

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 477**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2015 PCT/US2015/038761**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16004165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2015 E 15739712 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3164504**

54 Título: **Materiales y métodos para evaluar la progresión del cáncer de próstata**

30 Prioridad:

03.07.2014 US 201462020990 P

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

31.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, YING;
PESTOVA, EKATERINA;
DU, JING;
LIU, PING y
COLPITTS, TRACEY**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 721 477 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para evaluar la progresión del cáncer de próstata

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con n.º 62/020.990, presentada el 3 de julio de 2014.

10 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a métodos para evaluar la progresión del cáncer de próstata así como a conjuntos de sondas y kits útiles en dichos métodos.

15 **Antecedentes**

El cáncer de próstata es el tumor maligno más común en los hombres, y, después del cáncer de pulmón, la segunda causa principal de muerte en los hombres. Se estimaron 241.740 nuevos casos en 2012 dando como resultado 28.170 muertes (www.cancer.gov). La mayoría de tumores están limitados a la próstata y la mayoría de pacientes desarrollan cáncer de próstata clínicamente insignificante, mientras que otros pacientes desarrollan una enfermedad diseminada que es rápidamente mortal.

Actualmente, aproximadamente el 30 % del cáncer de próstata recurre después de una prostatectomía radical (PR). La identificación de pacientes con un alto riesgo de recurrencia es un desafío. La historia natural del carcinoma de próstata es extremadamente variable y más bien impredecible por los métodos existentes (por ejemplo, la puntuación de Gleason). Existe una necesidad de predictores eficaces de recurrencia del tumor después de la cirugía para determinar si un paciente debería tratarse inmediatamente con terapia adyuvante. Los pacientes con tumores que no son biológicamente malignos no se beneficiarán de dicha intervención médica. Lo anterior, junto con la morbilidad significativa asociada con la PR para una enfermedad aparentemente localizada, y el alto coste de la PR, subrayan la importancia de descubrir marcadores moleculares para predecir el comportamiento de los carcinomas individuales.

Se han divulgado varios marcadores y métodos. Por ejemplo, se ha divulgado que la medición del nivel de amplificación del gen HER-2/neu mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es un método para determinar la gravedad del cáncer de próstata (publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 1998/045479; "la solicitud '479"). De acuerdo con el método de la solicitud '479, un paciente que tiene cinco o más copias de Her-2/neu se trata de manera agresiva.

El documento WO2013101612 divulga un método para detectar el cáncer de próstata que comprende poner en contacto una muestra de células de la próstata del paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable en condiciones de hibridación y determinar la presencia de anomalías cromosómicas en el tejido del tumor de próstata, PIN (neoplasia intraepitelial), tejido histológicamente benigno e hiperplasia prostática benigna (BPH); un método para combinar la inmunofluorescencia y FISH (IF-FISH) para facilitar la evaluación de anomalías cromosómicas.

Se ha divulgado que la determinación de la presencia de un segmento de banda cromosómica amplificada 8q24.1 - 24.2 es un método para diagnosticar la progresión del cáncer de próstata (patente de EE. UU. n. 5.658.730). Se ha divulgado que la determinación de la pérdida del locus 8p21-22, una ganancia del cromosoma 8 y un aumento adicional del número de copias de c-myc en relación con el número de copias del centrómero es un método para pronosticar el cáncer de próstata (patente de EE. UU. n.º 6.613.510). Una ganancia de 8q24 (c-myc) y una pérdida de heterocigosidad (LOH) de 8p21-22 (Bova et al., Cancer Res. 53: 3869-3873 (1993); y Kagan et al., Oncogene 11: 2121-2126 (1995); véase, también, Emmert-Buck et al., Cancer Res. 55: 2959-2962 (1995), con respecto a la pérdida alélica para 8p12-21) y 10q23 (PTEN) (Yoshimoto et al., Br. J. Cancer 97(5): 678-685 (3 de septiembre de 2007; publicación-e 14 de agosto de 2007) se han divulgado también. Se ha divulgado que la prueba de la pérdida de heterocigosidad en uno o más loci en uno o más de los cromosomas 1-22 es un método para detectar una célula con fenotipo neoplásico o preneoplásico (publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0165895; "la solicitud '895"). Los métodos de la solicitud '895 se divulgan como aplicables para la detección de cambios genéticos relacionados con la progresión de varios cánceres. El análisis de 20P1F12/TMPRSS2, tal como en un método para identificar la evidencia de un neoplasma, se ha divulgado como útil para la evaluación del cáncer de próstata (patente de EE. UU. n.º 7.037.667). La detección de una fusión entre una porción 5' de TMPRSS2 y una porción 3' de ERG, ETV1, ETV4 o FLI1 y la presencia de una molécula de ácido nucleico PCA3 se ha divulgado como otro método para identificar o caracterizar el cáncer de próstata (patente de EE. UU. n.º 8.580.509; véanse, también, las patentes de EE. UU. n.º 8.211.645 y 7.718.369 y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0295809). Un método para predecir la recurrencia, progresión y potencial metastásico del cáncer de próstata que comprende detectar tres o más biomarcadores seleccionados de FOXO1A, SOX9, CLNS1A, PTGDS, XPO1, LETMD1, RAD23B, ABCC3, APC, CHES1, EDNRA, FRZB, HSPG2 y TMPRSS:ETV1 se divulga en la publicación de

la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0230361 y la publicación de patente internacional n.º WO 2010/056993. Se ha divulgado la detección de pacientes con cáncer de próstata con activación de ERG o translocación de ERG para evaluar la capacidad de respuesta a una terapia anti-ERG en la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2008/023087. Se ha informado que la detección de fusiones TMPRSS2:ERG, sus duplicaciones y deleciones intersticiales 5' a ERG, junto con la puntuación de Gleason y el nivel de PSA, permiten la estratificación de pacientes con cáncer de próstata (Attard et al., *Oncogene* 27(3): 253-263 (enero de 2008); publicación-e. 16 de julio de 2007). La detección de la sobreexpresión de ERG, así como la fusión de una porción 3' de ERG con una porción 5' de un gen regulado por andrógenos, como TMPRSS2, NDRG1, SLC45A3 o PSA, se ha divulgado para el diagnóstico en fase temprana del cáncer de próstata (publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0220672; véase, también, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0039889 en fusiones re ERG:NDRG1). El uso de las fusiones HERPUD1:ERG y AX747630:ETV1 en la identificación del cáncer de próstata en un paciente se ha divulgado en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0015839 (véanse, también, las publicaciones de las solicitudes de patentes n.º 2009/0239221 y 2009/0208937 para el uso de otras fusiones de los genes ERG y ETV1). El uso de MIPOL1:ETV1 para detectar el cáncer de próstata se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0028336, mientras que el uso de ACSL3:ETS, tal como ACSL3:ETV1, para diagnosticar a un paciente que tiene cáncer de próstata, que tiene un cáncer de próstata agresivo o que es propenso a desarrollar cáncer de próstata y para evaluar si un tumor de próstata en un paciente es adecuado para la terapia antiandrogénica se divulga en la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2009/0144460 ("la solicitud '460"). Se divulga también en la solicitud '460 el uso de una fusión ETV1 para evaluar la puntuación de Gleason y/o la fase clínica del cáncer de próstata y determinar el pronóstico del cáncer de próstata. La detección de una fusión del gen ARG-ETS, tal como ARG:ERG y ARG:ETV1, se ha divulgado como un método para la detección de un neoplasma de próstata (solicitud de patente canadiense n.º 2814598). La publicación de la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2012/0214684 divulga el uso de un marcador seleccionado de OCT3/4, Nanog, Sox2, c-Myc, Klf4, Queratina 8 y uPAR en la detección de una neoplasia, tal como el carcinoma de próstata, la caracterización de la agresividad del cáncer de próstata, el control de la efectividad de la terapia y la selección de un tratamiento. Los métodos para evaluar la progresión del cáncer y para diagnosticar el carcinoma, melanoma, cáncer de colon y cáncer de próstata examinando el nivel de un producto de expresión de un gen seleccionado de un grupo, que incluye ETV1, entre otros métodos, se divulgan en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2007/0237770. La medición de al menos dos genes del ciclo celular, como AURKA, solos o en combinación adicionalmente con PTEN, se ha divulgado en la clasificación de cáncer, tal como cáncer de próstata, en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0041274. El uso de ARN de MYC, solo o en combinación adicionalmente con ARN de PTEN, se ha divulgado para la evaluación de la supervivencia en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2012/0009581. El análisis de FISH o los ensayos basados en RT-PCR para detectar la fusión de TMPRSS2: ETS y la evaluación inmunohistoquímica de p27, EZH2 y c-MYC como pruebas auxiliares potencialmente útiles en pacientes con bajo riesgo de cáncer de próstata se han divulgado por Hemamali Samaratunga et al. ("What is the molecular pathology of low-risk prostate cancer?", *World Journal of Urology*, vol. 26, n.º 5, págs. 431-436).

Atish D. Choudhury et al. ("The Role of Genetic Markers in the Management of Prostate Cancer", *EUROPEAN UROLOGY*, vol. 62, n.º 4, páginas 577 - 587) han indicado también que el uso de marcadores genéticos tiene el potencial de ayudar a la detección de enfermedades, mejorar la discriminación de pronóstico y la predicción de respuesta al tratamiento.

Adrian S. Ishkanian et al. ("Array CGH as a potential predictor of radiocurability in intermediate risk prostate cancer", *Acta Oncologica*, vol. 49, n.º 7, páginas 888 - 894) han llegado a la conclusión de que las alteraciones genéticas pueden delinear el cáncer de próstata localizado de la enfermedad sistémica y ser utilizadas como un factor predictivo ya que los pacientes se someterán individualmente a terapias locales (cirugía contra radioterapia) y/o adyuvantes (ablación androgénica adyuvante o radioterapia postoperatoria de una manera prospectiva para mejorar el resultado).

Irshad Shazia et al. ("A molecular signature predictive of indolent prostate cancer", *Science Translational Medicine*, AAAS - American Association for the advancement of science, vol. 5, página 72) mostró que los tumores de próstata con baja puntuación de Gleason se pueden distinguir como subgrupos indolentes y agresivos basándose en su expresión de los genes asociados con el envejecimiento y la senescencia. Identificaron una firma genética enriquecida en cáncer de próstata indolente y concluyeron que tres genes, FGFR1, PMP22 y CDKN1A, predijeron juntos con precisión el resultado de tumores con baja puntuación de Gleason.

Freier et al. ("Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC)", *Oral Oncology*, vol. 43, n.º 1, páginas 60 - 66) han divulgado que ese aumento en la expresión de FGFR1 contribuye a la carcinogénesis oral en una etapa temprana de desarrollo.

La determinación de supervivencia (por ejemplo, diagnóstico, pronóstico, predicción de respuesta y/o tasa de supervivencia relativa) para una enfermedad, como el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), mediante la cuantificación de al menos dos proteínas, como PTEN, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0306514. El uso de PCA3 y al menos otro marcador seleccionado de un grupo, que incluye TMPRSS2:ERG, para detectar el cáncer de próstata se divulga en la publicación de la solicitud de patente

- internacional n.º WO 2009/0140741. Un método para diagnosticar la progresión del cáncer de próstata o la recurrencia del cáncer de próstata, que comprende determinar la presencia de un segmento de banda cromosómica amplificada 8q24 se divulga en la publicación de la solicitud de patente internacional n.º 1996/020288. El uso de una composición de hibridación, que comprende una sonda, un disolvente aprótico polar distinto de DMSO, menos del 10 % de formamida y una solución de hibridación para detectar una afección, como el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata), se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0281263. La sonda en la composición de hibridación puede detectar, por ejemplo, c-MYC, MYCN, PTEN, MDM2, FGFR1, AURKA, CEP8 o CEP10, entre otros. Un método para caracterizar el tejido de la próstata determinando los niveles de expresión de un conjunto de genes seleccionados de ABP280 (FLNA), AMACR, AR, BM28, BUB3, CaMKK, CASPASE3, CDK7, DYNAMIN, E2F1, E-CADHERIN, EXPORTIN, EZH2, FAS, GAS7, GS28, ICBP90, ITGA5, JAGGED1, JAM1, KANAD- APTIN, KLF6, KRIP1, LAP2, MCAM, MIB1 (MK167), MTA1, MUC1, MYSOIN-VI, P27, P63, PAXILLIN, PLCLN, PSA (KLK3), BAP27, RBBP, RIN1, SAPK α , TPD52, XIAP y ZAG se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2006/0234259; según se informa, el método puede implicar un pronóstico, como predecir la progresión de la enfermedad de la próstata. La medición del nivel de dos o más determinantes seleccionado de una lista de 372 determinantes en un método para evaluar el riesgo de recurrencia de un cáncer o el desarrollo de la metástasis se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/0265197; según se informa, el método puede implicar la medición de un parámetro estándar, como la puntuación de Gleason para el cáncer de próstata.
- El documento WO2014028907 divulga un panel pronóstico de 3 genes que juntos predijeron de forma precisa el resultado de los tumores de próstata con baja puntuación de Gleason como realmente indolentes o en alto riesgo de volverse agresivos.
- La medición del nivel de expresión de ERG, solo o en combinación adicionalmente con el nivel de expresión de AMACR, en el diagnóstico o pronóstico del cáncer de próstata se ha divulgado también en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2013/029860 (véase, también, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2010/0215638 para el uso de otros genes asociados con ERG en la detección del cáncer de próstata y similares). La detección de uno o más biomarcadores (por ejemplo, ARN o proteína) seleccionados de un grupo que consiste en CSPG2, WNT10B, E2F3, CDKN2A, TYMS, TGFB3, ALOX12, CD44, LAF4, CTNNA1, XPO1, PTGDAS, SOX9, RELA, EPB49, SIM2, EDNRA, RAD23B, FBP1, TNFRSF1A, CCNG2, LETMD1, NOTCH3, ETV1, BID, SIM2, ANXA1, BCL2, FOXO1A, CLNS1A, PTGDS, XPO1, LETMD1, RAD23B, ABCC3, APC, CHES1, EDNRA, FRZB, HSPG2, TMPRSS2:ETV1, CSPG2, CDKN2A y otros, se ha divulgado para la predicción de la recurrencia, progresión y potencial metastásico del cáncer (véase la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2013/0005837). Se ha informado que la combinación de FGFR1, PMP22 y CDKN1A predice de forma precisa el resultado de los tumores con baja puntuación de Gleason (Irshad et al., *Sci. Transl. Med.* 5(202): 202 (11 de septiembre de 2013)). Un método para diagnosticar el cáncer, tal como cáncer de próstata, que comprende detectar la expresión diferencial de un gen seleccionado de un grupo de 73 genes, que incluye FGFR1, se divulga en la solicitud de patente canadiense n.º 2604844 (véase, también, la solicitud de patente europea n.º 2083088). El uso de PCA3 y un marcador específico de la próstata (por ejemplo, NKX3.1), tal como una proporción del mismo, para pronosticar, evaluar el volumen del tumor, controlar, determinar el riesgo de progresión y estadificar el cáncer de próstata también se ha divulgado (patente de EE. UU. n.º 8,257,924). El uso de dos o más genes seleccionados de PSA/KLK3, PMEPA1, NKX3.1, ODC1, AMD1 y ERG para pronosticar el cáncer de próstata o para evaluar la señalización del receptor androgénico, como mediante la detección o medición de la expresión, se divulga en la solicitud de patente canadiense n.º 2719172. El uso de al menos dos marcadores moleculares seleccionados de her2/neu, p16, p53, Ki67, MN, mdm-2, bcl-2 y EGFR en un método automatizable para identificar células cancerosas y sus células precursoras en una muestra de célula/tejido, tal como una muestra obtenida de una próstata, se divulga en la Patente de EE. UU. N.º 7.452.727. Un método para pronosticar el cáncer de próstata que comprende determinar un patrón de hibridación de un conjunto de sondas cromosómicas que consiste en las sondas para 8p21-22, cromosoma 8 y C-MYC se divulga en la patente de EE. UU. n.º 6.613.510. Se ha divulgado el uso de anticuerpos para ERG, TFF3 y una citoqueratina de alto peso molecular para detectar el cáncer de próstata, incluida la concordancia completa entre la expresión de ERG por IHC y el estado del gen ERG (es decir, reordenamiento) por FISH, aunque no se observó asociación entre la expresión de ERG/TFF3 y los parámetros, como la edad, PSA, puntuación de Gleason, estadio del tumor y recurrencia bioquímica (publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2013/0173463). El uso de niveles de expresión de c-Myc, Ha-Ras, NeuT y/o c-Src en el diagnóstico del cáncer de próstata, la clasificación de un cáncer/tumor de próstata en una subclase de cáncer de próstata distinta y, en combinación adicionalmente con ErbB2, la estratificación de un paciente con un tumor, como un tumor de próstata, para el ensayo clínico se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/0109245. El uso de dos o más marcadores seleccionados de TARDBP, TLN1, PARK7, ISPI1, CALD1, p73, PTEN, PXN, PEX10, KL3, DBN1, NFAT1, B-Tubulina, SOS1, HSF4, TOP1, HSPA1A, ACID2, STAT2, p53, CHD3 CASP8, STX6, AR, GAPDHS, ciclina D1 y CCNA2 para evaluar diagnósticamente a un sujeto por cáncer de próstata se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/0066325. Un método para subtipificar un cáncer de próstata (por ejemplo, el riesgo de desarrollar cáncer de próstata neuroendocrino letal (NEPC)) que implica la determinación de la sobreexpresión/amplificación de AURKA y/o MYCN, solos o en combinación adicionalmente con el reordenamiento de ERG, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2014/037647. El uso de cinco o más marcadores seleccionados de HOXA7, AURKA, NEK2, FOXM1B, CCNB1, CEP55, CENPA, DNMT3B, DNMT1, HELLS, MAPK8, BMI1, ITGB1, IVL y CTNNB1 para diagnosticar o controlar la

progresión del cáncer, tal como cáncer de próstata, se divulga en la publicación de la solicitud de patente internacional n.º 2012/013931. La detección de una rotura en la secuencia de un cromosoma humano 12q24 en el locus del gen SMRT usando FISH se ha divulgado como un método para determinar la posibilidad de metástasis de cáncer de próstata (patente de EE. UU. n.º 7.425.414). La determinación del nivel de un constituyente, como ARN de PTEN, se ha divulgado en la evaluación del cáncer de próstata, la evaluación/control de respuesta a la terapia en un paciente con cáncer de próstata y el control de la progresión del cáncer de próstata (publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2008/121132). La detección de la expresión aumentada de ERG y la expresión disminuida de PTEN, como mediante la detección de ARNm, proteína o alteración(es) en la(s) secuencia(s) genómica(s) (por ejemplo, amplificación, deleción o fusión), para determinar la agresividad del cáncer de próstata o que el cáncer de próstata ha penetrado, o penetrará posiblemente, en la cápsula prostática, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2013/0196866 como es la detección de la expresión reducida de PTEN para determinar la recurrencia del cáncer de próstata. El uso de (i) MYC, PTEN, CEP8 y CEP7, (ii) MYC, LPL, PTEN y CEP8, o (iii) MYC y CEP8 en la detección del cáncer de próstata se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2013/0171638. La detección de la sobreexpresión de PITX2 se ha divulgado como un método para diagnosticar la presencia o el riesgo de cáncer de próstata y, en combinación con al menos otro factor, como la PSA o el grado de Gleason, como un método para pronosticar el cáncer de próstata (publicación de patente internacional n.º WO 2010/099577). La identificación de un nivel aumentado de un ácido nucleico o polipéptido seleccionado de OCT3/4, Nanog, Sox2, c-myc, Klf4, queratina 8 y uPAR se ha divulgado como un método para identificar un carcinoma de próstata, un método para caracterizar la agresividad de un cáncer de próstata, un método para identificar una propensión para desarrollar un cáncer de próstata metastásico y otros métodos (publicación de la solicitud de patente internacional No. 2011/037643). Un método para predecir la posibilidad de recurrencia de cáncer después de un tratamiento en un paciente que comprende determinar el nivel de expresión de p27, o su producto de expresión, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0225528, mientras que un método para determinar la agresividad de un carcinoma de próstata que comprende detectar la proteína p27 se divulga en la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 2000/077258, que también divulga un método para determinar la tasa de proliferación de cáncer de próstata que comprende detectar la expresión de MDM2 (véase, también, la solicitud de patente canadiense n.º 2.375.228). Un método para detectar una célula con un fenotipo neoplásico o preneoplásico que comprende evaluar una muestra por la pérdida de heterocigosidad (LOH) en uno o más loci en uno o más cromosomas, tales como aquellos que están relacionados con la progresión de la preneoplasia a carcinoma invasivo, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0165895. Un método para evaluar un cáncer de próstata que comprende medir cuantitativamente al menos un ARN (por ejemplo, MYC) en condiciones repetibles de manera que la medición distingue el cáncer de próstata del melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de colon con una precisión de al menos el 75 % se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2011/097717 (véase, también, la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2010/0233691.

