

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 949 875**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2017** **PCT/CL2017/050095**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2018** **WO18119544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2017** **E 17887687 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2023** **EP 3564665**

54 Título: **Método ex vivo de pronóstico de metástasis en cáncer de próstata**

30 Prioridad:

30.12.2016 CL 20163434

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

03.10.2023

73 Titular/es:

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
(50.0%)**

**Avenida Libertador Bernardo OHiggins 340
8331150 Santiago, CL y
CERDA INFANTE, JAVIER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CERDA INFANTE, JAVIER y
MONTECINOS ACUÑA, VIVIANA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 949 875 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

Método ex vivo de pronóstico de metástasis en cáncer de próstata

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método que permite pronosticar metástasis de un cáncer de próstata, mediante la evaluación de la expresión de 8 genes específicos en tumores primarios de cáncer de próstata.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Cáncer de Próstata (CaP) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en Chile y el mundo. De acuerdo al National Cancer Institute de Estados Unidos, las muertes aumentan a una tasa anual de 5,4%. La razón de este alarmante crecimiento es la falta de herramientas que permitan al oncólogo predecir que pacientes desarrollarán una enfermedad metastásica, de manera de intervenir de forma oportuna y adecuada. Así, urgen nuevos y más eficaces métodos enfocados en pronosticar el grado de agresividad del CaP, y determinar así que pacientes realmente requieren tratamientos más agresivos tendientes a evitar el desarrollo de metástasis.

En función de esta necesidad, nace la investigación acerca del papel estromal en la progresión del CaP. Las células cancerosas no se encuentran aisladas de su entorno, sino que interactúan fuertemente con el microentorno tumoral o estroma, es decir, las células del órgano de origen del tumor, en este caso de la próstata. Los inventores han observado que las células que acompañan a las células tumorales en el tumor primario, en este caso en la glándula prostática, participan en la capacidad de estas de desarrollar metástasis.

Basados en estas importantes observaciones, los inventores desarrollaron el método de la invención, que permite evaluar el grado de agresividad de CaP, estudiando para ello las células estromales prostáticas, específicamente el patrón de expresión de 8 genes específicos.

En el estado de la técnica no existe ningún documento que anticipe el método de la invención, si bien existen algunas aproximaciones similares al problema. Por ejemplo el documento **US2011236903 A1** (MCCLELLAND MICHAEL et al, 2011-09-29), sugiere, especialmente en su reivindicación 17, un método de pronóstico para un sujeto diagnosticado con cáncer de próstata, que comprende: (A) proporcionar una muestra de tejido de próstata de dicho sujeto, en el que dicha muestra comprende células del estroma de la próstata; (B) medir los niveles de expresión de uno o más genes en dichas células estromales, en el que dichos uno o más genes son los genes de la firma cáncer de próstata; (C) comparar dichos niveles de expresión medido para hacer referencia a los niveles de expresión de dichos uno o más genes, en el que dichos niveles de expresión de referencia se determinan en las células del estroma de tejido de la próstata no cancerosa; y (D) si dichos niveles de expresión medidos no son significativamente mayores o menores que los niveles de expresión de referencia, identificar dicho sujeto con pronóstico relativamente mejor que si dichos niveles de expresión medidos son significativamente mayores o menores que los niveles de expresión de referencia, o si dichos niveles de expresión medidos son significativamente mayores o menores que los niveles de expresión de referencia, identificar dicho sujeto como que tiene pronóstico relativamente peor que si dichos niveles de expresión medidos no son significativamente mayores o menores que los niveles de expresión de referencia.. Donde los genes de la "firma de cáncer de próstata" se escogen de las Tablas 3 y 4, donde la Tabla 3 describe 339 genes y la Tabla 4 describe 146 genes. Donde ninguno de estos 485 genes estudiados en este documento coinciden con los 8 genes estudiados en la presente invención.

