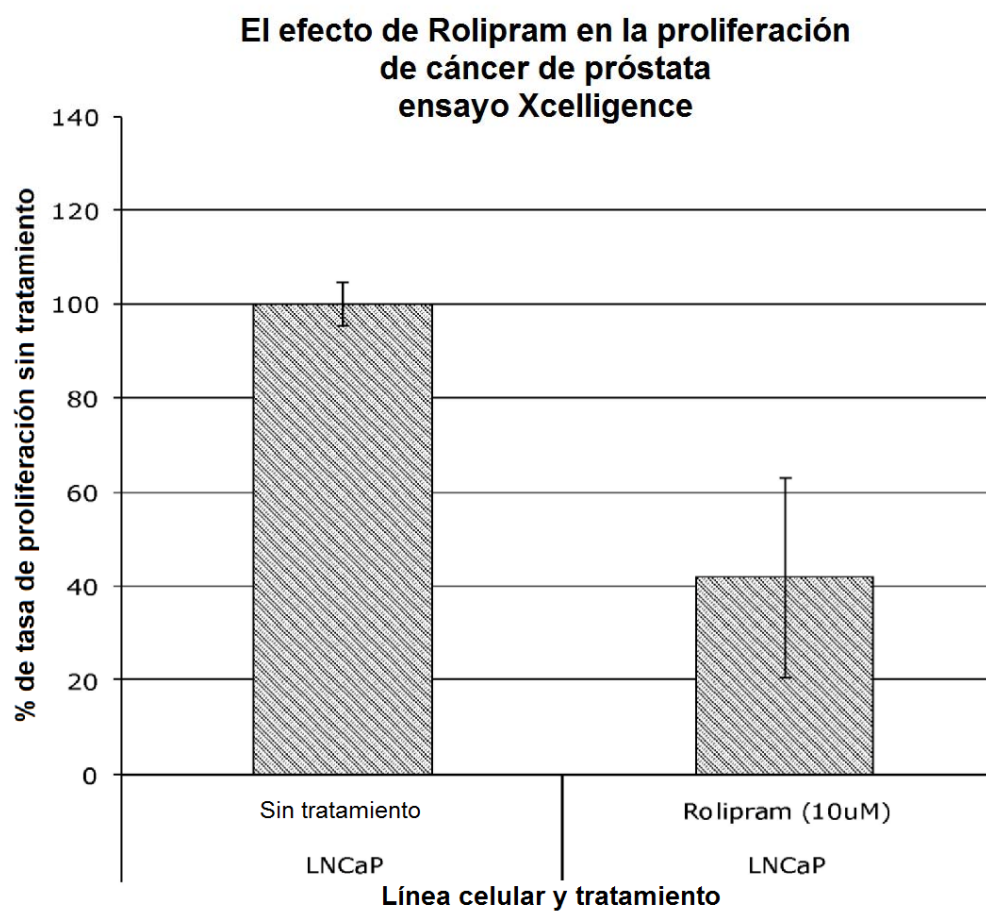


FIGURA 19