El documento EP2695950 divulga un método para predecir la capacidad de respuesta de una célula tumoral de mamífero o una célula cancerosa a un inhibidor de un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) y un método para predecir la capacidad de respuesta de un individuo a un inhibidor de un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Estos métodos implican la evaluación del estado de FGFR y el estado de c-myc, por lo que dicho estado de FGFR y de c-myc es indicativo de la capacidad de respuesta al inhibidor.

Un panel de biomarcadores de cáncer aislados que consta de DUSP6, SPRY2 y uno o más biomarcadores seleccionados de un grupo de aproximadamente 33 genes, que incluye ETV1, se divulga en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2008/0131885.

A la vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de métodos de pronóstico más fiables e informativos en la gestión del cáncer de próstata. La presente divulgación pretende proporcionar conjuntos de marcadores, así como métodos de uso y kits que comprenden los conjuntos de marcadores, para la evaluación de la progresión del cáncer de próstata. Este y otros objetos y ventajas, así como las características inventivas, se harán evidentes a partir de la descripción detallada que se proporciona en el presente documento.

Sumario

La presente invención en una primera realización proporciona un método para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente, método que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra del paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG, en condiciones de hibridación, en donde se utiliza la sonda específica de locus para FGFR1 para determinar el % de pérdida de FGFR1,
- (b) determinar la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra, en donde

- (i) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2 superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,
 (ii) un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,
 5 (iii) un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46, y/o
 (iv) un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30, indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo y en donde la ausencia de cualquiera de (i)-(iv) anterior indica que el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente,

10 tras lo cual un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo se distingue de un paciente con adenocarcinoma prostático indolente.

15 La presente invención en una segunda realización proporciona un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprenden una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG.

La presente realización en una tercera realización proporciona un kit que comprende:

- 20 (a) un conjunto de sondas que permite la identificación de un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo, en donde el conjunto de sondas comprende una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable, para MYC, una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable para FGFR1, y una sonda de separación, etiquetada de manera detectable para ERG, y
 25 (b) instrucciones para identificar a un paciente con un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo, en donde las instrucciones comprenden determinar la presencia de anomalías cromosómicas en una muestra obtenida del paciente,
 en donde uno o más de un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 14 hasta inferior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 hasta inferior o igual a 40 y un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 46 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo.

Breve descripción de las figuras

- 35 La figura 1 es una curva de KM (PFS (supervivencia libre de progresión); (años) vs. probabilidad de supervivencia) de la ganancia de FGFR1 con un corte de seis y un valor de p de rango logarítmico de 0,0062.
 La figura 2 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de la pérdida de FGFR1 con un corte de 40 y un valor de p de rango logarítmico de 0,0009.
 La figura 3 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel y pérdida de FGFR1 con un valor de p de rango logarítmico de 0,0001.
 La figura 4 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 y pérdida homocigótica para PTEN con un valor de p de rango logarítmico de 0,0048.
 La figura 5A es una curva ROC, que es un gráfico de especificidad 1 (falso positivo) vs. sensibilidad (verdadero positivo), que muestra el AUC con la puntuación de Gleason solo.
 45 La figura 5B es una curva ROC, que es un gráfico de especificidad 1 (falso positivo) vs. sensibilidad (verdadero positivo), que muestra el AUC con la combinación de la ganancia de CMYC de los parámetros anormales de FISH, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 y pérdida homocigótica de PTEN.
 La figura 5C es una curva ROC, que es un gráfico de especificidad 1 (falso positivo) vs. sensibilidad (verdadero positivo), que muestra el AUC con la puntuación de Gleason y la combinación de parámetros anormales de FISH, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 y PTEN homocigótico.
 50

Descripción detallada

55 La presente divulgación proporciona conjuntos de sondas, kits que comprenden un conjunto de sondas e instrucciones para llevar a cabo un método, un método para utilizar un conjunto de sondas o un kit que comprende el conjunto de sondas, para distinguir o identificar a un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo o adenocarcinoma prostático indolente. Los métodos son útiles para evaluar el riesgo de progresión de la enfermedad, incluyendo la recurrencia y muerte de la enfermedad (DOD), tal como evaluar el riesgo de la progresión de la enfermedad después del tratamiento de adenocarcinoma prostático (o cáncer de próstata), por ejemplo, por prostatectomía radical. Los métodos son también útiles para controlar a los pacientes a lo largo del tiempo, tales como pacientes, que se han identificado que tienen adenocarcinoma prostático indolente, y pacientes, que se han identificado que tienen adenocarcinoma prostático agresivo y están siendo, o serán, tratados, como con una terapia adyuvante (por ejemplo, privación de andrógenos). Los métodos se pueden usar también para confirmar los resultados de la predicción de riesgo histológico de los nuevos métodos de detección/selección basados en la orina o en la sangre. Por lo tanto, los métodos se pueden utilizar para identificar pacientes para la vigilancia activa o espera vigilante, disminuir potencialmente la frecuencia de las biopsias y reducir potencialmente las prostatectomías
 60
 65

radicales innecesarias, mejorando así la calidad de vida de los pacientes. Los siguientes términos son relevantes para la presente divulgación:

"2 + Edel" se puede usar en el presente documento para referirse a la duplicación de una fusión del gen ERG, por ejemplo, una fusión del gen TMPRSS2:ERG y la delección intersticial de las secuencias 5' del gen ERG.

5 "Aproximadamente" se refiere a aproximadamente una variación de +/-10 % del valor establecido. Se ha de entender que una variación de este tipo está siempre incluida en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, ya sea que se haga referencia específica o no a él.

10 "Adenocarcinoma", "adenocarcinoma de próstata", "carcinoma de la próstata", y "adenocarcinoma prostático" se pueden utilizar en el presente documento para referirse al crecimiento maligno (es decir, cáncer) en la próstata.

15 "AURKA" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen de la aurora quinasa A. Las bandas citogenéticas Entrez Gene y HGNC son 20q13, mientras que la banda citogenética Ensembl es 20q13.2. Los alias para AURKA incluyen ARK1, BTAK, STK15, STK6, AIK, PPP1R47, STK7, serina/treonina quinasa 6, Aurora 2, quinasa 1 relacionada con aurora, quinasa 1 relacionada con Aurora/IPL1, quinasa amplificada de tumor de mama, serina/treonina proteína quinasa 15, serina/treonina proteína quinasa 6, serina/treonina proteína quinasa aurora-A, ARK-1, AURA, hARK1, AURORA2, AurA, serina/treonina quinasa 15, quinasa de tipo aurora/IPL1, quinasa amplificada de tumor de mama, quinasa relacionada con IPL1, subunidad 47 reguladora de la proteína fosfatasa 1, serina/treonina proteína quinasa 15, AIRK1, AYK1, EC2.7.11.1 y IAK1. "AURKA" se utiliza también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica AURKA, tal como un aumento en el número de copias. Una sonda para detectar un parámetro que implica AURKA, tal como el número de copias de AURKA, una proporción del número de copias que implica AURKA o el porcentaje de ganancia de AURKA, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q13 del cromosoma 20 (20q13), que comprende el gen AURKA. Las secuencias de referencia de ADN incluyen, pero no se limitan a, NC_000020.10 y NT_011362.10.

25 El "biomarcador", según se define por los Institutos Nacionales de la Salud, es "una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador de los procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica".

30 La "sonda de separación" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una combinación de dos sondas etiquetadas de manera detectable y distintivamente, que permite la detección de una translocación. Por ejemplo, una sonda se puede hibridar en o cerca del extremo 5' de un gen dado y producir fluorescencia en una longitud de onda, mientras que la otra sonda se puede hibridar en o cerca del extremo 3' del gen dado y producir fluorescencia en una longitud de onda. Cuando el cromosoma está en un estado nativo, los colores se combinan como un solo color, por ejemplo, amarillo. Cuando el cromosoma experimenta una translocación, los colores se separan, por ejemplo, rojo y verde.

40 La "sonda de enumeración de cromosomas (CEP)" o la "sonda centromérica" se pueden utilizar en el presente documento para referirse a cualquier sonda que permita que se enumere el número de cromosomas específicos en una célula. Una sonda de enumeración de cromosomas reconoce típicamente y se une a una región cerca de (denominada "pericentromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitiva (por ejemplo, ADN alfa satélite). El centrómero de un cromosoma se considera típicamente que representa ese cromosoma, ya que el centrómero es necesario para la segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica particular se puede diferenciar de la pérdida o ganancia del cromosoma entero (aneusomía), dentro del cual reside normalmente, comparando el número de señales que corresponden al locus particular (número de copias) con el número de señales que corresponden al centrómero. Un método para hacer esta comparación es dividir el número de señales que representan el locus por el número de señales que representan el centrómero. Las proporciones inferiores a uno indican la pérdida relativa o la delección del locus, y las proporciones superiores a uno indican la ganancia relativa o la amplificación del locus. De manera similar, se puede hacer la comparación entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo, en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar las ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma. En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la materia reconocerá que una sonda del brazo del cromosoma se puede usar alternativamente para aproximarse a la pérdida o ganancia cromosómica entera. Sin embargo, dichas sondas no son tan precisas para enumerar cromosomas, ya que la pérdida de señales para dichas sondas puede no indicar siempre una pérdida del cromosoma entero. Los ejemplos de sondas de enumeración de cromosomas incluyen sondas CEP® disponibles comercialmente de Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL). Los ejemplos específicos de las sondas de enumeración de cromosomas o sondas centroméricas incluyen sondas para el cromosoma 1, cromosoma 2, cromosoma 3, cromosoma 4, cromosoma 5, cromosoma 6, cromosoma 7, cromosoma 8, cromosoma 9, cromosoma 10, cromosoma 11, cromosoma 12, cromosoma 13, cromosoma 14, cromosoma 15, cromosoma 16, cromosoma 17, cromosoma 18, cromosoma 19, cromosoma 20, cromosoma 21, cromosoma X y cromosoma Y. Los ejemplos específicos de las sondas CEP® incluyen CEP1, CEP2, CEP3, CEP4, CEP5, CEP6, CEP7, CEP8, CEP9, CEP10, CEP11, CEP12, CEP13, CEP14, CEP15, CEP16, CEP17, CEP18, CEP19, CEP20, CEP21, CEPX y CEPY.

"C-MYC" y "MYC" se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento para referirse al oncogén c-myc. Las bandas citogenéticas Entrez Gene y Ensembl son 8q24.21, mientras que la banda citogenética HGNC es 8q24. Los alias incluyen vHLHe39, c-Myc, homólogo del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar v-myc, proteína 39 de hélice-bucle-hélice básica de clase E, protooncogén c-Myc, factor de transcripción p64, MRTL, homólogo del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar, proteína protooncogénica myc, factor de regulación de la traslación/localización relacionado con myc y BHLHE39. MYC se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas que se pueden utilizar para determinar una anomalía cromosómica que implica MYC, tal como la ganancia del número de copias de MYC. Una sonda para detectar un parámetro que implica MYC, tal como el número de copias de MYC, una proporción del número de copias que implica MYC o el porcentaje de ganancia de MYC, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q24 del cromosoma 8 (8q24), que comprende el gen MYC. Las secuencias de referencia de ADN incluyen, pero no se limitan a, NC_000008.10 y NT_008046.16.

"Número de copias" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una medición de ADN, ya sea de un solo locus, uno o más loci o un genoma entero. Un "número de copias" de dos es un "tipo silvestre" en un ser humano (debido a la diploidía, a excepción de los cromosomas sexuales). Un "número de copias" distinto de dos en un ser humano (a excepción de los cromosomas sexuales) se desvía del tipo silvestre. Dichas desviaciones incluyen amplificaciones, es decir, aumentos en números de copias y deleciones, es decir, disminuciones en los números de copias e incluso la ausencia de números de copias.

"ERG" puede usarse en el presente documento para referirse al gen homólogo del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis aviar V-Ets. Las bandas citogenéticas Entrez Gene y HGNC son 21q22.3, mientras que la banda genética de Ensembl es 21q22.2. Los alias incluyen el oncogén E26 relacionado con el virus de la eritroblastosis aviar V-Ets, ERG regulador transcripcional (proteína transformadora ERG), el oncogén E26 parecido al virus de la eritroblastosis V-Ets, TMPRSS2-ERG específico de cáncer de próstata, erg-3, relacionado con ets, p55, fusión TMPRSS2/ERG, regulador transcripcional ERG, homólogo del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis V-Ets y proteína transformadora ERG. "ERG" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica ERG. Una sonda para detectar un parámetro que implica ERG mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q22 del cromosoma 21 (21q22), que comprende el gen ERG. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000021.8, NC_018932.2 y NT_011512.11.

"ETV1" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen de la variante 1 de Ets. La banda citogenética Entrez Gene es 7p21.3, mientras que la banda citogenética Ensembl es 7p21.2 y la banda citogenética HGNC es 7p22. Los alias incluyen el gen 1 de la variante de Ets, la proteína 81 relacionada con Ets, ER81 y la variante 1 de translocación de ETS. "ETV1" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica ETV1. Una sonda para detectar un parámetro que implica ETV1 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p21-22 del cromosoma 7 (7p21 -22), que comprende el gen ETV1. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000007.13, NT_007819.17, NC_018918.2 y NT_079592.2.

"FGFR1" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen del receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos. Las bandas citogenéticas Entrez Gene y HGNC son 8p12, mientras que la banda citogenética Ensembl es 8p11.22. Los alias incluyen FLT2, KAL2, tirosina quinasa 2 relacionada con Fms, receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos básico, tirosina quinasa 2 de tipo Fms, protooncogén C- Fgr, BFGFR, CEK, FGFBR, FGFR-1, FLG, FLT-2, HBGFR, bFGF-R-1, EC 2.7.10, EC 2.7.10.1, OGD, síndrome de Pfeiffer, CD331, antígeno de CD331, HH2, N-SAM, fusión FGFR1/PLAG1, receptor del factor de crecimiento de unión a heparina, hidroxiarilo-proteína quinasa, N-SAM, N-sam, fusión FGFR1/PLAG1, receptor del factor de crecimiento de unión a heparina e hidroxiarilo-proteína quinasa. "FGFR1" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica FGFR1. Una sonda para detectar un parámetro que implica FGFR1 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con las regiones p11-12 del cromosoma 8 (8p11-12), que comprende el gen FGFR1. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000008.10, NT_167187.1 y NC_018919.2.

"Pérdida homocigótica", "pérdida de heterocigisidad", y "LOH" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento para referirse a una pérdida o inactivación de ambas copias de un gen completo y una región cromosómica circundante.

"Etiquetado", "etiquetado con una etiqueta detectable" y "etiquetado de manera detectable" se pueden utilizar indistintamente para indicar que se puede detectar una entidad (por ejemplo, una sonda). "Etiqueta" y "etiqueta detectable" se pueden utilizar en el presente documento para referirse a un resto unido a una entidad para volver a la entidad detectable, tal como un resto unido a una sonda para volver a la sonda detectable al unirse con una secuencia objetivo. El resto, en sí mismo, puede no ser detectable pero puede volverse detectable al reaccionar con otro resto. El uso del término "etiquetado de manera detectable" está destinado a abarcar dicho etiquetado. La etiqueta detectable se puede seleccionar de tal manera que la etiqueta genere una señal, que se puede medir y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de la entidad unida. Una amplia variedad de sistemas para marcar y/o

- detectar moléculas, tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, sondas, son bien conocidos. Los ácidos nucleicos etiquetados se pueden preparar incorporando o conjugando una etiqueta que es directa o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, partículas magnéticas, partículas densas en electrones, etiquetas de masa, etiquetas de giro, haptenos y similares. Los fluoróforos y los agentes quimioluminiscentes se prefieren en el presente documento.
- "Sonda específica de locus" e "identificador específico de locus (LSI)" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento para referirse a una sonda que se une selectivamente a un locus específico en una región en un cromosoma, por ejemplo, un locus que se ha determinado que experimenta ganancia/pérdida en la metástasis. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes o ambas, incluyendo exones, intrones y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.
- "MDM2" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen de la proteína ligasa de la ubiquitina E3 del oncogén MDM2. La banda citogenética Entrez Gene es 12q14.3-q15, mientras que la banda citogenética Ensembl es 12q15 y la banda citogenética HGNC es 12q13 -q 14. Los alias incluyen la oncoproteína MDM2, el homólogo de la proteína de unión a P53 de MDM2 (ratón), el homólogo de la proteína ligasa de la ubiquitina E3 de P53 de MDM2 (ratón), la proteína de unión a p53 de doble minuto 2 de célula 3T3 transformada de MDM2 (ratón), homólogo humano de la proteína de unión a P53 de doble minuto 2 de ratón, ACTFS, HDMX, homólogo humano de la proteína de unión a P53 de doble minuto 2, MDM2 de proteína ligasa de ubiquitina E3, hdm2, el homólogo de la proteína ligasa de la ubiquitina E3 de P53 de MDM2, la proteína de unión a p53 de doble minuto 2 de célula 3T3 transformada de MDM2, EC 6.3.2, Hdm2, la proteína de doble minuto 2 y MDM2 de la proteína de unión a P53. "MDM2" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica MDM2. Una sonda para detectar un parámetro que implica MDM2 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con las regiones q13-15 del cromosoma 12 (12q13-15), que comprende el gen FGFR1. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000012.11, NT_029419.12 y NC_018923.2.
- "MYCN" se puede usar en el presente documento para referirse al gen homólogo derivado del neuroblastoma del oncogén vírico de la mielocitomatosis aviar V-Myc. Las bandas citogenéticas Entrez Gene, Ensembl y HGNC son 2p24.3. Los alias incluyen NMYC, la proteína 37 de hélice-bucle-hélice básica de clase E, bHLHe37, MODED, ODED, MYCNOT, N-myc, la proteína protooncogénica N-Myc, el oncogén MYC de neuroblastoma, el oncogén relacionado con la mielocitomatosis aviar vírica V-Myc derivado del neuroblastoma, el oncogén NMYC, pp65/67, el oncogén relacionado con la mielocitomatosis aviar vírica V-Myc derivado del neuroblastoma, el oncogén relacionado con la mielocitomatosis vírica V-Myc derivado del neuroblastoma y BHLHE37. "MYCN" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica MDM2. Una sonda para detectar un parámetro que implica MDM2 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p24 del cromosoma 2 (2p24), que comprende el gen MYCN. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000002.11, NC_018913.2 y NT_005334.16.
- "NKX3.1" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen NK3 homeobox 1. Las bandas citogenéticas Entrez Gene, Ensembl y HGNC son 8p21.2. Los alias incluyen NKX3-1, NKX3A, homólogo A de proteína homeobox NK-3, BAPX2, NK homeobox (Drosophila) familia 3 A, locus 1 relacionado con el factor de transcripción de NK3 (Drosophila), NKX3, proteína homeobox Nkx-3.1, NK homeobox familia 3 A, homólogo A del factor de transcripción de NK3 y locus 1 relacionado con el factor de transcripción de NK3. "NKX3.1" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica NKX3.1. Una sonda para detectar un parámetro que implica MDM2 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p21 del cromosoma 8 (8p21), que comprende el gen NKX3.1. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000008.10, NC_018919.2 y NT_167187.1.
- "Muestra de ácido nucleico" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una muestra que comprende un ácido nucleico en una forma adecuada para la hibridación con una sonda, tal como una muestra que comprende núcleos o ácidos nucleicos aislados o purificados de dichos núcleos. La muestra de ácido nucleico puede comprender ADN genómico total o parcial (por ejemplo, cromosoma(s) particular(es)), ARNm total o parcial (por ejemplo, cromosoma(s) o gen(es) particular(es) o secuencia(s) seleccionada(s)). Los cromosomas condensados (como están presentes en interfase o metafase) son adecuados para el uso como objetivos en la hibridación *in situ*, tal como FISH.
- "P27" se puede utilizar en el presente documento para referirse al gen 1B inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina. Las bandas citogenéticas Entrez Gene y HGNC son 12p13.1-p12, mientras que la banda citogenética Ensembl es 12p13.1. Los alias incluyen Kip1, KIP1, CDKN4, MEN4, MEN1B, P27KIP1, inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina y p27Kip1. "P27" se puede utilizar también en el presente documento para referirse a una sonda o a un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica P27. Una sonda

para detectar un parámetro que implica P27 mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p13-12 del cromosoma 12 (12p13 -12), que comprende el gen P27. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000012.11, NC_018923.2 y NT_009714.17.