Vanveldhuizen, P.J. et al. (Oncology reports, vol. 10, no. 5, 2003, 1067-1071) describe una expresión diferencial de neuropilina-1 en tejido de estroma prostático maligno y benigno, siendo dicha expresión elevada en el estroma circundante del carcinoma invasivo/metastásico. US2013/085080 se refiere a un método para evaluar el cáncer de próstata, donde dicho método comprende determinar si un mamífero que tiene cáncer de próstata comprende o no un nivel elevado de expresión de KHDRBS3, NRP1, COL10A1, C20orf102, SSTR1, RRM2, F5, HSPC150, CDC2, TOP2A, CDH10, SERPINI1, TDO2, 25 GRIN3A, COL2A1 o ácido nucleico PCDHB10, o un polipéptido codificado por dicho ácido nucleico, en el que la presencia de dicho nivel elevado indica que dicho mamífero es susceptible a un mal resultado. También encontramos la publicación internacional WO2014052930 (A2) (MERCOLA DANIEL et al 2014-04-03) que apunta a biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de cáncer de próstata. En este documento se estudia la expresión de genes en células tumorales y de estroma, no obstante, seleccionan como biomarcador la expresión de 7 genes en células del tumor. Es decir, Mercola no anticipa el método de la invención, y además los genes estudiados no coinciden con los genes de la invención.

La publicación de Klein et al (European Urology 66 (2014) 550-560) divulga un ensayo de 17 genes para predecir a agresividad del cáncer de próstata. Donde los autores identificaron 17 genes que representan múltiples vías biológicas que discriminan la agresividad de la CaP en el tejido de la biopsia, a pesar de la heterogeneidad tumoral, la multifocalidad y el muestreo limitado al momento de la biopsia. Los autores no correlacionan directamente los estudios de estos genes con el desarrollo de metástasis. Los 17 genes estudiados por Klein no coinciden con los genes estudiados en la presente invención.

Erho et al (PLoS ONE 8(6): e66855) divulga un método para predecir metástasis de cáncer de próstata estudiando 22 marcadores en las células cancerosas del tumor primario.

De este modo la invención se diferencia de lo conocido hasta ahora, y se convierte en el primer método de diagnóstico que permite predecir la formación de metástasis de CaP, convirtiéndose en una herramienta valiosísima a la hora de definir el tratamiento más adecuado para un paciente con cáncer de próstata.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Ven de análisis de expresión génica diferencial en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), y en estroma de Cáncer de próstata de pacientes no metastásicos (CAF) y con metástasis (mCAF). Cada número indica la cantidad de genes expresados diferencialmente entre los grupos comparados. El número 8 significa que existen 8 genes expresados diferencialmente en mCAF comparado con los otros dos grupos y que constituyen la firma genética metastásica del CaP.

Figura 2: Diagramas tipo “caja” que muestran gráficamente la dispersión de la expresión de cada gen en las muestras de los 3 grupos: BAF, CAF y mCAF. Se evaluó la expresión estudiando los ARN mensajeros en 10 muestras de cada grupo, empleando microarreglos. Los genes seleccionados como firma genética para el método de la invención presentaron la mayor diferencia significativa entre los tres grupos de muestras y la menor diferencia intra grupo. Cada caja muestra la dispersión intragrupo, donde la línea gruesa es representativa de la media del grupo, como se ve en los gráficos, los genes de la invención tienen expresiones diferenciales entre los grupos evaluados, y más especialmente entre mCAF respecto de las condiciones CAF y BAF. Mediante el programa estadístico “R” se graficó la dispersión de los valores de expresión en la totalidad de muestras:

Figura 2-1: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen MFAP4 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-2: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen NRP1 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-3: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen THBS2 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-4: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen TNF en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-5: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen EBF1 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-6: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen EDN1 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-7: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen NRIP3 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 2-8: Gráfico tipo caja de dispersión en valores de expresión del gen GALNT16 en células de estroma de próstata de pacientes sin cáncer (BAF), con cáncer no metastásico (CAF) y con cáncer metastásico (mCAF).