5 "Corte predeterminado" y "nivel predeterminado" se pueden utilizar en el presente documento para referirse generalmente a un valor de corte que se utilizar para evaluar los resultados de eficacia diagnóstica/pronóstica/terapéutica comparando los resultados del ensayo con el corte/nivel predeterminado, donde el corte/nivel predeterminado se ha unido o asociado ya con varios parámetros clínicos (por ejemplo, severidad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etc.).

10 "Sonda" se puede utilizar en el presente documento para referirse a un oligonucleótido o polinucleótido que puede hibridarse selectivamente con al menos una parte de una secuencia objetivo en condiciones que permiten o promueven la hibridación selectiva. En general, una sonda puede ser complementaria a la cadena codificante o sentido (+) del ADN o complementaria a la cadena no codificante o antisentido (-) del ADN (a veces denominada "reversa complementaria"). Las sondas pueden variar significativamente en longitud. Una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, tal como aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, se pueden preferir en algunas aplicaciones, mientras que una longitud de aproximadamente 50-1x10⁵ nucleótidos se puede preferir para las sondas cromosómicas y una longitud de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 800.000 nucleótidos se puede preferir para las sondas específicas de locus. En términos generales, una sonda se marca de manera detectable, tal como de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

25 "Pronóstico" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una predicción del curso probable y/o resultado de una enfermedad, tal como la posibilidad de recuperación. Por lo tanto, el pronóstico comprende una mejora del estado de la enfermedad, un empeoramiento del estado de la enfermedad y ningún cambio en el estado de la enfermedad.

30 "Progresión" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una recurrencia y/o muerte de la enfermedad (DOD).

35 "Cáncer de próstata" se puede utilizar en el presente documento para referirse a todos los tipos de cáncer de próstata, tal como el adenocarcinoma, carcinoma microcítico, carcinoma de células escamosas, sarcoma y carcinoma de células transicionales. La mayoría del cáncer de próstata (alrededor del 95 %) es el adenocarcinoma. El cáncer de próstata se distingue de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN, que se distingue adicionalmente como de bajo grado o de alto grado), que es un precursor del cáncer de próstata. El carcinoma microcítico y el carcinoma de células escamosas tienden a ser de naturaleza muy agresiva y no conducen a un aumento en el antígeno prostático específico (PSA). El carcinoma de células de transición se desarrolla rara vez en la próstata pero deriva de los tumores primarios en la vejiga y/o uretra.

40 "Prostatectomía" se puede utilizar en el presente documento para referirse a la extirpación de parte o de toda la próstata, sola o combinada además con otras estructuras. Una prostatectomía "simple" o "abierta" puede consistir en la enucleación de un adenoma prostático hiperplásico. Una prostatectomía "radical" puede referirse a la extirpación *en bloque* de toda la próstata, las vesículas seminales y el conducto deferente. Dichos términos se pueden utilizar indistintamente en el presente documento y el uso de uno no pretende excluir al otro.

45 "PTEN" puede utilizarse en el presente documento para referirse a la fosfatasa y al gen homólogo de la tensina. La banda citogenética Entrez Gene es 10q23.3, mientras que la banda citogenética Ensembl es 10q23.31 y la banda citogenética HGNC es 10q23. Los alias incluyen la fosfatasa y la proteína de tipo tensina, fosfatidinositol 3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa y proteína fosfatasa dual específica, PTEN1, mutado en múltiples cánceres avanzados 1, MMAC1, fosfatasa MMAC1 y homólogo de la tensina eliminado del cromosoma 10, BZS, MHAM, TEP1, GLM2, 10q23del, CWS1, DEC, EC 3.1.3.16, EC 3.1.3.48 y EC 3.1.3.67. "PTEN" se puede utilizar en el presente documento para referirse a una sonda o un conjunto de sondas utilizadas para determinar una anomalía cromosómica que implica PTEN. Una sonda para detectar un parámetro que implica PTEN mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q23 del cromosoma 10 (10q23), que comprende el gen PTEN. Las secuencias de ADN de referencia incluyen NC_000010.10, NC_018921.2 y NT_030059.13.

55 "Riesgo de progresión" se puede utilizar en el presente documento para referirse al riesgo de empeoramiento del estado de la enfermedad, recurrencia, tal como después de la remisión y la muerte de la enfermedad (DOD).

60 "Sección" de una muestra de tejido es una parte única de una muestra de tejido, por ejemplo, una fina rebanada de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Se pueden tomar y analizar dos o más secciones de muestras de tejido. Si se desea, se puede analizar una sección única en varios niveles, por ejemplo, morfológico y molecular (por ejemplo, ácido nucleico y proteína).

65 "Hibridarse selectivamente con" (así como "hibridación selectiva", "hibridarse específicamente con" e "hibridación específica") se pueden utilizar en el presente documento para referirse a la unión, duplicación o hibridación de una

molécula de ácidos nucleicos con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se puede utilizar en el presente documento para referirse a condiciones en las cuales una sonda se hibridará preferentemente con su secuencia objetivo y en menor medida con, o en absoluto con, otras secuencias no objetivo. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, como en una matriz, hibridación Southern, hibridación Northern o FISH) son dependientes de la secuencia y difieren en condiciones diferentes. Una extensa guía para la hibridación de los ácidos nucleicos se encuentra en, por ejemplo, Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, NY (1993) ("Tijssen"). En general, las condiciones muy rigurosas de hibridación y de lavado se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia objetivo se hibrida con una sonda perfectamente equiparada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para ser iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios, que tienen más de 100 restos complementarios, en una matriz o en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es 42 °C utilizando soluciones de hibridación estándar (véase, por ejemplo, Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (2001)).

"Secuencia objetivo", "región objetivo" y "ácido nucleico objetivo" se pueden utilizar en el presente documento para referirse a una secuencia de nucleótidos que reside en una ubicación cromosómica específica cuya pérdida y/o ganancia, por ejemplo, está siendo determinada.

La terminología utilizada en el presente documento tiene como propósito únicamente describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante.

Métodos para distinguir pacientes con adenocarcinoma prostático agresivo vs. indolente, identificar a un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo e identificar a un paciente con adenocarcinoma prostático indolente

De acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un método para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente. El método comprende:

(a) poner en contacto una muestra del paciente con:

(i) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que consiste en una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para FGFR1,

(vii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27,

(viii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda específica de locus para PTEN y una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8 (CEP8),

(x) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1,

(xii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN,

(xiii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2,

(xiv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1 y una sonda específica de locus para FGFR1,

(xvi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN, o

(xviii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para AURKA, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC y una sonda de separación para ERG, en condiciones de hibridación,

en donde la sonda específica de locus para FGFR1 en los conjuntos de (i), (viii) y (xiv), se utiliza para determinar el % de pérdida de FGFR1,

en donde la sonda específica de locus para FGFR1 en los conjuntos de (vii), y, como alternativa para el % de pérdida de FGFR1, (xiv), se utiliza para determinar el % de ganancia de FGFR1,

en donde CEP8 en los conjuntos de (x), (xii), (xiii), (xiv), (xvi) y (xviii) se utiliza para determinar el % de pérdida de CEP8,

en donde se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (viii) para determinar el % de pérdida homocigótica de PTEN,

en donde se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (xvi) para determinar el % de pérdida de PTEN, y

5 en donde la sonda específica de locus para FGFR1 y CEP8 en el conjunto de (viii), se utiliza para determinar el % de pérdida de la proporción FGFR1/CEP8, y

(b) determinar la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra,

10 en donde un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,

en donde un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,

en donde un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46,

15 en donde un % de pérdida de CEP8 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de CEP8 < 2) superior o igual a 21 hasta inferior o igual a 36,

en donde un % de ganancia de CEP8 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de CEP8 > 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,

20 en donde un % de pérdida de FGFR1/CEP8 superior o igual a 13 hasta inferior o igual a 72,

en donde un % de pérdida homocigótica de PTEN (el % de pérdida homocigótica es el % de células con números de copias de PTEN de cero) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 40,

en donde un % de pérdida de PTEN (el % de pérdida es el % de células con número de copias de PTEN inferior a dos) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50,

en donde un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30,

25 en donde un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,

en donde un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 20,

30 en donde un % de pérdida de NKX3.1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de NKX3.1 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50,

en donde un % de translocación/delección de ETV1 superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20,

en donde un % de pérdida de P27 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de P27 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50, o

35 en donde un % de ganancia de AURKA (el % de ganancia es el % de células con números de copias de AURKA > 2) superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20,

indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo, mientras que nada de lo anterior indica que el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente. El método comprende:

(a) poner en contacto una muestra del paciente con:

45 (ii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG,

(iii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN,

50 (iv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN, o

(v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2,

55 (vi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1,

60 (ix) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1,

(v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1, o

65 (xvii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27, en condiciones de hibridación,

- en donde la sonda específica de locus para FGFR1 en el conjunto de (ii)-(vi), (ix), (xv) y (xvii) se utiliza para determinar el % de pérdida de FGFR1,
 en donde se utiliza la sonda específica de locus para FGFR1 en el conjunto (ix) para determinar el % de ganancia de FGFR1,
- 5 en donde CEP8 en el conjunto de (ix), se utiliza para determinar el % de pérdida de CEP8,
 en donde se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (iii) para determinar el % de pérdida homocigótica de PTEN, y
 en donde la sonda específica de locus para FGFR1 y CEP8 en el conjunto de (ix), se utilizan para determinar el % de pérdida de la proporción FGFR1/CEP8, y
- 10 (b) determinar la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra,
 en donde un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,
 en donde un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,
- 15 en donde un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46,
 en donde un % de pérdida de CEP8 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de CEP8 < 2) superior o igual a 21 hasta inferior o igual a 36,
 en donde un % de ganancia de CEP8 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de CEP8 > 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,
- 20 en donde un % de pérdida de FGFR1/CEP8 superior o igual a 13 hasta inferior o igual a 72,
 en donde un % de pérdida homocigótica de PTEN (el % de pérdida homocigótica es el % de células con números de copias de PTEN de cero) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 40,
 en donde un % de pérdida de PTEN (el % de pérdida es el % de células con número de copias de PTEN inferior a dos) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50,
- 25 en donde un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30,
 en donde un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,
 en donde un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 20,
- 30 en donde un % de pérdida de NKX3.1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de NKX3.1 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50,
 en donde un % de translocación/deleción de ETV1 superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20,
 en donde un % de pérdida de P27 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de P27 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50, o
- 35 en donde un % de ganancia de AURKA (el % de ganancia es el % de células con números de copias de AURKA > 2) superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20,
 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo, mientras que nada de lo anterior indica que el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente.
- 40 Se proporciona otro método para distinguir el adenocarcinoma prostático agresivo del adenocarcinoma prostático indolente en un paciente o en una población de pacientes. El paciente puede ser un paciente individual o un miembro de una población de pacientes, tal como una población de pacientes que se divide en grupos, tal como un grupo que comprende pacientes que tienen un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo y un grupo que comprende pacientes con adenocarcinoma prostático indolente. El método comprende (o consiste en) (a) poner en contacto una muestra de un paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable y (b) determinar la presencia de anomalías cromosómicas en la muestra. De acuerdo con la presente invención, el conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable puede comprender tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sondas seleccionadas del grupo que consiste en una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para PTEN, una sonda de separación (o sondas teloméricas (ERG Tel) y centroméricas (ERG Cen)) para ERG, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para MYCN, una sonda específica de locus para MDM2, una sonda específica de locus para P27, una sonda de separación para ETV1, una sonda específica de locus para AURKA y una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea.
- 50 De acuerdo con la presente invención, la sonda de MYC se puede utilizar para determinar un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) tal como el % de ganancia de MYC superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30. La sonda FGFR1 se puede utilizar para determinar un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2), tal como el % de pérdida de FGFR1 superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40. De manera adicional o como alternativa, la sonda de FGFR1 se puede utilizar para determinar un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR1 > 2) tal como el % de ganancia de FGFR1 superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46. De
- 60
65

acuerdo con la presente invención, la sonda CEP8 se puede utilizar para determinar un % de pérdida de CEP8 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de CEP8 < 2), tal como el % de pérdida de CEP8 superior o igual a 21 hasta inferior o igual a 36. De manera adicional o como alternativa, la sonda CEP8 se puede utilizar para determinar un % de ganancia de CEP8 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de CEP8 > 2), tal como el % de ganancia de CEP8 superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40. A este respecto, la sonda de FGFR1 y la sonda de CEP8 se pueden usar en combinación para determinar, por ejemplo, FGFR1/CEP8, tal como un % de pérdida de FGFR1/CEP8 superior o igual a 13 hasta inferior o igual a 72. La sonda de PTEN se puede utilizar para determinar el % de pérdida homocigótica de PTEN (el % de pérdida homocigótica es el % de células con números de copias de PTEN de cero), tal como un % de pérdida homocigótica de PTEN superior o igual a dos hasta inferior o igual a 40; como alternativa, la sonda de PTEN se puede utilizar para determinar el % de pérdida de PTEN (el % de pérdida es el % de células con el número de copias de PTEN inferior a dos), tal como un % de pérdida de PTEN superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50. La sonda CEP10 se puede utilizar para determinar un % de pérdida de CEP10 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de CEP10 < 2), tal como el % de pérdida de CEP10 superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50. De manera adicional o como alternativa, la sonda CEP10 se puede utilizar para determinar un % de ganancia de CEP10 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de CEP10 > 2), tal como el % de ganancia de CEP10 superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40. A este respecto, la sonda de PTEN y la sonda de CEP10 se pueden usar en combinación para determinar, por ejemplo, PTEN/CEP10, tal como un % de pérdida de PTEN/CEP10 superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50. Las sondas de ERG se pueden utilizar para determinar el % de 2 ±Edel superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 30. La sonda de MYCN se puede utilizar para determinar un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) tal como el % de ganancia de MYCN superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30. La sonda de MDM2 se puede utilizar para determinar un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) tal como el % de ganancia de MDM2 superior o igual a dos hasta inferior o igual a 20. La sonda NKX3.1 se puede utilizar para determinar un % de pérdida de NKX3.1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de NKX3.1 < 2), tal como el % de pérdida de NKX3.1 superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50. La sonda de separación de ETV1 se puede utilizar para determinar el % de ETV1 solo rojo (el % de solo rojo es el % de células con translocación o delección de ETV1), tal como un % de ETV1 solo rojo superior o igual a uno hasta inferior o igual a 20. La sonda P27 se puede utilizar para determinar un % de pérdida de P27 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de P27 < 2), tal como el % de pérdida de P27 superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50. La sonda de AURKA se puede utilizar para determinar un % de ganancia de AURKA (el % de ganancia es el % de células con números de copias de AURKA > 2), tal como el % de ganancia de AURKA superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20.

Si un paciente ha tenido una prostatectomía, la determinación de la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra indica que el paciente tiene un alto riesgo de recurrencia o metástasis, en cuyo caso los métodos anteriores pueden comprender además recomendar que el paciente consulte a su médico para un tratamiento inmediato para inhibir o prevenir la recurrencia o metástasis. Si un paciente ha sido o está siendo diagnosticado inicialmente de cáncer de próstata tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo, los métodos anteriores pueden comprender además recomendar que el paciente consulte a su médico para un tratamiento inmediato. Si un paciente ha sido o está siendo diagnosticado inicialmente de cáncer de próstata y el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente, los métodos anteriores pueden comprender además recomendar una vigilancia activa (por ejemplo, una biopsia cada seis meses hasta un año) o una espera vigilante (es decir, sin intervención activa).

Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden comprender además obtener un parámetro clínico, tal como un parámetro clínico seleccionado del grupo que consiste en una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de antígeno prostático específico (PSA), un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente. Los métodos anteriores pueden comprender además controlar a un paciente identificado con adenocarcinoma prostático agresivo durante el tratamiento repitiendo (a) y (b) durante un curso de tratamiento. Si el paciente ya se ha sometido a una prostatectomía radical, el tratamiento puede ser un tratamiento adyuvante. Como alternativa, los métodos anteriores pueden comprender además vigilar a un paciente identificado con adenocarcinoma prostático indolente repitiendo (a) y (b) periódicamente. Con respecto a los métodos anteriores, es posible que el paciente ya haya sido identificado con adenocarcinoma prostático indolente por otro método, tal como un método seleccionado del grupo que consiste en un examen histológico de una muestra de células prostáticas, un método para detectar/seleccionar en una muestra de orina un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo o indolente y un método para detectar/seleccionar en una muestra de sangre un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo o indolente.

En vista de lo anterior, de acuerdo con la presente invención, se proporciona también un método para identificar a un paciente con un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo. El método comprende (o consiste en) (a) poner en contacto una muestra del paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende tres, cuatro, cinco o seis sondas seleccionadas del grupo que consiste en MYC, FGFR1, ERG, PTEN, MYCN y MDM2 en condiciones de hibridación y (b) determinar la presencia de anomalías cromosómicas en la muestra. Los ejemplos de combinaciones de sondas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación (ii) MYC, FGFR1 y ERG, (iii) MYC, FGFR1, ERG y PTEN, (iv) MYC, FGFR1, ERG y MYCN, y (v) MYC, FGFR1, ERG y MDM2. De acuerdo con la presente divulgación, cuando se utiliza una combinación de sondas que

consisten en MYC y FGFR1, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 26 y/o un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1 y ERG, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 14, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 y/o un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y PTEN, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a ocho, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de pérdida homocigótica de PTEN superior o igual a 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y MYCN, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y MDM2, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a 10 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. El conjunto de sondas de (i) también puede consistir en, o cualquiera de los conjuntos de sondas de (ii)-(v) puede comprender además, una o más de una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27, una sonda específica de locus para ETV1 y una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea.

El método, de acuerdo con la presente invención, puede comprender además obtener un parámetro clínico, tal como un parámetro clínico seleccionado del grupo que consiste en una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de PSA, un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente. El método anterior puede comprender además controlar a un paciente identificado con adenocarcinoma prostático agresivo durante el tratamiento repitiendo (a) y (b) durante un curso de tratamiento. Si el paciente ya se ha sometido a una prostatectomía radical, el tratamiento puede ser un tratamiento adyuvante. Con respecto a los métodos anteriores, es posible que el paciente ya haya sido identificado con adenocarcinoma prostático agresivo por otro método, tal como un método seleccionado del grupo que consiste en un examen histológico de una muestra de células prostáticas, un método para detectar/seleccionar en una muestra de orina un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo y un método para detectar/seleccionar en una muestra de sangre un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo.