Figura 3: Gráfico que representa la expresión relativa a partir de los datos obtenidos por microarreglos de los 8 genes que componen la firma genética. Se promedió el valor de expresión de cada gen en las 30 muestras estudiadas mediante el sistema Agilent. Se observa que muestras obtenidas desde CaP metastásico presentan un incremento en la expresión de los genes MFAP4, THBS2, NRP1, TNF, EBF1 y NRIP3, y una disminución en la expresión de GALNT16 en comparación a muestras benignas o con CaP sin metástasis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención describe a un método de prognosis (usado indistintamente en esta descripción como “pronóstico”) de metástasis en pacientes con cáncer de próstata, al estudiar el patrón de expresión de 8 genes específicos: NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en células estromales de tumores de CaP. Donde, convenientemente se estudia la expresión de al menos uno de estos 8 genes, o cualquiera de las combinaciones posibles, de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o los 8 genes identificados por los inventores como marcadores de cáncer de próstata metastásico. De estos 8 biomarcadores, los inventores han establecido que 7 de ellos tienen su expresión aumentada en Cáncer de Próstata Metastásico, estos son NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1; mientras que GALNT16 disminuye su expresión en este tipo de cáncer. En ambos casos el aumento o disminución de la expresión se establece mediante la comparación con el nivel de expresión de los mismos genes con la condición control de expresión normal. La condición control de expresión normal es la expresión en tejido de estroma prostático sin cáncer. En otra

realización la condición control de expresión es la expresión normal en tejido de estroma prostático con cáncer no metastásico.

Para determinar los genes de la firma genética de la invención los inventores estudiaron la expresión de todos los genes en tres tipos de muestras, en primer lugar células de estroma prostático de pacientes sin cáncer (usado indistintamente en esta descripción como "sin neoplasia"), lo que se conoce en la técnica como BAF (fibroblasto asociado a tejido benigno), en segundo lugar en estroma prostático de pacientes con cáncer no metastásico lo que se conoce en la técnica como CAF (fibroblasto asociado a carcinoma) y en tercer lugar en estroma prostático de pacientes con cáncer metastásico, lo que se conoce en la técnica como mCAF (fibroblasto asociado a carcinoma metastásico). De los 30.000 genes estudiados, hubo 16.955 que se expresaban, y de estos, los inventores pudieron seleccionar 8 genes que tienen una expresión diferenciada en mCAF respecto de CAF y BAF, los que constituyen la firma genética de la presente invención. Mientras mayor es la dispersión entre los datos de expresión génica, para un gen determinado menor es el valor estadístico que tiene el resultado, por lo que los inventores descartaron todos aquellos genes con una gran dispersión en su expresión en una condición determinada (BAF CAF o mCAF) y se dejaron aquellos con un patrón de expresión similar (baja dispersión). En cambio, mientras mayor sea la distancia entre los distintos grupos en el eje vertical, significa que los valores de expresión para ese gen son diferenciales estadísticamente en los grupos comparados. Por lo que los inventores seleccionaron en una segunda condición que hubiese además de una baja dispersión intragrupo, una alta diferenciación inter grupo. Por ello se puede visualizar que muestras mCAF presentan una dispersión por cuantiles diferente a BAF o CAF, estas dos últimas presentan una dispersión similar. Estos resultados se muestran en la figura 2, donde las figuras 2-1 a 2-8 muestran el resultado para cada uno de los genes de la invención.

Como puede apreciarse en la figura 2 las diferencias de expresión entre el grupo mCAF y CAF y BAF es clara en cada uno de los genes estudiados, por lo que para la realización de la invención puede estudiarse la expresión de todos los genes de la invención o de sólo uno de ellos o todas las combinaciones posibles, ya que un resultado positivo de acuerdo con el método de la invención es suficiente para predecir cáncer de próstata metastásico, donde resultados adicionales validan y reafirman la prognosis de metástasis en un paciente.