También se proporciona un método para identificar a un paciente con adenocarcinoma prostático indolente. De acuerdo con la presente invención, el método comprende (o consiste en) (a) poner en contacto una muestra del paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende tres, cuatro, cinco o seis sondas seleccionadas del grupo que consiste en una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG, una sonda específica de locus para PTEN, una sonda específica de locus para MYCN y una sonda específica de locus para MDM2 en condiciones de hibridación y (b) determinar la presencia de anomalías cromosómicas en la muestra. Los ejemplos de combinaciones de sondas de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación (ii) MYC, FGFR1 y ERG, (iii) MYC, FGFR1, ERG y PTEN, (iv) MYC, FGFR1, ERG y MYCN, y (v) MYC, FGFR1, ERG y MDM2. De acuerdo con la presente divulgación, cuando se utiliza una combinación de sondas que consisten en MYC y FGFR1, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos y/o un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 10 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1 y ERG, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 10 y/o un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y PTEN, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 10, un % de ERG

2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de pérdida homocigótica de PTEN superior o igual a 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y MYCN, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 18, un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos y/o un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. De acuerdo con la presente invención, cuando se utiliza una combinación de sondas que comprende (o consiste en) MYC, FGFR1, ERG y MDM2, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos y/o un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a tres indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo y nada de lo anterior indica que el paciente tiene adenocarcinoma prostático indolente. De acuerdo con la divulgación, el conjunto de sondas de (i) puede consistir además en una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27, una sonda específica de locus para MDM2, una sonda específica de locus para MYCN, una sonda específica de locus para ETV1 y/o una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. De acuerdo con la presente invención, cualquiera de los conjuntos de sondas de (ii)-(v) puede comprender además, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27, una sonda específica de locus para MDM2, una sonda específica de locus para MYCN, una sonda específica de locus para ETV1 y/o una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea.

El método, de acuerdo con la presente invención, puede comprender además obtener un parámetro clínico, tal como un parámetro clínico seleccionado del grupo que consiste en una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de PSA, un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente. El método anterior puede comprender además controlar a un paciente identificado con adenocarcinoma prostático agresivo durante el tratamiento repitiendo (a) y (b) durante un curso de tratamiento. Como alternativa, los métodos anteriores pueden comprender además vigilar a un paciente identificado con adenocarcinoma prostático indolente repitiendo (a) y (b) periódicamente. Con respecto a los métodos anteriores, es posible que el paciente ya haya sido identificado con adenocarcinoma prostático indolente por otro método, tal como un método seleccionado del grupo que consiste en un examen histológico de una muestra de células prostáticas, un método para detectar/seleccionar en una muestra de orina un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo o indolente y un método para detectar/seleccionar en una muestra de sangre un marcador de adenocarcinoma prostático agresivo o indolente.

La muestra puede ser cualquier muestra adecuada. Los ejemplos de muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, especímenes histológicos, cuyas secciones se pueden montar en portaobjetos. El espécimen puede ser de una prostatectomía radical, una biopsia (por ejemplo, una biopsia por punción), una resección transuretral de la próstata (TURP) y similares. La sección puede ser fijada con formalina y embebida con parafina (FFPE) y colocada en un portaobjetos de microscopio. Como alternativa, se puede utilizar una sección conservada por otros medios, tal como congelación, o se puede utilizar un espécimen de citología, tal como una muestra de sangre o una muestra de orina.

Si el paciente acaba de someterse a una prostatectomía radical, además de utilizar la próstata eliminada como una fuente de una muestra de células de la próstata, que se puede utilizar fresca o embebida en parafina y fijada con formalina, se puede utilizar otra muestra, tal como sangre u orina. Si el análisis de la muestra de acuerdo con un método descrito en el presente documento revela la presencia de al menos una anomalía cromosómica indicativa de un alto riesgo de adenocarcinoma prostático agresivo, por ejemplo, recurrencia, metástasis y posiblemente incluso la muerte por enfermedad, puede ser beneficioso para el paciente recibir tratamiento inmediato para prevenir o inhibir, la progresión de la enfermedad, tal como una terapia adyuvante.

Si el paciente está recibiendo o ha recibido, un diagnóstico inicial de cáncer de próstata, se puede utilizar una muestra, tal como una muestra obtenida de una biopsia de la próstata, sangre u orina. Si el análisis de la muestra de acuerdo con un método descrito en el presente documento revela la presencia de al menos una anomalía cromosómica indicativa de un alto riesgo de adenocarcinoma prostático agresivo, puede ser beneficioso para el paciente recibir inmediatamente una prostatectomía radical, sola o en combinación adicional con uno u otros tratamientos más. Como alternativa, si el análisis de la muestra de acuerdo con un método descrito en el presente documento no revela ninguna anomalía cromosómica, puede ser beneficioso para el paciente ser controlado o sometido a vigilancia activa.

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

En vista de lo anterior, una sonda para detectar un parámetro que implica MYC, por ejemplo, tal como el número de copias de MYC (por ejemplo, ganancia), una proporción del número de copias que implica MYC (por ejemplo, ganancia de MYC/CEP8) o el porcentaje de ganancia de MYC, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q24 del cromosoma 8 (8q24), que comprende el gen MYC. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 8q24, una región adyacente situada en el lado telomérico de 8q24 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 820 kb, tal como 821 kb, de 8q24 y está centrada en el gen MYC. Una sonda para detectar un parámetro que implica MYC por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen MYC (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "MYC" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica MYC, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica FGFR1, por ejemplo, tal como el número de copias de FGFR1 (por ejemplo, pérdida o ganancia), una proporción del número de copias que implica FGFR1 (por ejemplo, pérdida de FGFR1/CEP8 o ganancia de FGFR1/CEP8), o el porcentaje de pérdida o ganancia de FGFR1, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con las regiones p11-12 del cromosoma 8 (8p11-12), que comprende el gen FGFR1. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 8p11-12, una región adyacente situada en el lado telomérico de 8p11-12 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 530 kb, tal como 531 kb, de 8p12 y está centrada en el gen FGFR1. Una sonda para detectar un parámetro que implica FGFR1 por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen FGFR1 (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "FGFR1" se puede utilizar en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica FGFR1, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica PTEN, por ejemplo, tal como el número de copias de PTEN (por ejemplo, pérdida de PTEN o pérdida homocigótica de PTEN), una proporción del número de copias que implica PTEN (por ejemplo, pérdida de PTEN/CEP10) o el porcentaje de pérdida de PTEN, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q23 del cromosoma 10 (10q23.31), que comprende parte del gen PTEN y una región adyacente situada sobre el lado telomérico de 10q23. Una sonda PTEN preferida cubre aproximadamente 340 -350 kb, tal como 344 kb, de 10q23.31. Las regiones adyacentes de la sonda del gen PTEN incluyen los marcadores STS D10S215 sobre el lado centromérico y SHGC-77962 sobre el lado telomérico. Una sonda para detectar un parámetro que implica PTEN por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen PTEN o una región adyacente del gen PTEN (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "PTEN" se puede utilizar en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica PTEN, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de homocigosidad y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica ERG, por ejemplo, tal como un reordenamiento, solo o en combinación adicional con las deleciones cromosómicas intersticiales 5' del gen ERG, por ejemplo, porcentaje 2+Edel, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q22 del cromosoma 21 (21q22), que comprende el gen ERG. Una sonda de ERG preferida es una sonda separada, es decir, un par de sondas, una de las cuales es telomérica y la otra de las cuales es centromérica al gen ERG y detecta reordenamientos que implican el gen ERG y deleciones cromosómicas adyacentes. Una sonda para detectar un parámetro que implica ERG por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen ERG (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "ERG" se puede utilizar en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un

parámetro que implica ERG, ya sea un reordenamiento, por ejemplo, 2+Edel y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda de enumeración de cromosomas para detectar un parámetro que implica el cromosoma 8, tal como el número de copias del cromosoma 8 (por ejemplo, ganancia o pérdida) o una proporción del número de copias que implica un gen (es decir, un gen sobre el cromosoma 8) y el cromosoma 8 (por ejemplo, la ganancia de FGFR1/CEP8 o la pérdida de FGFR1/CEP8), mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con el ADN α -satélite en la región de 8p11.1-q11.1 en el centrómero del cromosoma 8. Como alternativa, la sonda de enumeración de cromosomas se puede hibridar con un brazo del cromosoma 8, siempre que la sonda represente con precisión el estado del cromosoma 8 con respecto a la ganancia del número de copias o la pérdida del número de copias.

Una sonda de enumeración de cromosomas para detectar un parámetro que implica el cromosoma 10, tal como el número de copias del cromosoma 10 (por ejemplo, pérdida) o una proporción del número de copias que implica un gen (es decir, un gen sobre el cromosoma 10) y el cromosoma 10 (por ejemplo, la pérdida de PTEN/CEP10), mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con el ADN α -satélite en la región de 10p11.1-q11.1 en el centrómero del cromosoma 10. Como alternativa, la sonda de enumeración de cromosomas se puede hibridar con un brazo del cromosoma 10, siempre que la sonda represente con precisión el estado del cromosoma 10 con respecto a la ganancia del número de copias o la pérdida del número de copias.

Una sonda para detectar un parámetro que implica AURKA, tal como el número de copias de AURKA (por ejemplo, ganancia de AURKA), una proporción del número de copias que implica AURKA o el porcentaje de ganancia de AURKA, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q13 del cromosoma 20 (20q13), que comprende el gen AURKA. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 20q13, una región adyacente situada en el lado telomérico de 20q13 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 638 -858 kb, tal como 648 kb, de 20q13 y está centrada en el gen AURKA. Una sonda para detectar un parámetro que implica AURKA por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen AURKA (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "AURKA" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica AURKA, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica NKX3.1, tal como el número de copias de NKX3.1 (por ejemplo, la pérdida de NKX3.1), una proporción del número de copias que implica NKX3.1 o el porcentaje de pérdida de NKX3.1, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p21 del cromosoma 8 (8p21), que comprende el gen NKX3.1. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 8p21, una región adyacente situada en el lado telomérico de 8p21 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 518-538 kb, tal como 528 kb, de 8p21 y está centrada en el gen NKX3.1. Una sonda para detectar un parámetro que implica NKX3.1 por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen NKX3.1 (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "NKX3.1" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica NKX3.1, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica P27, tal como el número de copias de P27 (por ejemplo, la pérdida de P27), una proporción del número de copias que implica P27 o el porcentaje de pérdida de P27, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p13-12 del cromosoma 12 (12p13 -12), que comprende el gen P27. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 12p13-12, una región adyacente situada en el lado telomérico de 12p13-12 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 382-412 kb, tal como 392 kb, de 12p13-12 y está centrada en el gen P27. Una sonda para detectar un parámetro que implica P27 por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen P27 (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "P27" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica P27, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica MDM2, tal como el número de copias de MDM2 (por ejemplo, la ganancia de MDM2), una proporción del número de copias que implica MDM2 o el porcentaje de ganancia de MDM2, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región q15 del cromosoma 12 (12q15), que comprende el gen MDM2. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 12q15, una región adyacente situada en el lado telomérico de 12q15 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 210 kb, tal como 209 kb, de 12q15 y está centrada en el gen MDM2. Una sonda para detectar un parámetro que implica MDM2 por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen MDM2 (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "MDM2" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica MDM2, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica MYCN, tal como el número de copias de MYCN (por ejemplo, ganancia de MYCN), una proporción del número de copias que implica MYCN, o el porcentaje de ganancia de MYCN, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p24 del cromosoma 2 (2p24), que comprende el gen MYCN. La sonda se puede hibridar también con una región adyacente situada en un lado centromérico de 2p24, una región adyacente situada en el lado telomérico de 2p24 o ambas. Una sonda preferida cubre aproximadamente 195-205 kb, tal como 200 kb, de 2p24 y está centrada en el gen MYCN. Una sonda para detectar un parámetro que implica MYCN por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen MYCN (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "MYCN" se utiliza en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica MYCN, ya sea el número de copias, la proporción del número de copias, el porcentaje de ganancia y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

Una sonda para detectar un parámetro que implica ETV1, por ejemplo, tal como un reordenamiento, mediante hibridación *in situ*, tal como FISH, preferentemente se hibrida con la región p21 del cromosoma 7 (7p21), que comprende el gen ETV1. Una sonda de ETV1 preferida es una sonda separada, es decir, un par de sondas, una de las cuales es telomérica y la otra de las cuales es centromérica al gen ETV1 y detecta reordenamientos que implican el gen ETV1 y deleciones cromosómicas adyacentes. Una sonda para detectar un parámetro que implica ETV1 por otro método puede ser más pequeña, incluso sustancialmente más pequeña, que la sonda utilizada para la hibridación *in situ*, tal como FISH, en cuyo caso la sonda se hibrida preferentemente con una secuencia dentro del gen ETV1 (la información de la secuencia está disponible online de fuentes tales como GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) y GeneCards® (www.genecards.org)). "ETV1" se puede utilizar en el presente documento para referirse a cualquiera y a todas las sondas que se pueden utilizar para determinar un parámetro que implica ETV1, ya sea un reordenamiento y similares, independientemente del método particular utilizado para determinar el parámetro.

El uso de sondas como se explicó anteriormente se aplica a los métodos, sondas y kits descritos en el presente documento. Las descripciones de las sondas como se exponen al comienzo de la "Descripción detallada" se aplica también a los métodos, sondas y kits descritos en el presente documento.

El método anterior se puede llevar a cabo utilizando cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, el método anterior se lleva a cabo utilizando la hibridación *in situ*, tal como la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Preferentemente, cada sonda está etiquetada de manera detectable con una etiqueta distinta, tal como un fluoróforo distinto. Como alternativa, se puede utilizar la detección de nucleótidos radiomarcados por hibridación (*in situ* (ISH)), la detección por hibridación cromomérica y similares, tal como se describe en el presente documento.

Cuando los métodos anteriores se llevan a cabo por la hibridación *in situ*, en la que cada sonda está etiquetada de manera detectable con una etiqueta distinta, tal como por FISH, en la que cada sonda está marcada con un fluoróforo distinto, los métodos se pueden llevar a cabo en una muestra de células de próstata (que son frescas, tales como células frescas de una biopsia de la próstata (se pueden cultivar células frescas durante 1-3 días y se puede añadir un bloqueador, tal como Colcemid, al cultivo para bloquear las células en la metafase, durante la cual los cromosomas están muy condensados y pueden ser visualizados), congelados o fijados (por ejemplo, fijados en formalina y embebidos en parafina), tratados (por ejemplo, con RNasa y pepsina) para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, ADN) y reducir la unión no específica y después se someten a hibridación con una o más sondas, lavado para eliminar cualquier sonda no unida y detección de las sondas hibridadas. Por ejemplo, una suspensión celular se puede aplicar como una capa única sobre un portaobjetos y la densidad celular se puede medir mediante un microscopio de contraste de luz o fase. Las células se pueden obtener también de otras fuentes, tales como fluidos corporales, por ejemplo, orina o semen, conservados en fijadores, como el metanol-ácido

acético (reactivo de Carnoy), y aplicados sobre un portaobjetos o soporte similar para el examen y análisis microscópico.

5 Los portaobjetos con especímenes histológicos FFPE (secciones) se pueden hornear a aproximadamente 56-60 °C durante aproximadamente 2-24 horas, después se pretratan dos a tres veces en Hemo-De (Scientific Safety Solvents) o Xylene durante aproximadamente 5-10 minutos cada uno a temperatura ambiente, se enjuagan dos veces en etanol al 100 % durante aproximadamente un minuto cada uno a temperatura ambiente. Los portaobjetos se pueden incubar después en una solución de pretratamiento (1xSSC, pH 7,0) a aproximadamente 75-85 °C durante aproximadamente 35-50 minutos, se enjuagan durante aproximadamente tres minutos en agua desionizada, 10 se incuban durante aproximadamente 17-27 minutos en pepsina al 0,15 % en una solución de HCl 0,1N a aproximadamente 37 °C, y se enjuagan nuevamente durante aproximadamente tres minutos en agua desionizada. Los portaobjetos se pueden deshidratar durante un minuto cada uno en etanol al 70 %, 85 % y 100 % y después se secan al aire. Se pueden añadir diez microlitros de una mezcla de hibridación de la sonda (tampón LSI®, ADN bloqueante, sondas marcadas) para separar los portaobjetos de los especímenes separados y se pueden aplicar 15 cubreobjetos y sellarlos con cemento de caucho. Los portaobjetos se pueden codenaturalizar durante aproximadamente cinco minutos a aproximadamente 71-75 °C y se pueden hibridar durante aproximadamente 4-24 horas a aproximadamente 37 °C en un ThermoBrite (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL). Después de la hibridación, el cemento de caucho se puede desprender y los cubreobjetos se pueden eliminar por remojo en 1xSSC, pH 7,0, durante aproximadamente 3-5 minutos. Después los cubreobjetos se pueden colocar en una 20 solución de lavado de 2xSSC/0,3 % de NP-40 precalentada a aproximadamente 73 °C durante aproximadamente 2-5 minutos. Después los portaobjetos se pueden poner en 1xSSC, pH 7,0, durante aproximadamente un minuto como un enjuague final. Después los soportes que llevan las muestras se pueden contrastar con un tinte de unión al ADN nuclear, tal como 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ya sea en solución o al secar la muestra en la oscuridad. En el último caso, las muestras se contrastan con aproximadamente 10 µl de DAPI, y se colocan nuevos cubreobjetos 25 sobre las muestras. A continuación, las muestras se pueden ver o almacenar, por ejemplo, a aproximadamente -20 °C.

Antes de la detección, las muestras de células se pueden preseleccionar opcionalmente basándose en anomalías citológicas aparentes. La preselección identifica las células sospechosas, permitiendo de esta manera que la 30 selección se focalice en esas células. La preselección permite una selección más rápida y aumenta la posibilidad de que no se pierda un resultado positivo.

Un área que evidencia algún nivel de displasia o una lesión sospechosa se puede localizar utilizando el filtro DAPI a bajo aumento e inspeccionar a fondo para la presencia de núcleos que albergan números de copias anormales de cualquier sonda. En una célula normal, se detectarán dos copias de una sonda dada. En una célula anormal, se 35 detectarán más o menos copias de una sonda dada. Las áreas con los cambios de números de copias más significativos se seleccionan preferentemente para la enumeración. Siempre que sea posible, se seleccionan aproximadamente 3-10 áreas anormales y, dentro de cada área anormal, se analizan 10 núcleos aleatorios con alta potencia (64 x o 100 x objetivo). Preferentemente, los núcleos no se superponen y albergan señales suficientemente 40 brillantes.

Como alternativa, las células para la detección pueden elegirse independientemente de las características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se superponen en un área o áreas dadas en un portaobjetos de microscopio se pueden evaluar para determinar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Como un 45 ejemplo adicional, las células sobre el portaobjetos, por ejemplo, las células que muestran morfología alterada, en el orden de al menos aproximadamente 50, y más preferentemente al menos aproximadamente 100, en el número que aparece en orden consecutivo sobre un portaobjetos de microscopio se pueden elegir para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

50 Por lo tanto, dichos métodos comprenden poner en contacto una muestra obtenida de un paciente, por ejemplo, una muestra de células de próstata, sangre, orina o ácidos nucleicos, con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable como se ha descrito anteriormente en condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación permiten (o promueven) que las sondas se unan selectivamente con sus secuencias de ácidos nucleicos objetivo y formen complejos de hibridación estables. Dichos métodos comprenden además detectar la formación de los 55 complejos de hibridación y contar el número de complejos de hibridación. En vista del número de complejos de hibridación, el método comprende determinar el número de copias de una o más anomalías cromosómicas. Un número de copias de una anomalía cromosómica se puede comparar con un corte predeterminado, tal como un corte dentro de un rango proporcionado en el presente documento o un corte específico proporcionado en el presente documento, en donde un número de copias mayor que el corte predeterminado (es decir, para una ganancia) o un número de copias inferior que el corte predeterminado (es decir, para una pérdida), según sea 60 apropiado, indica que un paciente tiene o no tiene cáncer de próstata agresivo/indolente como se describe en el presente documento.

Aunque la desparafinación, el pretratamiento, la tinción y el lavado de portaobjetos de rutina se puede realizar 65 también de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, el uso de un sistema automatizado, sin embargo, tal como el Proceso VP 2000 (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL), reduce la cantidad de tiempo necesario para

preparar los portaobjetos para su evaluación. Los portaobjetos se pueden preparar en grandes lotes (por ejemplo, 50 portaobjetos), en oposición a pequeños lotes (por ejemplo, 4 portaobjetos) cuando se usan recipientes de Coplin estándar para el lavado de posthibridación. Además, la puntuación de las diapositivas se puede automatizar totalmente utilizando la formación de imágenes automatizada, reduciendo de esta manera la cantidad de tiempo práctico requerido para el análisis de especímenes. La automatización completa también permite la enumeración de señales y el análisis de datos posterior utilizando un algoritmo de formación de imágenes que captura más células anormales con más frecuencia y de manera consistente.

Otros métodos ya conocidos en la técnica o actualmente bajo desarrollo pueden requerir o preferir el uso de una muestra de células de próstata que es distinto de las células fijadas en formalina y embebidas en parafina, por ejemplo, células frescas o congeladas, células homogenizadas, células lisadas o ácidos nucleicos aislados o purificados (por ejemplo, una "muestra de células de próstata" tal como ADN) de células de próstata ("muestra de células de próstata" como se utiliza en el presente documento pretende comprender todas las formas de una muestra de células de próstata que permiten la determinación del número de copias y la ganancia/pérdida). Los núcleos también se pueden extraer de secciones gruesas de especímenes embebidos en parafina para reducir los artefactos de truncamiento y eliminar el material embebido extraño. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se cosechan y procesan antes de la hibridación utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Dicho procesamiento incluye típicamente el tratamiento con proteasas y la fijación adicional en una solución de aldehído, tal como formaldehído.

Los ejemplos de métodos que se pueden utilizar en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), Q-PCR en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA), escaneo densitométrico de productos de PCR, PCR digital, opcionalmente con la preamplificación del (de los) gen(es) y/o la(s) región(es) cromosómica(s) para la(s) cual(es) el (los) número(s) de copias debe(n) ser determinado(s) (véase, por ejemplo, Vogelstein et al., PNAS USA 96: 9236-9241 (1999); la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2005/0252773; y la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2009/0069194), hibridación genómica comparativa (CGH; véase, por ejemplo, Ka-Ilioniemi et al., Science 258: 818-821 (1992); y la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 93/18186), microsatélite o análisis de alelotipos de Southern, las inmunotransferencias por puntos, las matrices, micromatrices (Carter, Nature Genetics Supplement 39: S16-S21 (julio de 2007)), hibridación de sonda amplificable multiplex (MAPH), amplificación de sonda dependiente de la ligadura multiplex (MLPA; véase, por ejemplo, Schouten et al., Nucleic Acids Res. 30: e 57 (2002)), la cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (dHPLC; Kumar et al., J. Biochem. Biophys. Methods 64(3): 226-234 (2005)), la hibridación dinámica de alelo específico (DASH), que mide las longitudes de sondas fluorescentes en ADN genómico peinado (Herrick et al., PNAS 97(1): 222-227 (2000)), pirosecuenciación de consulta de referencia (RQPS; Liu et al., Cold Spring Harb. Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot5491 (2010)), el mapeo de los extremos de fósidos (tecnología basada en capilares), secuenciación microelectroforética y de nanoporos (véase, por ejemplo, Service, Science 311: 1544-1546 (2006); y Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5: 335-344 (2004)) y similares.

La desnaturalización de objetivos de ácidos nucleicos para el análisis por hibridación *in situ* y métodos similares se hace típicamente de tal manera que se preserve la morfología celular. Por ejemplo, el ADN cromosómico se puede desnaturalizar mediante pH elevado, calor (por ejemplo, temperaturas desde aproximadamente 70-95 °C), disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida) y combinaciones de los mismos. Las sondas, por otra parte, se pueden desnaturalizar por calor en cuestión de minutos.

Después de la desnaturalización, se puede llevar a cabo la hibridación. Las condiciones para hibridar específicamente las sondas a sus objetivos de ácidos nucleicos incluyen las combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un procedimiento de hibridación dado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia. Dichas condiciones implican típicamente una temperatura controlada, una fase líquida y un contacto entre una sonda y un objetivo. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores que incluyen la concentración de la sonda, la longitud del objetivo, el contenido de G-C del objetivo y la sonda, la composición del disolvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder el contacto de las sondas con los objetivos. Como alternativa, la sonda y el objetivo se pueden someter a condiciones de desnaturalización juntos mientras que están en contacto entre sí o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede lograr con la incubación posterior de la sonda/muestra en, por ejemplo, una fase líquida de aproximadamente una mezcla de proporción de volumen 50:50 de 2-4 x SSC y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 hasta aproximadamente 55° C durante un tiempo que está ilustrativamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 96 horas, o más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 32 hasta aproximadamente 40° C durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 16 horas. Para aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente de bloqueo, tal como un ácido nucleico de bloqueo no etiquetado, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.756.696. Se pueden emplear otras combinaciones para hibridar específicamente las sondas con sus objetivos de ácidos nucleicos presentes en la muestra, como sería evidente para un experto en la materia. Los protocolos de hibridación se describen, por ejemplo, en Pinket et al., PNAS USA 85: 9138-9142 (1988); *In situ Hybridization Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994); y Kallioniemi et al., PNAS USA

89: 5321-5325 (1992).

Una vez completado un periodo de incubación adecuado, la unión no específica de las sondas cromosómicas con el ADN de la muestra se puede eliminar por una serie de lavados. La temperatura y las concentraciones de sal se eligen de manera adecuada para una rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica y se puede determinar hibridando sistemáticamente las sondas con las muestras de composición genética conocida. En general, los lavados de alta rigurosidad se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80° C con aproximadamente 0,2 x hasta aproximadamente 2 x SSC y aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 1 % de un detergente no iónico, tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de menor rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura más baja con una concentración aumentada de sal.

Cuando se usan sondas o composiciones de sondas marcadas por fluoróforo, el método de detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Cualquier método de formación de imágenes microscópicas adecuado puede usarse junto con los métodos descritos en el presente documento para observar múltiples fluoróforos. En el caso en que se emplee microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden ver bajo luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiado(s). Los sistemas de formación de imágenes digitales automatizados, tales como los sistemas MetaSystems, BioView o Applied Imaging, se pueden utilizar alternativamente, junto con algoritmos de enumeración de señales y de adquisición de datos.

Dependiendo del método empleado, se puede utilizar un sistema de análisis de imágenes digitales para facilitar la visualización de los resultados y para mejorar la sensibilidad de la detección de pequeñas diferencias en la intensidad de la fluorescencia. Un sistema ejemplar es el escáner de portaobjetos automático BioView con un software de análisis de imágenes. Otro sistema ejemplar es QUIPS (un acrónimo para sistema de procesamiento de imágenes cuantitativo), que es un sistema de análisis de imágenes automatizado basado en un microscopio de fluorescencia estándar equipado con una etapa automatizada, control de enfoque y rueda de filtro (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY). La rueda de filtro se monta en la trayectoria de excitación de fluorescencia del microscopio para la selección de la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en el bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples tintes sin cambio de registro de imágenes. El microscopio tiene dos puertos de cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, CA) para la visualización de imágenes de video de alta velocidad, que se utiliza para encontrar áreas interesantes en un portaobjetos así como para el enfoque. El otro puerto de la cámara tiene una cámara CCD enfriada (modelo 200 por Photometrics Ltd., Tucson, AZ), que se utiliza para la actual adquisición de imágenes a una resolución y sensibilidad elevadas. La cámara de CCD enfriada se conecta a una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un bus VME. La adquisición entera de imágenes multicolores se controla utilizando un paquete de software de procesamiento de imágenes SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Países Bajos).

En la matriz de CGH (aCGH) las sondas se inmovilizan en distintas ubicaciones sobre un sustrato y no están etiquetadas (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente internacional n.º WO 96/17958). En cambio, los ácidos nucleicos de la muestra, que comprenden ácido(s) nucleico(s) objetivo, se etiquetan. O bien los ácidos nucleicos de la muestra se etiquetan antes de la hibridación o los complejos de hibridación se etiquetan de manera detectable. En una aCGH de dos colores o multicolor, la matriz de la sonda se hibrida simultánea o secuencialmente con dos o más colecciones de ácidos nucleicos etiquetados de manera diferente.

Los métodos anteriores se pueden utilizar para estratificar a los pacientes en aquellos que necesitan tratamiento agresivo (por ejemplo, cirugía, terapia hormonal, radiación o, en caso de postcirugía (por ejemplo, prostatectomía simple o radical), tratamiento con adyuvante (por ejemplo, privación de andrógenos)), y aquellos que no necesitan tratamiento agresivo, tales como aquellos que podrían someterse a una vigilancia activa o espera vigilante. Los métodos también se pueden utilizar para controlar la progresión o la recurrencia del cáncer de próstata, para determinar la candidatura de un paciente para el tratamiento y para controlar la eficacia del tratamiento profiláctico o terapéutico (por ejemplo, terapia hormonal o de radiación) del cáncer de próstata. Los resultados obtenidos con los métodos de detección basados en la orina o en la sangre se pueden confirmar con los métodos anteriores.

Adicionalmente, de acuerdo con la invención, se proporciona en el presente documento un método para controlar la progresión del cáncer de próstata en un sujeto. De manera óptima, el método comprende las etapas de:

- (a) determinar las anomalías cromosómicas en una muestra de un sujeto;
- (b) determinar los niveles de anomalías cromosómicas en una muestra posterior del sujeto; y
- (c) comparar los niveles de anomalías cromosómicas según se determina en la etapa (b) con los niveles de anomalías cromosómicas según se determina en la etapa (a), en donde si los niveles en la etapa (b) no cambian o son desfavorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces se determina que el cáncer de próstata ha continuado, progresado o empeorado en el sujeto. Por comparación, si los niveles como se determina en la etapa (b) son favorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa

(a), entonces se determina que el cáncer de próstata se ha interrumpido, ha retrocedido o ha mejorado en el sujeto.

5 Opcionalmente, el método comprende además comparar los niveles de anomalías cromosómicas según se determina en la etapa (b), por ejemplo, con niveles predeterminados. Además, opcionalmente el método comprende tratar al sujeto, por ejemplo, con una o más composiciones farmacéuticas, radiación y/o terapia hormonal, durante un periodo de tiempo si la comparación muestra que los niveles según se determina en la etapa (b), por ejemplo, están alterados desfavorablemente con respecto a los niveles predeterminados.

10 Por lo tanto, el método puede comprender además pronosticar o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente de quien se obtuvo la muestra de ensayo. Si el método comprende además evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente de quien se obtuvo la muestra de ensayo, el método opcionalmente comprende además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según se necesite para mejorar la eficacia. El método se puede adaptar para el uso en un sistema automatizado o un sistema semiautomatizado.

15 En general, un nivel predeterminado se puede emplear como punto de referencia contra el cual evaluar los resultados obtenidos después de evaluar una muestra de células de próstata para anomalías cromosómicas. En general, al hacer dicha comparación, el nivel predeterminado se obtiene ejecutando un ensayo particular un número suficiente de veces y bajo las condiciones apropiadas tales como un enlace o asociación de una anomalía cromosómica particular (presencia o nivel) con una etapa particular o se puede hacer un criterio de evaluación de una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, preeclampsia o enfermedad cardiovascular) o con indicios particulares. Típicamente, el nivel predeterminado se obtiene con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos).

25 En particular, con respecto a un nivel predeterminado como se emplea para controlar la progresión y/o tratamiento de la enfermedad, la anomalía cromosómica (presencia o nivel) puede ser "sin cambios", "favorable" (o "alterado favorablemente") o "desfavorable" (o "alterado desfavorablemente"). "Elevado" o "aumentado" se refiere a un nivel de anomalía cromosómica en una muestra de células de próstata que es más alto que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado) o es más alto que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o basal). El término "disminuido" o "reducido" se refiere a un nivel de anomalía cromosómica en una muestra de células de próstata que es más bajo que un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado) o es más bajo que otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o basal). El término "alterado" se refiere a un nivel de anomalía cromosómica en una muestra de células de próstata que está alterada (aumentada o disminuida) en un nivel o intervalo típico o normal (por ejemplo, un nivel predeterminado) o en otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, una muestra anterior o basal). El nivel o intervalo típico o normal para una anomalía cromosómica dada se define de acuerdo con la práctica estándar.

30 Además, la presente divulgación también se refiere a métodos para determinar si un sujeto predispuesto a o que padece cáncer de próstata se beneficiará del tratamiento. En particular, la divulgación se refiere a métodos y productos de diagnóstico complementarios. Por lo tanto, el método puede abarcar además seleccionar o identificar candidatos para la terapia.

35 Por lo tanto, en realizaciones particulares, la divulgación también proporciona un método para determinar si un sujeto que tiene, o que está en riesgo de, cáncer de próstata es un candidato para la terapia. En general, el sujeto es uno que ha experimentado algún síntoma de la enfermedad o que ha sido diagnosticado actualmente con, o que está en riesgo de, una enfermedad de este tipo y/o que demuestra niveles desfavorables de anomalías cromosómicas, tal como se describe en el presente documento.

40 El método comprende opcionalmente un ensayo como se describe en el presente documento, donde los niveles de anomalías cromosómicas se evalúan antes y después del tratamiento de un sujeto. La observación de niveles desfavorables de anomalías cromosómicas después del tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará de recibir tratamiento adicional o continuado, mientras que la observación de niveles favorables de anomalías cromosómicas después del tratamiento confirma que el sujeto se beneficiará de recibir un tratamiento adicional o continuado. Esta confirmación ayuda con la gestión de estudios clínicos y la provisión de una mejor atención del paciente.

Sondas

45 Se proporciona un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable. El conjunto de sondas es:

De acuerdo con la presente divulgación, (i) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que consiste en una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para FGFR1, De acuerdo con la presente invención, (ii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1,

- De acuerdo con la presente divulgación, (iii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27,
- 5 De acuerdo con la presente divulgación, (iv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda específica de locus para PTEN y una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8,
- De acuerdo con la presente invención, (v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1,
- 10 De acuerdo con la presente divulgación, (vi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1,
- De acuerdo con la presente invención, (vii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1,
- 15 De acuerdo con la presente divulgación, (viii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN,
- De acuerdo con la presente divulgación, (ix) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2,
- 20 De acuerdo con la presente divulgación, (x) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1 y una sonda específica de locus para FGFR1,
- 25 De acuerdo con la presente divulgación, (xi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN,
- De acuerdo con la presente invención, (xiii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27 o
- 30 De acuerdo con la presente divulgación, (xiv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para AURKA, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC y una sonda de separación para ERG.
- 35 En otra realización de la presente invención, el conjunto de sondas comprende (o consiste en) una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para MYC, una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable para FGFR1 y una sonda de separación, etiquetada de manera detectable para ERG. El conjunto de sondas puede comprender además una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para PTEN, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para MYCN, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para MDM2, una sonda de enumeración de cromosomas etiquetada de manera detectable para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas etiquetada de manera detectable para el cromosoma 10, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para AURKA, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para P27, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para ETV1 y una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea.
- 40 Un ejemplo de una sonda MYC es LSI MYC SpectrumAqua Probe, que tiene aproximadamente 821 kb de longitud y está disponible de Abbott Molecular, Inc. Una sonda de MYC más pequeña, que tiene aproximadamente 120 kb de longitud, está también disponible de Abbott Molecular, Inc., como LSI C-MYC SpectrumOrange Probe.
- Un ejemplo de una sonda de FGFR1 es LSI FGFR1 SpectrumRed Probe, que tiene aproximadamente 531 kb de longitud y está disponible de Abbott Molecular, Inc.
- 55 Un ejemplo de una sonda para ERG es una sonda ERG Cen, que tiene aproximadamente 209 kb de longitud. Otro ejemplo de una sonda para ERG es una sonda ERG Tel, que tiene aproximadamente 561 kb de longitud. Ambas muestras están disponibles de Abbott Molecular, Inc.
- 60 Un ejemplo de una sonda PTEN es la sonda LSI PTEN SpectrumOrange, que tiene aproximadamente 344 kb de longitud y está disponible de Abbott Molecular, Inc. Otro ejemplo de una sonda PTEN es la sonda LSI PTEN SpectrumGold, que tiene aproximadamente 344 kb de longitud y está disponible de Abbott Molecular, Inc.
- 65 Una sonda para MYCN, que tiene aproximadamente 200 kb de longitud, está también disponible de Abbott Molecular, Inc.

Un ejemplo de una sonda MDM2 es la sonda LSI MDM2 SpectrumOrange, que tiene aproximadamente 209 kb de longitud y está disponible de Abbott Molecular, Inc.

Un ejemplo de una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8 es CEP8® SpectrumAqua, que está también disponible de Abbott Molecular, Inc. CEP8® se hibrida con el ADN α -satélite en la región de 8p11.1-q11.1 en el centrómero del cromosoma 8.

Un ejemplo de una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10 es CEP10® SpectrumGreen, que está también disponible de Abbott Molecular, Inc. CEP10® se hibrida con el ADN α -satélite en la región de 10p11.1-q11.1 en el centrómero del cromosoma 10.

Una sonda para AURKA, que tiene aproximadamente 648 kb de longitud, está también disponible de Abbott Molecular, Inc.

Una sonda para NKX3.1, que tiene aproximadamente 528 kb de longitud, está también disponible de Abbott Molecular, Inc.

Una sonda para P27, que tiene aproximadamente 392 kb de longitud, está también disponible de Abbott Molecular, Inc.

Los ejemplos de sondas para ETV1 incluyen la sonda LSI ETV1 (Cen) SpectrumGreen, que tiene aproximadamente 605 kb de longitud y se hibrida en 5' con el gen ETV1 y la sonda LSI ETV1 (Tel) SpectrumRed, que tiene aproximadamente 560 kb de longitud y se hibrida en 3' con el gen ETV1. Ambas muestras están disponibles de Abbott Molecular, Inc.

Las sondas enumeradoras de cromosomas (CEP) y las sondas específicas de locus que se dirigen a una región o subregión del cromosoma se pueden obtener comercialmente o prepararse fácilmente por los expertos en la materia. Dichas sondas se obtienen comercialmente de Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) o Cytocell (Oxfordshire, UK). Se pueden preparar las sondas cromosómicas, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos y proteínas (PNA), ADN humano clonado tal como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales de PI (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Una región de interés se puede obtener por medio de amplificación o clonación por PCR. En otra realización, las sondas cromosómicas pueden ser sondas de oligonucleótidos. Como alternativa, se pueden preparar las sondas cromosómicas sintéticamente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Cuando se desea que se dirijan a un locus de gen particular, se pueden preferir las sondas que se hibridan a lo largo de la longitud entera del gen objetivo, aunque no se requiera. Se puede diseñar una sonda específica de locus para hibridarse con un oncogén o gen supresor de tumores, cuya aberración genética está correlacionada con la metástasis, por ejemplo, MYC.

Se pueden preparar las sondas por cualquier método conocido en la técnica. Las sondas pueden sintetizarse o producirse de manera recombinante. Dichas sondas pueden variar en longitud de aproximadamente 25.000 pares de bases hasta aproximadamente 800.000 pares de bases.