Para desarrollar el método de la presente invención es necesario primero obtener una muestra de estroma prostático. En una realización de la invención estas muestras se obtienen de las biopsias que se realizan a pacientes con sospecha de cáncer o ya diagnosticados con CaP, por lo que no significarían un procedimiento adicional o distinto del habitualmente realizado para estos pacientes. En otra realización de la invención, una muestra de estroma prostático se obtiene en un procedimiento adicional a la biopsia que se realiza a un paciente con sospecha de cáncer o ya diagnosticado con CaP. Si bien el método de la invención estudia la expresión de genes en el estroma, los análisis pueden realizarse sobre muestras complejas con distintos tipos celulares, que contengan células estromales.

De este modo, una realización preferida de la presente invención comprende obtener el ARNm de tejido de tumores primarios de CaP, y amplificar por RT PCR los genes escogidos entre NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, y establecer el patrón de expresión de dichos genes. Donde, si se observa una sobreexpresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1, o una disminución en la expresión de GALNT16, este resultado es indicativo de metástasis en los pacientes con cáncer de próstata.

Para establecer el patrón de expresión de estos genes puede emplearse cualquier método disponible en la técnica al momento de realizar la invención. Si el producto génico es ARN, este puede evaluarse por microarreglo, SAGE, western blotting, RT-PCR, TRAC, PCR cuantitativo, multiplex qPCR o qNPA, o cualquier otra técnica disponible al momento de realizar la invención.

En una realización preferida la expresión de los genes de la invención se establece por Real Time PCR sobre el ARNm de la muestra de tejido.

En otra realización preferida la expresión de los genes de la invención se establece por microarreglo sobre el ARNm de la muestra de tejido.

En otra realización preferida la expresión de los genes de la invención se establece por multiplex qPCR sobre el ARNm de la muestra de tejido.

En otra realización de la invención el nivel de expresión de los genes se determina estudiando las proteínas codificadas por los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16. Donde la concentración de estas proteínas en la muestra se puede evaluar por ELISA, espectrometría de masas, técnicas proteómicas, o inmunohistoquímica, o cualquier otra técnica disponible al momento de realizar la invención. En cada caso se debe comparar la expresión del producto génico, en este caso proteínas, de al menos uno de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16 con condiciones normales de expresión, por ejemplo de pacientes sin neoplasia (BAF) y establecer si hay una sobreexpresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 o un silenciamiento o disminución de expresión del gen GALNT16. Donde esta diferencia para cualquiera de los genes o convenientemente todos ellos, incluyendo todas las posibles combinaciones son indicativos del desarrollo de una enfermedad metastásica.

- En un segundo lugar la invención también describe a un kit para pronosticar metástasis en cáncer de próstata mediante el método de la invención, donde este kit consiste en los medios para cuantificar los productos de expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en una muestra que comprende tejido prostático, en donde los medios provistos en el kit comprenden reactivos, soluciones y elementos de soporte físico, En donde los reactivos corresponden a un polipéptido u oligonucleótido para detectar nivel de expresión de genes en donde los reactivos corresponden a cualquiera de entre: anticuerpos específicos para unión a proteínas correspondientes a cualquiera de los productos de la expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16; y/o secuencias de oligonucleótidos, tales como partidores o sondas específicos para hibridar a cualquier de los productos de la expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16. Las soluciones del kit comprenden las soluciones necesarias para determinar el nivel de expresión de los genes en un equipamiento adecuado. Por otro lado los medios de soporte físico pueden ser contenedores o tubos para contener los distintos reactivos y soluciones del kit.
- Para el experto en la técnica es evidente que existen numerosos partidores de PCR o sondas posibles de ser diseñados para realizar estas amplificaciones, y que los partidores o sondas utilizados no son limitantes para la realización de la invención. Pueden utilizarse ya sea partidores o sondas descritos en la literatura para estos genes o diseñarse nuevos partidores o sondas con este propósito, donde todas estas realizaciones están comprendidas en el alcance de la presente invención.
- En tercer lugar, la invención también se refiere al uso del kit descrito anteriormente o de un kit que comprende medios para cuantificar los productos de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en una muestra que comprende células estromales prostáticas para la predicción de metástasis en cáncer de próstata, dicho uso comprende establecer si la expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 está aumentada o si la expresión del gen GALNT16 está disminuida, lo que se correlaciona con el pronóstico de metástasis en el cáncer de próstata.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1. Prueba para establecer los biomarcadores.**
Se obtuvieron células estromales de próstata de pacientes sin evidencia de neoplasia (BAF), de tumores primarios de CaP de pacientes que habían desarrollado metástasis clínica (mCAF) y de pacientes con CaP que no habían desarrollado metástasis clínica (CAF). Todas estas muestras fueron obtenidas desde biopsias por punción mediante explantes de tejido con el respectivo consentimiento informado por parte de los donantes. Se recolectaron 30 muestras, 10 por cada grupo.
- Las células obtenidas fueron cultivadas en el laboratorio hasta obtener un número crítico para realizar los estudios. Para realizar los experimentos de expresión génica, en primera instancia se extrajo ARNm de cada una de las 30 muestras (10 por cada condición) con el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometió una muestra del mismo a electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El ARN se cuantificó a 260 nm en un equipo Nanodrop 1000 (Thermo). Cada muestra fue evaluada por un ensayo de hibridación directa de solo un color, utilizando el sistema Agilent Human Gene expression 4x44Kv2v y corridas en iScan system. Los datos de expresión génica fueron analizados mediante bioinformática con el programa estadístico "R"
- Se realizaron perfiles de expresión génica mediante microarreglos de estas células estromales para 30.000 genes en cada caso. Los resultados indicaron que el estroma prostático en pacientes con CaP metastásico presentan perfiles de expresión génica diferentes al estroma prostático de pacientes sin cáncer o con CaP no metastásico. Desde los 30.000 genes estudiados, se encontraron 16.955 genes que se expresaban en todos los grupos, de estos genes se seleccionaron en primer lugar una serie de genes cuya expresión diferencial presentó un alto grado de significancia. Los resultados demuestran que muestras de células de estroma mCAFs presentan un perfil de expresión génica diferencial, en comparación con muestras de estroma BAFs o CAFs. Entre los genes expresados diferencialmente establecimos 8 que presentaron la mayor diferencia estadística entre muestras de pacientes con CaP metastásico versus muestras benignas o con CaP sin metástasis. Estos resultados se esquematizan en la Figura 1. Estos 8 genes son: NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16. La expresión diferencial relativa para cada uno de estos genes en los distintos grupos estudiados se esquematiza en la Figura 2, donde hay un gráfico de caja para cada uno de estos 8 genes. Adicionalmente todos estos datos se resumen en la figura 3.
- Ejemplo 2. Estudio de expresión de los genes de la invención en pacientes con CaP.**
Se diseñaron partidores para PCR (Reacción en cadena de polimerasa) para los genes identificados en el ejemplo 1, y se estudiaron 50 casos de pacientes sin evidencia de neoplasia (BAF), con CaP y metástasis clínica (mCAF) y con CaP sin metástasis clínica (CAF), mediante PCR en tiempo real. Los partidores utilizados se muestran en la Tabla 1.
- En cada caso se tomó una biopsia por punción mediante explantes de tejido, desde donde se obtuvo una muestra de ARNm total, la que incluye el ARN de células de estroma y de células de tumor. La extracción del ARN total se realizó mediante un kit comercial (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para determinar la integridad del ARN

total extraído, se sometió una muestra del mismo a electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El ARN se cuantificó a 260 nm en un equipo Nanodrop 1000 (Thermo).