Preferentemente, las sondas se etiquetan de manera detectable y cada sonda se etiqueta de manera distinta. Preferentemente, las sondas se etiquetan de manera detectable con fluoróforos y cada sonda está etiquetada de manera distinta. Los ejemplos de fluoróforos preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácido 7-amino-4-metilcumarina-3-acético (AMCA), 5-carboxi-X-rodamina, 6-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), ácido 7-dietil-aminocumarina-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-isotiocianato, tetrametilrodamina-6-isotiocianato, 5-carboxitetrametilrodamina, 6-carboxitetrametilrodamina, ácido 7-hidroxycumarina-3-carboxílico, ácido N-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico, eosina-5-isotiocianato, eritrosina-5-isotiocianato, SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.), TEXAS RED (Molecular Probes, Inc.), amarillo Lucifer y azul acetilazida CASCADE (Molecular Probes, Inc.). La etiqueta particular utilizada no es crítica; deseablemente, sin embargo, la etiqueta particular no interfiere con la hibridación *in situ* de la sonda y la detección de la etiqueta sobre cualquier otra sonda. La etiqueta deseablemente es detectable en un número de copias tan bajo como sea posible para maximizar la sensibilidad del ensayo y ser detectable por encima de cualquier señal de fondo. También deseablemente, la etiqueta proporciona una señal altamente localizada, proporcionando así un alto grado de resolución espacial.

La unión de fluoróforos a sondas de ácidos nucleicos se conoce bien en la técnica y se puede lograr por cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir de manera covalente a un nucleótido particular, por ejemplo, y el nucleótido etiquetado se puede incorporar en la sonda utilizando técnicas estándar como la traslación de mella, cebado aleatorio (Rigby et al., J. Mol. Biol. 113: 237 (1997)), etiquetado de PCR, etiquetado final, etiquetado directo por modificación química de restos particulares, tales como restos de citosina (patente de EE. UU. n.º 5.491.224) y similares. Como alternativa, el fluoróforo se puede unir de manera covalente a nucleótidos con brazos enlazadores

activados, que se han incorporado en la sonda, por ejemplo, por medio de un enlazador a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que han sido transaminados. Los métodos para etiquetar sondas están descritos en la patente de EE. UU.n.º 5.491.224, y Morrison et al., *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, Capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," págs. 21-40, Fan, Ed., Humana Press (2002).

Un experto en la materia reconocerá que se pueden utilizar otros agentes o tintes en vez de fluoróforos como restos que contienen etiquetas. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, restos que contienen etiquetas radioluminescentes, quimioluminescentes, bioluminescentes y fosforescentes. Los agentes que son detectables con luz visible incluyen tintes de cianina. Como alternativa, se pueden utilizar los restos de detección que se visualizan por medios indirectos. Por ejemplo, las sondas pueden ser etiquetadas con biotina o digoxigenina utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica y después procesadas para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr por medio de una unión posterior de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización y discriminación de sondas se puede lograr como se ha descrito a continuación.

Las sondas cromosómicas hibridadas con regiones objetivo se pueden visualizar alternativamente mediante reacciones enzimáticas de restos de etiquetas con sustratos adecuados para la producción de productos de color insolubles. Cada sonda se puede discriminar de otras sondas dentro del conjunto mediante la elección de un resto de etiqueta distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar por medio de incubación posterior con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano (HRP) y un sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitrozol de tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que el diaminobenzoato sirve como sustrato para HRP.

Kits

Se proporciona también un kit. El kit comprende un conjunto de sondas, tal como un conjunto de sondas como se describe anteriormente, que permite distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente e instrucciones para llevar a cabo un método descrito anteriormente. Como alternativa, el kit comprende un conjunto de sondas, tal como un conjunto de sondas como se describe anteriormente, que permite la identificación de un paciente con un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo o la identificación de un paciente con adenocarcinoma indolente e instrucciones para llevar a cabo un método descrito anteriormente.

Por lo tanto, en un aspecto, de acuerdo con la presente divulgación, el kit comprende (a) un conjunto de sondas, en donde el conjunto de sondas es (i) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que consiste en una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para FGFR1, (vii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27, (viii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda específica de locus para PTEN y una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8 (CEP8), (x) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1, (xii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN, (xiii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2, (xiv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ETV1 y una sonda específica de locus para FGFR1, (xvi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN, o (xviii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para AURKA, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC y una sonda de separación para ERG.

La sonda específica de locus para FGFR1 en los conjuntos de (i), (viii) y (xiv), se utiliza para determinar el % de pérdida de FGFR1, la sonda específica de locus para FGFR1 en los conjuntos de (vii), y, como alternativa para el % de pérdida de FGFR1, (xiv), se utiliza para determinar el % de ganancia de FGFR1, CEP8 en los conjuntos de (x), (xii)-(xiv), (xvi) y (xviii) se utiliza para determinar el % de pérdida de CEP8, se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (viii) para determinar el % de pérdida homocigótica de PTEN, se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (xvi) para determinar el % de pérdida de PTEN y la sonda específica de locus para FGFR1 y CEP8 en el conjunto de (viii), se utilizan para determinar el % de pérdida de la proporción FGFR1/CEP8

Por lo tanto, en una realización, de acuerdo con la invención, el kit comprende (a) un conjunto de sondas, en donde el conjunto de sondas es (ii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG, (iii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN, (iv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN, (v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2, (vi) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para NKX3.1, (ix) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1, (v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para FGFR1, o (xvii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda de separación para ERG, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda específica de locus para P27.

La sonda específica de locus para FGFR1 en los conjuntos de (ii)-(vi), (ix), (xv) y (xvii) se utiliza para determinar el % de pérdida de FGFR1, se utiliza la sonda específica de locus para FGFR1 en el conjunto de (ix) para determinar el % de ganancia de FGFR1, CEP8 en el conjunto de (ix) se utiliza para determinar el % de pérdida de CEP8, se utiliza la sonda específica de locus para PTEN en el conjunto (iii) para determinar el % de pérdida homocigótica de PTEN y la sonda específica de locus para FGFR1 y CEP8 en el conjunto de (ix), se utilizan para determinar el % de pérdida de la proporción FGFR1/CEP8. El kit comprende además (b) instrucciones para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente. Las instrucciones comprenden determinar en una muestra obtenida del paciente la presencia de anomalías cromosómicas. El método puede comprender poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas en condiciones de hibridación, contar los complejos de hibridación y comparar el número de un corte en un intervalo de cortes o un corte específico como se describe en el presente documento. Por ejemplo, un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40, un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46, un % de pérdida de CEP8 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de CEP8 < 2) superior o igual a 21 hasta inferior o igual a 36, un % de ganancia de CEP8 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de CEP8 > 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40, un % de pérdida de FGFR1/CEP8 superior o igual a 13 hasta inferior o igual a 72, un % de pérdida homocigótica de PTEN (el % de pérdida homocigótica es el % de células con números de copias de PTEN de cero) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 40, un % de pérdida de PTEN (el % de pérdida es el % de células con números de copias de PTEN inferior a dos) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50, un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30, un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30, un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 20, un % de pérdida de NKX3.1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de NKX3.1 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50, un % de translocación/delección de ETV1 superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20, un % de pérdida de P27 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de P27 < 2) superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 50 o un % de ganancia de AURKA (el % de ganancia es el % de células con números de copias de AURKA > 2) superior o igual a 1 hasta inferior o igual a 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo, mientras que nada de lo anterior indica que el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente. Si el paciente ha tenido una prostatectomía, la determinación de la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra indica que el paciente tiene un alto riesgo de recurrencia o metástasis, en cuyo caso las instrucciones pueden comprender además recomendar que el paciente consulte a su médico para un tratamiento inmediato para inhibir o prevenir la recurrencia o metástasis. Si el paciente ha sido o está siendo diagnosticado inicialmente de cáncer de próstata tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo, las instrucciones pueden comprender además recomendar que el paciente consulte a su médico para un tratamiento inmediato. Si el paciente ha sido o está siendo diagnosticado inicialmente de cáncer de próstata y el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente, las instrucciones pueden comprender además recomendar la vigilancia activa o la espera vigilante.

En otra realización, el kit comprende (a) un conjunto de sondas, en donde el conjunto de sondas es (ii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG, (iii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN, (iv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica

de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN o (v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2. El conjunto de cualquiera de (ii)-(v) puede comprender además, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27, una sonda específica de locus para ETV1 y/o una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea. El kit comprende además (b) instrucciones para identificar a un paciente con un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo. Las instrucciones comprenden determinar en una muestra obtenida del paciente la presencia de anomalías cromosómicas. El método puede comprender poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas en condiciones de hibridación, contar los complejos de hibridación y comparar el número de un corte en un intervalo de cortes o un corte específico como se describe en el presente documento. Por ejemplo, para (ii) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 14, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 y/o un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10, para (iii) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a ocho, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de PTEN de pérdida homocigótica superior o igual a 20, para (iv) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a 20 o para (v) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con el número de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a 10 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma de próstata agresivo. Las instrucciones pueden comprender además instrucciones para obtener un parámetro clínico seleccionado del grupo que consiste en una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de antígeno prostático específico (PSA), un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente, cualquiera de los cuales puede combinarse con la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas para el pronóstico.

En otra realización más, el kit comprende (a) un conjunto de sondas, en donde el conjunto de sondas es (ii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG, (iii) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para PTEN, (iv) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MYCN o (v) un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1, una sonda de separación para ERG y una sonda específica de locus para MDM2. El conjunto de cualquiera de (ii)-(v) puede comprender además, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27, una sonda específica de locus para ETV1 y/o una o más sondas para uno o más genes implicados en la misma trayectoria que cualquiera de los genes anteriores. El uso de una sonda de enumeración de cromosomas junto con una sonda específica de locus para un gen presente en el mismo cromosoma permite una proporción, tal como la proporción de gen/cromosoma (por ejemplo, PTEN/CEP10 y/o FGFR1/CEP8) que se ha de evaluar, si se desea. El kit comprende además (b) instrucciones para identificar a un paciente con adenocarcinoma prostático indolente. Las instrucciones comprenden determinar en una muestra obtenida del paciente la presencia de anomalías cromosómicas. El método puede comprender poner en contacto la muestra con un conjunto de sondas en condiciones de hibridación, contar los complejos de hibridación y comparar el número de un corte en un intervalo de cortes o un corte específico como se describe en el presente documento. Por ejemplo, para (ii) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 10 y/o un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos, para (iii) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 10, un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 y/o un % de PTEN de pérdida homocigótica superior o igual a 20, para (iv) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 18, un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos y/o un % de ganancia de MYCN (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYCN > 2) superior o igual a 20 o para (v) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con el número de copias de MYC > 2) superior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es

- el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 20, un % de ERG 2+Edel superior o igual a dos y/o un % de ganancia de MDM2 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MDM2 > 2) superior o igual a tres indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo y nada de lo anterior indica que el paciente tiene adenocarcinoma prostático indolente. Las instrucciones pueden comprender además instrucciones para obtener un parámetro clínico seleccionado del grupo que consiste en una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de antígeno prostático específico (PSA), un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente, cualquiera de los cuales puede combinarse con la determinación de la presencia de anomalías cromosómicas para el pronóstico.
- 10 Un kit descrito anteriormente puede comprender además uno o más reactivos, tal como contraste de DAPI 1, tampón de SSC de pretratamiento (por ejemplo, 1xSSC, pH 7,0), tampón de proteasa (por ejemplo, HCl 0,1 N), proteasa IV (por ejemplo, pepsina, tal como en forma en polvo (75 mg/tubo)), tampón de lavado post-hibridación (por ejemplo, 2xSSC, 0,3 % de NP-40) y similares.

15 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención. Los ejemplos no están previstos para limitar el alcance de la invención reivindicada de ningún modo.

20 **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe la evaluación de varias sondas y combinaciones de las mismas, en la evaluación de muestras de cáncer de próstata utilizando hibridación *in situ* de fluorescencia multicolor (FISH).

- 25 Un total de 52 especímenes de prostatectomía radical fijada con formalina, embebida con parafina (FFPE) de pacientes con adenocarcinoma de la próstata se recogieron en RUSH Medical Center, Chicago, IL. De los 52 especímenes, 32 se obtuvieron de pacientes que progresaron en 15 años. De esos 32 especímenes, siete se obtuvieron de pacientes que nunca estuvieron libres de la enfermedad y cuatro se obtuvieron de pacientes que murieron de carcinoma de próstata. Los 20 especímenes restantes se obtuvieron de pacientes que no progresaron durante el periodo de seguimiento de 8,2-15,0 años.

35 Todos los especímenes se evaluaron con 14 sondas. Las sondas fueron PTEN, NKX3.1, P27 (CDKN1B), CEP10, CMYC, AURKA, ERG Cen (sonda centromérica), ERG Tel (sonda telomérica), ETV1 Tel (sonda telomérica), ETV1 Cen (sonda centromérica), MDM2, MYCN, FGFR1 y CEP8. Las sondas se evaluaron en conjuntos como se muestra en la tabla 1. Todas las sondas se fabricaron en Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL) y se pueden obtener del fabricante.

Tabla 1 (no forma parte de la invención como se reivindica)

| Conjunto de sondas | Sonda | Locus | Color |
|----------------------|--------------|----------|----------|
| Conjunto de sondas 1 | PTEN | 10q23 | Oro |
| | CEP10 | | Turquesa |
| | ERG Cen | 21q22.2 | Rojo |
| | ERG Tel | 21q22.2 | Verde |
| Conjunto de sondas 2 | NKX3.1 | 8p21 | Oro |
| | CMYC | 8q24 | Turquesa |
| | ETV1 Tel | 7p21.2 | Rojo |
| | ETV1 Cen | 7p21.2 | Verde |
| Conjunto de sondas 3 | P27 (CDKN1B) | 12p13.1 | Oro |
| | AURKA | 20q13.2 | Turquesa |
| | MDM2 | 12q14-15 | Rojo |
| | MYCN | 2p24 | Verde |
| Conjunto de sondas 4 | FGFR1 | 8p12 | Rojo |
| | CEP8 | | Turquesa |

Los portaobjetos de especímenes de FFPE se seleccionaron con 10 secciones en serie de los portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina respectivos (teñidos con H&E) para la evaluación de las sondas con FISH. Esta selección aseguró la separación mínima entre las áreas evaluadas por histopatología y áreas evaluadas por FISH. Las secciones teñidas con H&E se examinaron por un patólogo. Las áreas más grandes posibles de los tumores se marcaron, es decir, se rodearon. Las áreas correspondientes de los portaobjetos de especímenes seleccionados para la evaluación de las sondas con FISH se marcaron con un trazo de vidrio.

Los portaobjetos de especímenes de FFPE se hornearon a 60 °C durante 2-24 horas y después se trataron tres veces con Hemo-De® (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) durante cinco minutos cada vez a temperatura ambiente y se enjuagaron dos veces con etanol al 100 % durante un minuto cada vez a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron en una solución de pretratamiento (1xSSC (solución salina-citrato de sodio), pH 7,0) a 80 °C durante 35 minutos, se enjuagaron en agua desionizada durante tres minutos, se incubaron en pepsina al 0,15 % en una solución de HCl 0,1 N a 37 °C durante 20-22 minutos y se enjuagaron de nuevo en agua desionizada durante tres minutos. Los portaobjetos se deshidrataron en etanol al 70 %, 85 % y 100 % durante un minuto cada uno y se secaron al aire.

Diez microlitros de una mezcla de hibridación que contiene un conjunto de sondas (como se indica en la Tabla 1), ADN bloqueantes y tampón de hibridación LSI/WCP (Abbott Molecular, Inc.) se añadieron a un portaobjetos de especímenes y se aplicó un cubreobjetos y se selló con cemento de caucho. Los portaobjetos y sondas se codensnaturalizaron a 73 °C durante cinco minutos y se hibridaron a 37 °C en una plataforma de hibridación ThermoBrite® (Abbott Molecular, Inc.) durante 16-24 horas. Después de la hibridación, los cubreobjetos se eliminaron por remojo de los portaobjetos en una solución 1xSSC, pH 7,0, durante 2-5 minutos y se lavó inmediatamente en 2xSSC/0,3 % de NP- 40 a 73 °C durante tres minutos y una solución 1xSSC, pH 7,0, a temperatura ambiente durante un minuto. Los portaobjetos se dejaron secar en la oscuridad. Diez microlitros de solución de contraste/antidifuminación de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 1; Abbott Molecular, Inc.) se añadieron al espécimen y el espécimen se cubrió con un cubreobjetos para la microscopía.

Se evaluaron varios campos de vista dentro del área de tumor trazado en portaobjetos hibridados por separado con cada conjunto de sondas enumerado en la Tabla 1. Las células (50-100) se enumeraron para el número de señales fluorescentes para cada sonda en un conjunto dado. Todos los patrones posibles de cambios reordenamiento y de número de copias para las sondas separadas para ERG y ETV1 se capturaron y registraron.

Se calcularon los siguientes parámetros de anomalía de FISH:

- sonda de separación para ERG (BAP) (n.º de señales solo rojas ≥ 1),
- ERG 2+Edel (n.º de señales solo rojas - n.º de señales solo verdes ≥ 2),
- pérdida de PTEN (el % de células por espécimen con señal ≤ 1),
- pérdida de PTEN/CEP10 (el % de células por espécimen con proporción < 1),
- ETV1 BAP (n.º de señales solo rojas ≥ 1),
- pérdida de NKX3.1 (el % de células por espécimen con señal ≤ 1),
- ganancia de CMYC (el % de células por espécimen con señal > 2),
- ganancia de AURKA (el % de células por espécimen con señal > 2),
- ganancia de MYCN (el % de células por espécimen con señal > 2),
- pérdida de P27 (el % de células por espécimen con señal ≤ 1),
- ganancia de MDM2 (el % de células por espécimen con señal > 2),
- ganancia de FGFR1 (el % de células por espécimen con señal > 2),
- pérdida de FGFR1 (el % de células por espécimen con señal ≤ 1),
- ganancia de CEP8 (el % de células por espécimen con señal > 2),
- pérdida de CEP8 (el % de células por espécimen con señal ≤ 1),
- ganancia de FGFR1/CEP8 (el % de células por espécimen con proporción > 1) y
- pérdida de FGFR1/CEP8 (el % de células por espécimen con proporción < 1).

Los parámetros de anomalías de FISH se analizaron sistemáticamente para seleccionar y priorizar las sondas candidatas y sus combinaciones, utilizando un análisis de característica de funcionamiento del receptor (ROC) y análisis de supervivencia (modelo de riesgo instantáneo proporcional de Cox). Se hizo el seguimiento de los pacientes durante 15 años. Los pacientes, que desarrollaron progresión más allá de los 15 años, se trataron como censurados a los 15 años. El resultado de la enfermedad fue "progresión", que incluía la recurrencia de la enfermedad y muerte de la enfermedad (DOD) como resultados. El análisis de ROC discriminó entre aquellos pacientes, que progresaron en 15 años (sensibilidad) y pacientes de control, que no progresaron en 15 años (especificidad), para maximizar la sensibilidad y la especificidad (Área por debajo de la curva (AUC por sus siglas en inglés)). Utilizando el análisis de supervivencia, se determinó un cociente de riesgo (Hazard Ratio (HR)) de "la posibilidad de progresión de la enfermedad en pacientes FISH-positivos/pacientes FISH-negativos". Para cada parámetro de anomalía de FISH, se optimizó la especificidad más alta basándose en el (los) corte(s) seleccionado(s) para el tratamiento agresivo/adyuvante (en este estudio, se seleccionaron los pacientes por su especificidad más alta para conseguir el mejor "valor predictivo positivo"). La sensibilidad más alta, con especificidad de al menos el 50 %, se optimizó basándose en el (los) corte(s) seleccionado(s) para seleccionar los pacientes con tumores

indolentes para su observación (en este estudio, se seleccionaron los pacientes por su sensibilidad más alta para conseguir el mejor "valor predictivo negativo").

5 Utilizando el análisis de ROC y el análisis de supervivencia, los parámetros de FISH anormales en la Tabla 2 se identificaron como teniendo el potencial de ayudar a discriminar pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad de aquellos pacientes con bajo riesgo de progresión de la enfermedad con $p < 0,05$. El corte se basó en el porcentaje de células que contenían una anomalía genómica. La positividad y negatividad de FISH se decidieron basándose en los valores de corte. La positividad de FISH se definió como el porcentaje de células que contenían una anomalía genómica \geq corte, mientras que la negatividad de FISH se definió como el porcentaje de células que contenían una anomalía genómica $<$ corte. Cada corte se determinó simulando todos los cortes posibles (1-100 %) a partir del modelo de Cox y solo aquellos cortes con valores de p significativos se incluyeron en el análisis de ROC secundario para calcular el AUC. El valor de corte se seleccionó por el mejor cociente de riesgo (HR). Cuando HR fue mayor o igual a uno, se eligió el HR más grande; cuando HR fue menor que uno, se eligió el HR más pequeño.

15

Tabla 2

| Parámetro de FISH anormal | Corte* | Cociente de riesgo (el mejor posible) | valor de p (COX) | AUC |
|---------------------------|--------|---------------------------------------|------------------|--------|
| pérdida de FGFR1 | 40 | 4,163 | 0,0030 | 0,7039 |
| pérdida de CEP8 | 26 | 3,858 | 0,0006 | 0,6977 |
| ganancia de FGFR1 | 6 | 0,303 | 0,0122 | 0,6914 |
| Parámetro de FISH anormal | Corte* | Cociente de riesgo (el mejor posible) | valor de p (COX) | AUC |
| pérdida de FGFR1/CEP8 | 72 | 8,504 | 0,0475 | 0,6664 |
| ganancia de CEP8 | 15 | 0,372 | 0,0136 | 0,6555 |
| ganancia de CMYC | 26 | 2,695 | 0,0442 | 0,6422 |
| ERG solo rojo | 17 | 0,264 | 0,0387 | 0,5648 |
| ganancia de AURKA | 1 | 0,118 | 0,0475 | 0,5031 |

(*el valor de p fue todavía significativo dentro de los rangos de corte de 15-40 para la pérdida de FGFR1, 21-36 para el % de pérdida de CEP8, 26-46 para la ganancia de FGFR1, 13-72 para la pérdida de FGFR1/CEP8, 15-40 para la ganancia de CEP8, 2-30 para la ganancia de MYC y 14-17 para ERG solo rojo.

Ejemplo 2 (no forma parte de la invención como se reivindica)

20 Este ejemplo describe una evaluación adicional de la ganancia de FGFR1 con un corte de seis y una pérdida de FGFR1 con un corte de 40.

25 La ganancia de FGFR1 con un corte de seis se evaluó adicionalmente como se muestra en la figura 1. La figura 1 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de la ganancia de FGFR1 con un valor de p de rango logarítmico de 0,0062. Los datos indicaron que los pacientes con ganancia o amplificación de FGFR1 progresarán (recurrirán o morirán) más lentamente. En otras palabras, aquellos pacientes, que son positivos para la ganancia de FGFR1, tienen menos posibilidad de progresión que aquellos pacientes, que son negativos para la ganancia de FGFR1 (cociente de riesgo de 0,303).

30 La pérdida de FGFR1 con un corte de 40 se evaluó adicionalmente como se muestra en la figura 2. La figura 2 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de la pérdida de FGFR1 con un valor de p de rango logarítmico de 0,0009. Los datos indicaron que los pacientes con pérdida de FGFR1 progresarán (recurrirán o morirán) más rápido. En otras palabras, aquellos pacientes, que son positivos para la pérdida de FGFR1, tienen más posibilidad de progresión que aquellos pacientes, que son negativos para la pérdida de FGFR1 (cociente de riesgo de 4,163).

35

Ejemplo 3

40 Este ejemplo describe una evaluación adicional de combinaciones de dos, tres y cuatro parámetros de FISH anormales.

45 Las combinaciones de dos, tres y cuatro parámetros de FISH anormales se evaluaron utilizando el análisis de ROC. Las clasificaciones de AUC de las combinaciones están mostradas en la Tabla 3. La comparación del análisis entre las combinaciones de los parámetros de FISH anormales y los parámetros de FISH anormales únicos por AUC indicaron que se logra el rendimiento máximo agrupando los biomarcadores complementarios.

Tabla 3

| (las combinaciones indicadas con (*) no forman parte de la invención según se reivindica) | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Combinación | AUC |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN | 0,8563 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida de NKX3.1 | 0,8531 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MYCN | 0,8445 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MDM2 | 0,8438 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | 0,843 |
| ganancia de CMYC, ETV1 solo rojo, ganancia de FGFR 1, pérdida de P27 (*) | 0,8391 |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN, (*) pérdida de FGFR1/CEP8 | 0,8391 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, ganancia de FGFR1 | 0,8438 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de NKX3.1 (*) | 0,843 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | 0,8398 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, ganancia de MYCN (*) | 0,8398 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, ganancia de MDM2 (*) | 0,8359 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ETV1 solo rojo, ganancia de FGFR1 (*) | 0,8375 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1/CEP8 | 0,8438 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ETV1 solo rojo, pérdida de FGFR1 (*) | 0,8359 |
| ganancia de AURKA, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | 0,8383 |
| pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de PTEN (*) | 0,8359 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida de P27 | 0,8359 |
| ganancia de AURKA, pérdida de CEP8, ganancia de CMYC, ERG 2+Edel (*) | 0,8336 |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1 (*) | 0,8055 |

Ejemplo 4

- 5 Este ejemplo describe la evaluación adicional de combinación adicional de combinaciones de parámetros de FISH anormales en la selección de pacientes con una enfermedad más agresiva para el tratamiento agresivo y/o adyuvante.

10 Varias combinaciones de parámetros de FISH anormales se evaluaron utilizando el análisis de COX y ROC para la selección de pacientes con una enfermedad más agresiva para el tratamiento agresivo y/o adyuvante. Las combinaciones de parámetros de FISH anormales con la especificidad más alta y una sensibilidad aceptable se seleccionaron para dirigirse al valor predictivo positivo más alto. Los resultados del análisis de COX y ROC de seis combinaciones se exponen en la Tabla 4. Cada corte se determinó simulando primero todas las combinaciones de corte posibles (para cada parámetro en la combinación). El corte se basó en el porcentaje de células que contenían una anomalía genómica. La positividad y negatividad de FISH se decidieron basándose en los valores de corte. La positividad de FISH se definió como cualquier parámetro en la combinación que sea positivo, mientras que la negatividad de FISH se definió como todos los parámetros de FISH en la combinación que sean negativos. El modelo de Cox se aplicó a cada combinación de corte. Solo aquellas combinaciones de corte con valores de p significativos están incluidas en un análisis de ROC secundario. Después el valor de corte se determinó a partir de ROC.

20

Tabla 4

| (las combinaciones indicadas con (*) no forman parte de la invención según se reivindica) | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------|--------------------|------------------|---------------|
| La combinación de parámetros de FISH anormales | Corte 1 | Corte 2 | Corte 3 | Corte 4 | Sensibilidad | Especificidad | Cociente de riesgo | Valor de p (COX) | AUC |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1 (*) | 26 | 26 | NA | NA | 44 % | 100 % | 3,874 | 0,0003 | 0,8055 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | 14 | 10 | 26 | NA | 53 % | 95 % | 3,915 | 0,0002 | 0,8430 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN | 8 | 10 | 26 | 20 | 59 % | 80 % | 2,807 | 0,0047 | 0,8563 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MYCN | 30 | 10 | 20 | 20 | 81 % | 75 % | 5,328 | 0,0003 | 0,8445 |

(continuación)

| (las combinaciones indicadas con (*) no forman parte de la invención según se reivindica) | | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------------|--------------------|------------------|--------|
| La combinación de parámetros de FISH anormales | Corte 1 | Corte 2 | Corte 3 | Corte 4 | Sensibilidad | Especificidad | Cociente de riesgo | Valor de p (COX) | AUC |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MDM2 | 30 | 10 | 20 | 10 | 78 % | 65 % | 3,447 | 0,0041 | 0,8438 |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN, pérdida de FGFR1/CEP8 (*) | 26 | 26 | 20 | 34 | 50 % | 85 % | 2,360 | 0,0166 | 0,8391 |

5 La combinación de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel y pérdida de FGFR1 se evalúan adicionalmente como se muestra en la figura 3. La figura 3 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel y pérdida de FGFR1 con un valor de p de rango logarítmico de 0,0001.

10 Los datos para el análisis de pronóstico por un alto/bajo riesgo (es decir, FISH-positivo/FISH-negativo) se muestran en la Tabla 5. Con una especificidad elevada (95,00 %), una sensibilidad aceptable (53,13 %) y un cociente de riesgo de 3,92, la combinación de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel y la pérdida de FGFR1 indicaron que los pacientes, que son FISH-positivos, tienen una mayor posibilidad de progresión y progresarán más rápidamente que los pacientes, que son FISH-negativos. Esta combinación de parámetros de FISH anormales podrían separar un grupo de alto riesgo (recurrido o DOD) de un grupo de bajo riesgo (indolente) y podría ayudar a los pacientes y médicos a decidir buscar un tratamiento inmediato.

15 Tabla 5

| La combinación de parámetros de FISH anormales | Alto/bajo riesgo | N (número progresado/DOD) | Supervivencia media (95 % de IC) | Cociente de riesgo (95 % de IC) | Valor de p (COX) | Sensibilidad | Especificidad |
|------------------------------------------------|------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------|---------------|
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | Alto riesgo | 18 (17) | 1 (0,1;2,3) | 3,92 (1,9;8,05) | 0,0002 | 53,13 % | 95,00 % |
| | Bajo riesgo | 34 (15) | NA (1,6,NA) | | | | |

Ejemplo 5

20 Este ejemplo describe la evaluación adicional de combinaciones de parámetros de FISH anormales en la identificación de pacientes con tumores menos agresivos (indolentes) para su observación.

25 Varias combinaciones de parámetros de FISH anormales se evaluaron utilizando el análisis de COX y ROC para la selección de pacientes con tumores menos agresivos (indolentes) para su observación. Las combinaciones de parámetros de FISH anormales con la sensibilidad más alta y una especificidad de al menos el 50 % se seleccionaron para dirigirse al valor predictivo positivo más alto. Los resultados del análisis de COX y ROC de seis combinaciones se exponen en la Tabla 6. Cada corte se determinó simulando primero todas las combinaciones de corte posibles (para cada parámetro en la combinación). El corte se basó en el porcentaje de células que contenían una anomalía genómica. La positividad y negatividad de FISH se decidieron basándose en los valores de corte. La positividad de FISH se definió como cualquier parámetro en la combinación que sea positivo, mientras que la negatividad de FISH se definió como todos los parámetros de FISH en la combinación que sean negativos. El modelo de Cox se aplicó a cada combinación de corte. Solo aquellas combinaciones de corte con un valor de p significativo están incluidas en un análisis de ROC secundario. Después el valor de corte se determinó a partir de ROC.

35 Tabla 6

| (las combinaciones indicadas con (*) no forman parte de la invención según se reivindica) | | | | | | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------------|--------------------|------------------|--------|
| La combinación de parámetros de FISH anormales | Corte 1 | Corte 2 | Corte 3 | Corte 4 | Sensibilidad | Especificidad | Cociente de riesgo | Valor de p (COX) | AUC |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1 (*) | 2 | 10 | NA | NA | 88 % | 50 % | 3,571 | 0,0177 | 0,8055 |

(continuación)

| (las combinaciones indicadas con (*) no forman parte de la invención según se reivindica) | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|--------------|---------------|--------------------|------------------|---------------|
| La combinación de parámetros de FISH anormales | Corte 1 | Corte 2 | Corte 3 | Corte 4 | Sensibilidad | Especificidad | Cociente de riesgo | Valor de p (COX) | AUC |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 | 2 | 2 | 10 | NA | 91 % | 50 % | 4,648 | 0,0116 | 0,8430 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN | 2 | 10 | 10 | 20 | 91 % | 50 % | 4,648 | 0,0116 | 0,8563 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MYCN | 2 | 2 | 18 | 20 | 97 % | 50 % | 14,200 | 0,0092 | 0,8445 |
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, ganancia de MDM2 | 30 | 2 | 20 | 3 | 94 % | 55 % | 8,665 | 0,0032 | 0,8438 |
| ganancia de CMYC, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN, pérdida de FGFR/CEP8 (*) | 2 | 10 | 20 | 35 | 91 % | 50 % | 4,648 | 0,0116 | 0,8391 |

5 La combinación de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, la pérdida de FGFR1 y la homocigosidad para PTEN se evaluaron adicionalmente como se muestra en la figura 4. La figura 4 es una curva de KM (PFS (años) vs. probabilidad de supervivencia) de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, la pérdida de FGFR1 y la homocigosidad para PTEN con un valor de p de rango logarítmico de 0,0048.

10 Los datos para el análisis de pronóstico por un alto/bajo riesgo (es decir, FISH-positivo/FISH-negativo) se muestran en la Tabla 7. Con una sensibilidad elevada (90,60 %), una sensibilidad aceptable (50,00 %) y un cociente de riesgo de 4,65, la combinación de ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, la pérdida de FGFR1 y la pérdida homocigótica para PTEN indicaron que los pacientes, que son FISH-positivos, tienen una mayor posibilidad de progresión y progresarán más rápidamente que los pacientes, que son FISH-negativos. De manera más importante, esta combinación de parámetros de FISH anormales también tiene el potencial de predecir que aquellos pacientes, que son FISH-negativos (10/13 pacientes no presentaron progresión en 15 años de seguimiento que se muestran en la

15 curva de KM (línea superior) en la figura 4), se espera que tengan un tiempo libre de progresión más largo. Esta combinación de sondas podría separar el grupo de bajo riesgo (indolente) del de alto riesgo (recurrido o DOD) y podría ayudar a los pacientes y a los médicos a decidir elegir una vigilancia activa (VA) con tranquilidad si los datos de FISH son negativos.

Tabla 7

| La combinación de parámetros de FISH anormales | Alto/bajo riesgo | N (número progresado/DOD) | Supervivencia media (95 % de IC) | Cociente de riesgo (95 % de IC) | Valor de p (COX) | Sensibilidad | Especificidad |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------|--------------|---------------|
| ganancia de CMYC, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1, pérdida homocigótica de PTEN | Alto riesgo | 39 (29) | 2 (1,2;2,8) | 4,65 | 0,0116 | 90,63 % | 50,00 % |
| | Bajo riesgo | 13 (3) | NA (1,6;NA) | (1,41;15,33) | | | |

Ejemplo 6

Este ejemplo describe cómo añadir otros parámetros clínicos, tales como la puntuación de Gleason, al análisis de una combinación de parámetros de FISH anormales puede mejorar la predicción de la progresión de la enfermedad.

5 El análisis de una combinación de parámetros de FISH anormales, tal como una de las combinaciones establecidas en la Tabla 3, o más específicamente en la Tabla 4 o Tabla 6, se puede combinar con uno u otros parámetros clínicos más, tales como la puntuación de Gleason, estadio del tumor, antígeno prostático específico (PSA), edad del paciente y similares, para predecir la progresión de la enfermedad. Como se muestra en las figuras 5A-5C, que son curvas de ROC, que son gráficos de especificidad 1 (falso positivo) vs. sensibilidad (verdadero positivo), ciertas combinaciones de parámetros de FISH anormales proporcionaron un valor incremental a una puntuación de Gleason. La figura 5A que muestra el AUC con la puntuación de Gleason solo, mientras que la figura 5B muestra el AUC con la combinación de la ganancia de CMYC de los parámetros anormales de FISH, ERG 2+Edel, la pérdida de FGFR1 y la pérdida homocigótica de PTEN y la figura 5C muestra el AUC con la puntuación de Gleason y la combinación de la ganancia de CMYC de los parámetros de FISH anormales, ERG 2+Edel, pérdida de FGFR1 y pérdida homocigótica de PTEN.

20 Todas las patentes, publicaciones de solicitudes de patentes, artículos de periódico, libros de texto y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativos del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica a la que pertenece la divulgación.

25 La invención descrita de manera ilustrativa en el presente documento se puede poner en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier (cualesquiera) elemento(s) o limitación(es), que no está(n) divulgados de manera específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, cada caso en el presente documento de cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se pueden reemplazar con cualquiera de los otros dos términos. Del mismo modo, las formas en singular "un/a", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias al "método" incluye uno o más métodos y/o etapas del tipo, que se han descrito en el presente documento y/o que se volverán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la divulgación.

30 Los términos y expresiones, que se han empleado, se utilizan como términos de descripción y no de limitación. A este respecto, cuando ciertos términos se definen bajo "Definiciones" y se definen, se describen o se mencionan de otra manera en otro lugar en la "Descripción detallada", todas estas definiciones, descripciones y discusiones están previstas a atribuirse a dichos términos. Igualmente, no hay ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Además, mientras que los subtítulos, por ejemplo, "Definiciones", se utilizan en la "Descripción detallada", dicho uso es únicamente para facilitar la referencia y no pretende limitar la divulgación realizada en una sección a esa sección solamente; más bien, cualquier divulgación realizada bajo un subtítulo pretende constituir una divulgación en cada uno de los demás subtítulos.

40 Se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se entenderá que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente en el contexto de las realizaciones preferidas y las características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento. Dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la invención como se reivindica en el presente documento.

45

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente, método que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una muestra del paciente con un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG, en condiciones de hibridación, en donde se utiliza la sonda específica de locus para FGFR1 para determinar el % de pérdida de FGFR1,
- 10 (b) determinar la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra, en donde
- (i) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 30,
- 15 (ii) un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40,
- (iii) un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46, y/o
- (iv) un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30,
- 20 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo y en donde la ausencia de cualquiera de (i)-(iv) anterior indica que el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente, tras lo cual un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo se distingue de un paciente con adenocarcinoma prostático indolente.
- 25 2. El método de la reivindicación 1 en donde la muestra comprende un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 14 hasta inferior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 hasta inferior o igual a 40 y/o un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 46 y el paciente tiene un
- 30 alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma de próstata agresivo.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra no comprende:
- (i) un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior
- 35 o igual a dos hasta inferior o igual a 30,
- (ii) un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR < 2) superior o igual a 15 hasta inferior o igual a 40.
- (iii) un % de ganancia de FGFR1 (el % de ganancia es el % de células con números de copias de FGFR > 2) superior o igual a dos hasta inferior o igual a 46, o
- 40 (iv) un ERG 2+Edel superior o igual a uno hasta inferior o igual a 30 y el paciente tiene un adenocarcinoma prostático indolente.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde, si un paciente ha tenido una prostatectomía, la determinación de la presencia de una anomalía cromosómica en la muestra indica que el paciente tiene un alto
- 45 riesgo de recurrencia o metástasis.
5. El método de la reivindicación 3, que comprende además poner en contacto la muestra con una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10, una sonda específica de locus para AURKA, una sonda específica de locus para NKX3.1, una sonda específica de locus para P27 y/o una sonda de separación para ETV1.
- 50 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además obtener un parámetro clínico seleccionado de una puntuación de Gleason, un estadio del tumor, un nivel de antígeno prostático específico (PSA), un nomograma, estado de metilación, mutación y edad del paciente.
- 55 7. Un conjunto de sondas etiquetadas de manera detectable para distinguir entre un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo y un paciente con adenocarcinoma prostático indolente, que comprende una sonda específica de locus para MYC, una sonda específica de locus para FGFR1 y una sonda de separación para ERG.
- 60 8. El conjunto de sondas de la reivindicación 7, que comprende además una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para PTEN.
9. El conjunto de sondas de la reivindicación 7 o reivindicación 8, que comprende además una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para MYCN.
- 65 10. El conjunto de sondas de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que comprende además una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para MDM2.