Como control positivo de la reacción se cuantificó el gen 18S y para normalizar los resultados en base a la cantidad total de estroma de la muestra, se cuantificó el mensajero de Vimentina, los partidores utilizados en cada caso también se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1: Partidores utilizados para los genes de la invención.

Gen	Partidor directo (5'-3')	Partidor reverso (5'-3')	Producto
THBS2	CGTGGACAATGACCTTGTTG	GCCATCGTTGTCATCATCAG	169 pb
MFAP4	TATCTACGCCCAGGGCTATC	CAAAGCCCAGCTTGTAGTCG	182 pb
NRP1	AAATGCGAATGGCTGATTGAG	CTCCATCGAAGACTTCCACGTAGT	121 pb
TNF	ATCTACCTGGGAGGCGTCTT	GAGTGGCACAAGGAACTGGT	99 pb
EBF1	GCATCCAACGGAGTGGAAG	GATTTCCGCAGGTTAGAAGGC	175 pb
EDN1	CGTAGAAGTCTGGTCTAATGTGTCA	GTACATCAAAATTCAATCCAACCTC	250 pb
NRIP3	ATTTCCATTGATGACAAGCTTCC	CTGCTTTTAACTCTGGTAAAGTGGA	155 pb
GALNT16	AACCTCTGCTCTGGATTGAA	AGACACTTGGCTGCTGAC	127 pb
Vimentina	AAAGTGTGGCTGCCAAGAAC	AGCCTCAGAGAGGTCAGCAA	74 pb
18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	151 pb

Los datos obtenidos corroboran lo establecido en los microarreglos del ejemplo 1, encontrándose que al comparar la expresión relativa de estos productos génicos en todos los casos hay una correlación entre la sobre expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1 y EBF1, y la disminución de la expresión o silenciamiento de GALNT16 y las manifestaciones clínicas de estos pacientes. Es decir, en los casos de pacientes con metástasis (mCAF) se ve un aumento de la expresión de ARNm de NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1 y EBF1, y la disminución de la expresión de ARNm de GALNT16, respecto a la expresión en muestras de pacientes sin neoplasia (BAF) y respecto a la expresión en muestras de pacientes con cáncer de próstata no metastásico.

De este resultado se puede determinar que es posible identificar claramente, mediante expresión génica de células estromales del tumor primario, a los pacientes con cáncer de próstata metastático.

Para el experto en la técnica será evidente que es posible desarrollar un kit para el método de la invención, incluyendo por ejemplo los partidores de PCR indicados en este ejemplo y los reactivos necesarios para realizar un PCR en tiempo real, o cualquier otra técnica cuantitativa de ARNm o de otro producto de expresión de los genes de la invención, así mismo, es posible desarrollar microarreglos que determinen el nivel de expresión de estos genes. Dado que los genes son conocidos y que las técnicas de diseño de partidores o sondas están estandarizadas en la técnica, el método de la invención puede ser realizado con cualquier par de partidores o de sondas que amplifiquen específicamente estos genes, no siendo esto una limitante del método.

REIVINDICACIONES

1. Método ex vivo de pronóstico de metástasis en cáncer de próstata, CARACTERIZADO porque comprende las siguientes etapas:
 - a) determinar el nivel de expresión de los siguientes genes: NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en una muestra biológica que contiene células de estroma de tumor primario de cáncer de próstata;
 - b) establecer si la expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 está aumentada o si la expresión del gen GALNT16 está disminuida, lo que se correlaciona con el pronóstico de metástasis en cáncer de próstata.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque el nivel de expresión de estos genes se establece comparando expresión de cada producto génico evaluado contra la condición control de expresión normal.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque la condición de expresión normal es la expresión normal en tejido de estroma prostático.
4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque se determina el nivel relativo de transcritos de ARN de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque el nivel de expresión de ARN se determina por microarreglo, SAGE, western blotting, RT-PCR, TRAC, PCR cuantitativo, multiplex qPCR o qNPA.
6. Método de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque se determina el nivel de proteínas codificadas en los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el nivel de expresión de las proteínas se determina por ELISA, espectrometría de masas, técnicas proteómicas, o inmunohistoquímica.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque la muestra biológica que contiene células de estroma de tumor primario de cáncer de próstata se obtiene por una biopsia de tumor primario de cáncer de próstata.
9. Kit para pronosticar metástasis en cáncer de próstata mediante el método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque consiste en medios para cuantificar los productos del grupo de genes que consiste de NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en una muestra que comprende células de estroma prostático, en donde los medios para cuantificar consisten en reactivos, soluciones y elementos de soporte físico, en donde los reactivos corresponden a un polipéptido o un oligonucleótido para detectar nivel de expresión de los genes, en donde los reactivos corresponden:
 - a anticuerpos específicos para unión a proteínas correspondientes a cualquiera de los productos de la expresión del grupo de genes que consiste en NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, o
 - a partidores o sondas de oligonucleótidos específicos para hibridar a los productos de la expresión del grupo de genes que consiste en NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16.
10. Uso del Kit de acuerdo con la reivindicación 9 para cuantificar los productos de genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 y GALNT16, en una muestra que comprende células de estroma prostático para pronosticar metástasis en cáncer de próstata, donde dicho uso comprende establecer si la expresión de los genes NRP-1, MFAP4, NRIP3, THBS2, TNF, EDN1, EBF1 está aumentada o si la expresión del gen GALNT16 está disminuida, lo que se correlaciona con el pronóstico de metástasis en cáncer de próstata.