11. El conjunto de sondas de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que comprende además una sonda de enumeración de cromosomas etiquetada de manera detectable para el cromosoma 8, una sonda de enumeración de cromosomas etiquetada de manera detectable para el cromosoma 10, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para AURKA, una sonda específica de locus etiquetada de manera detectable para NKX3.1, una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable para P27 y una sonda de separación, etiquetada de manera detectable para ETV1.

12. Un kit que comprende:

- 10 (a) un conjunto de sondas que permite la identificación de un paciente con adenocarcinoma prostático agresivo, en donde el conjunto de sondas comprende una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable, para MYC, una sonda específica de locus, etiquetada de manera detectable para FGFR1, y una sonda de separación, etiquetada de manera detectable para ERG, y
- 15 (b) instrucciones para identificar a un paciente con un alto riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático agresivo, en donde las instrucciones comprenden determinar la presencia de anomalías cromosómicas en una muestra obtenida del paciente,

20 en donde uno o más de un % de ganancia de MYC (el % de ganancia es el % de células con números de copias de MYC > 2) superior o igual a 14 hasta inferior o igual a 30, un % de pérdida de FGFR1 (el % de pérdida es el % de células con números de copias de FGFR1 < 2) superior o igual a 26 hasta inferior o igual a 40 y un % de ERG 2+Edel superior o igual a 10 hasta inferior o igual a 46 indica que el paciente tiene un alto riesgo de desarrollar un adenocarcinoma prostático agresivo.

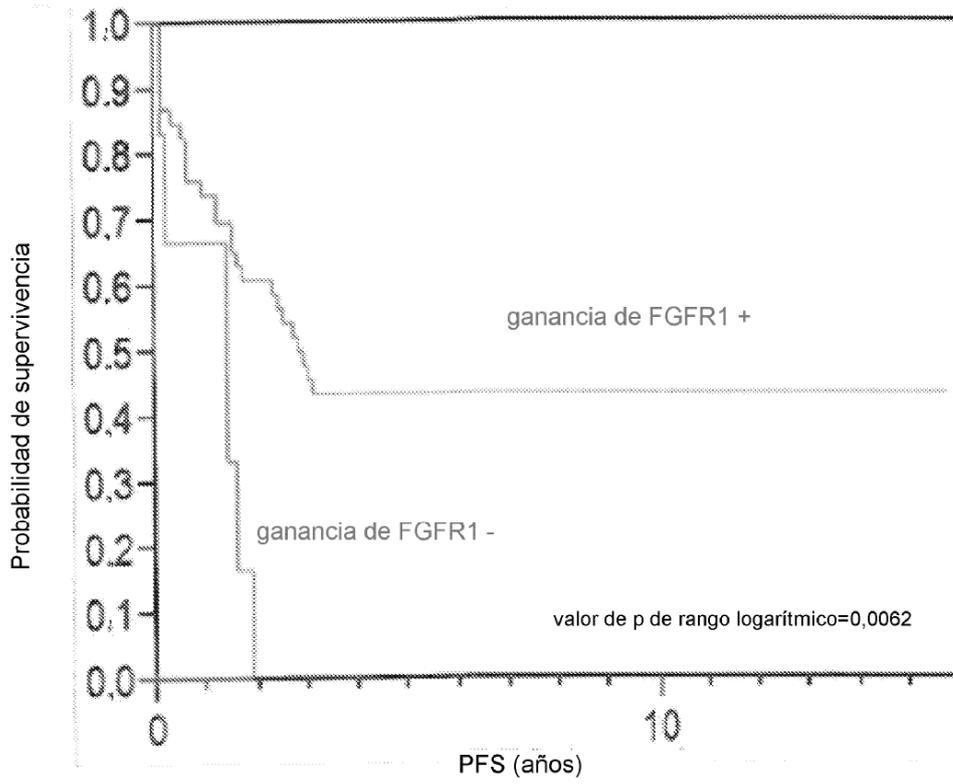


FIG. 1

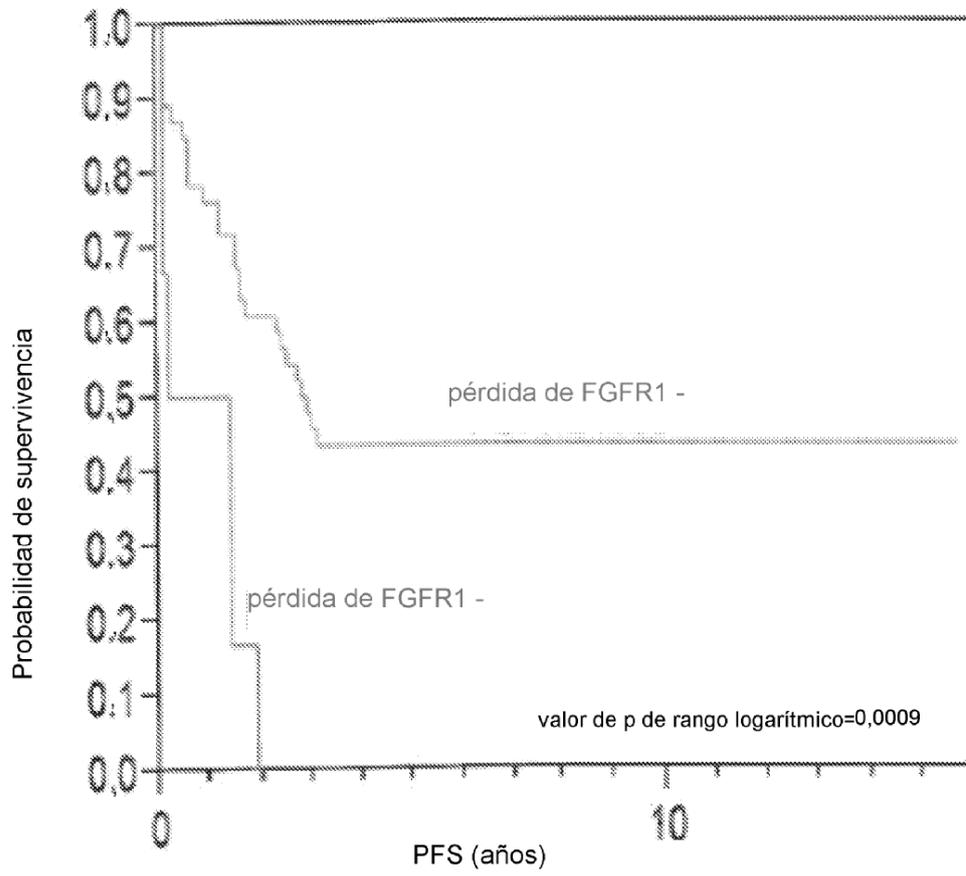


FIG. 2

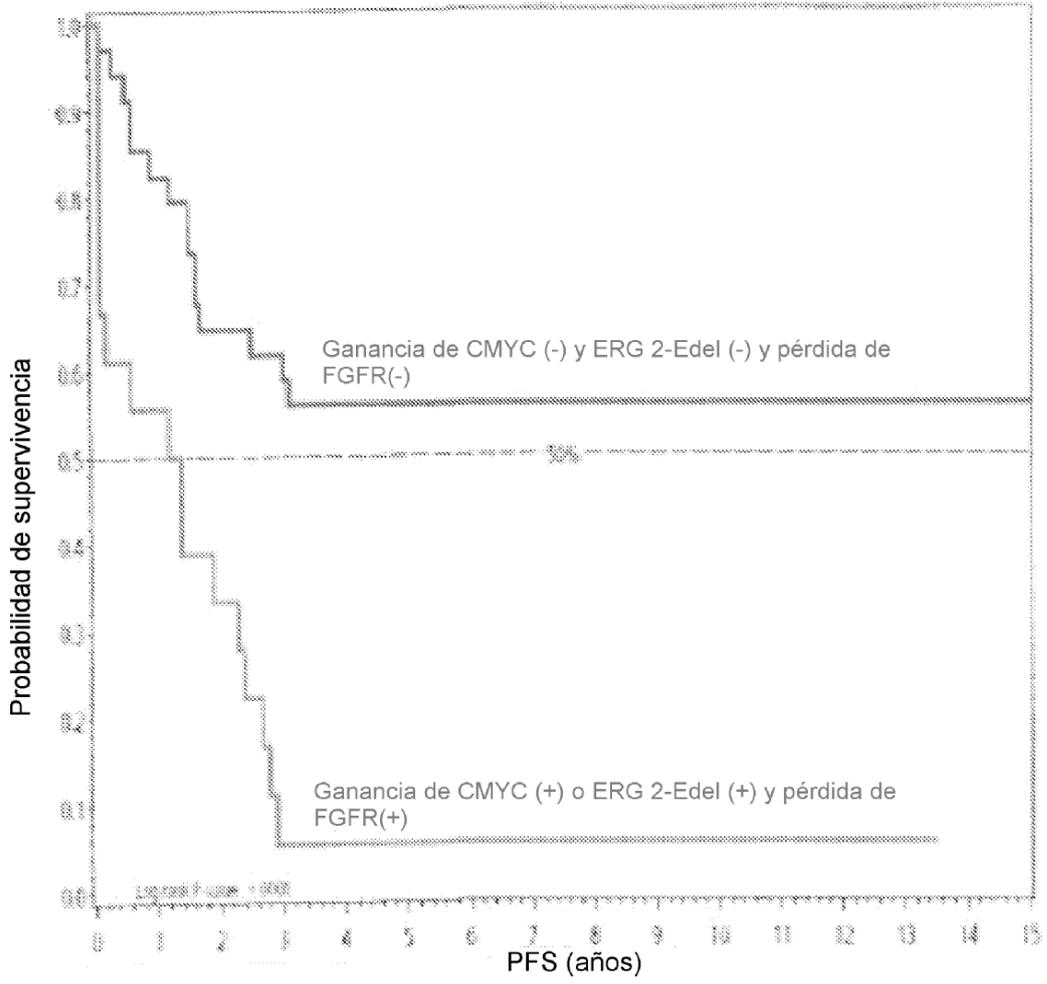


FIG. 3

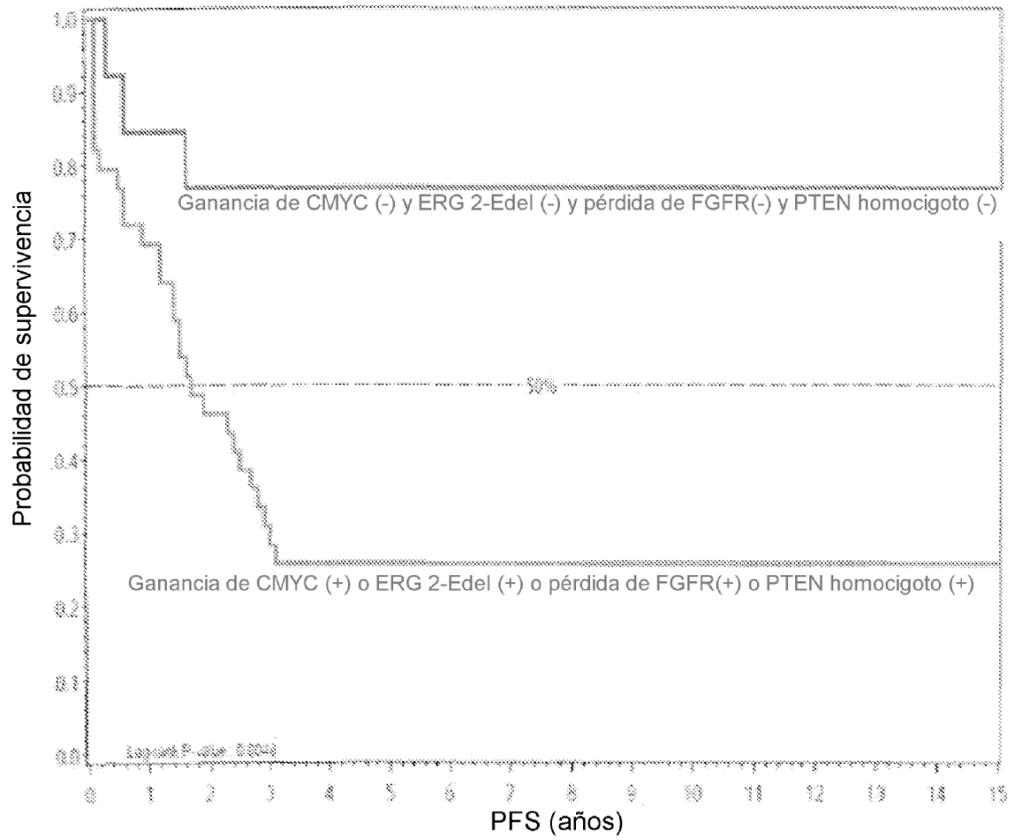


FIG. 4

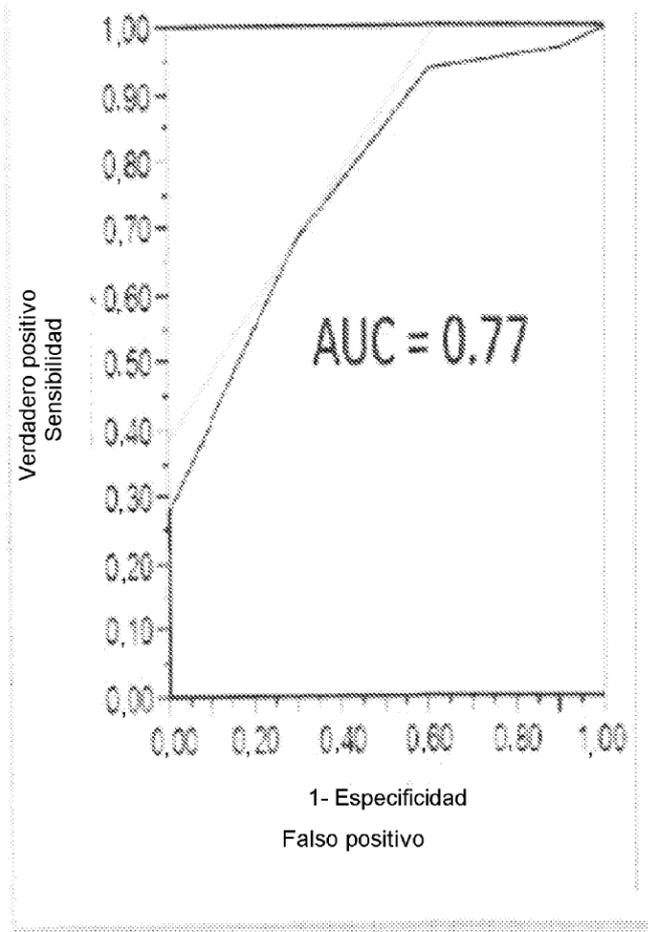


FIG. 5A

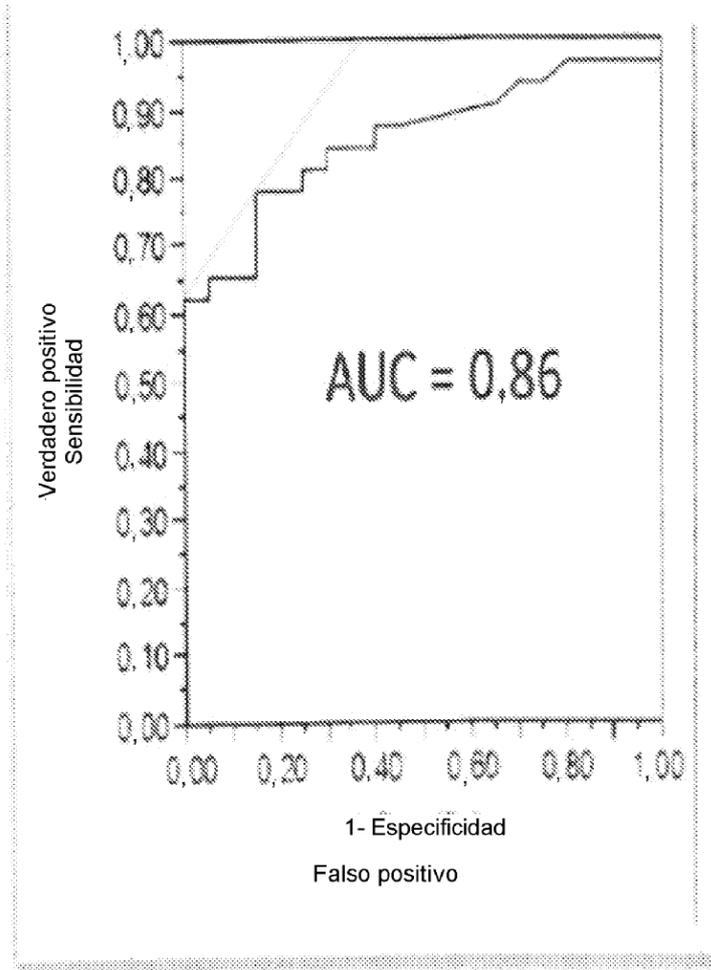


FIG. 5B

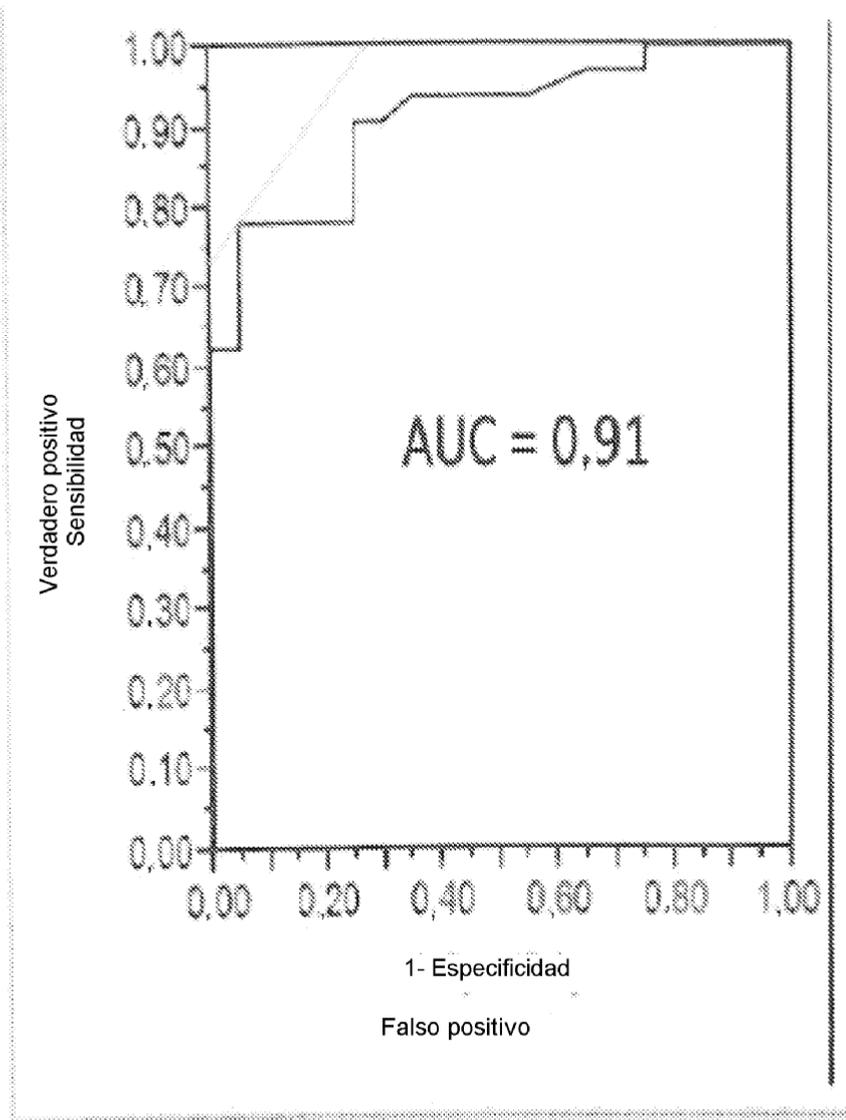


FIG. 5C