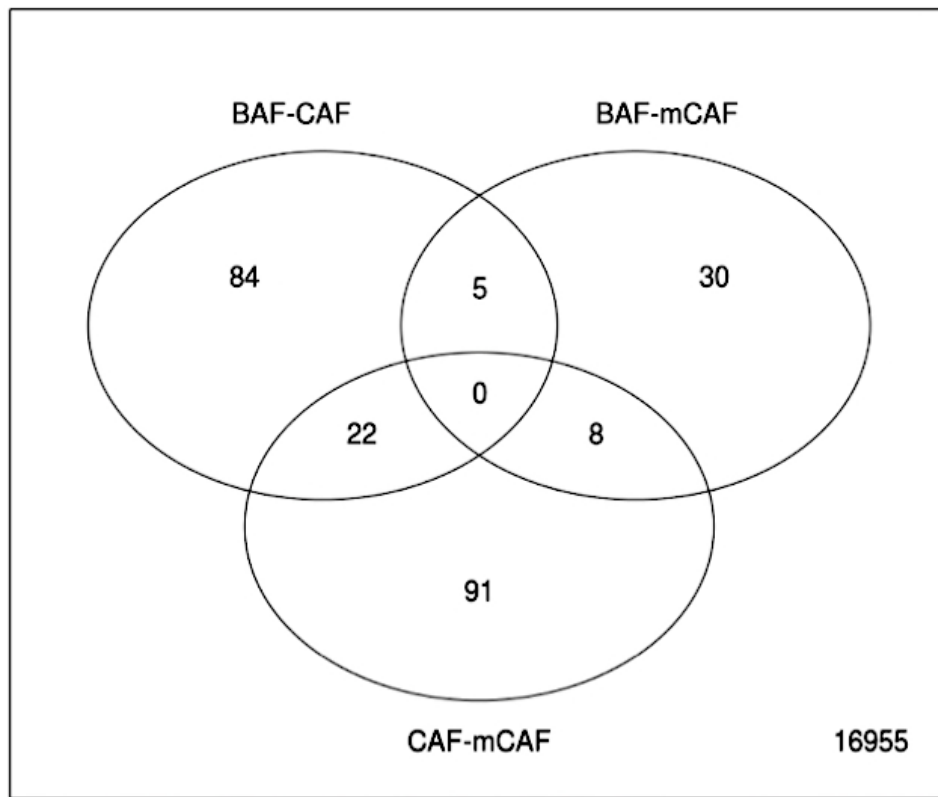


Figura 1

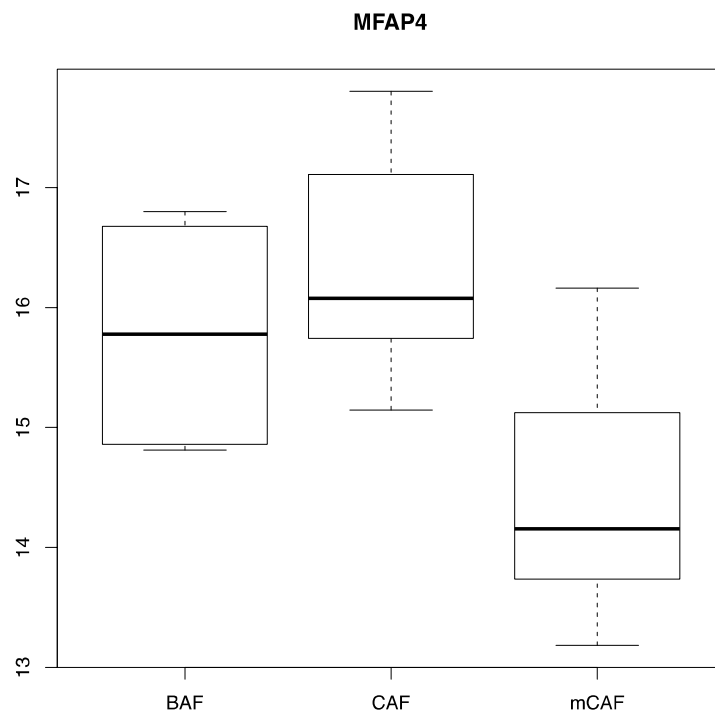


Figura 2-1

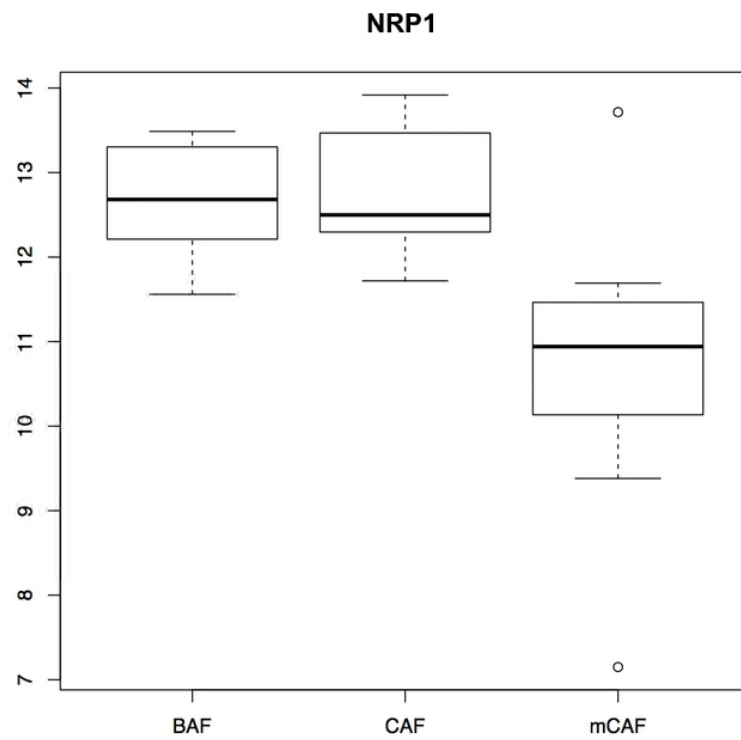


Figura 2-2

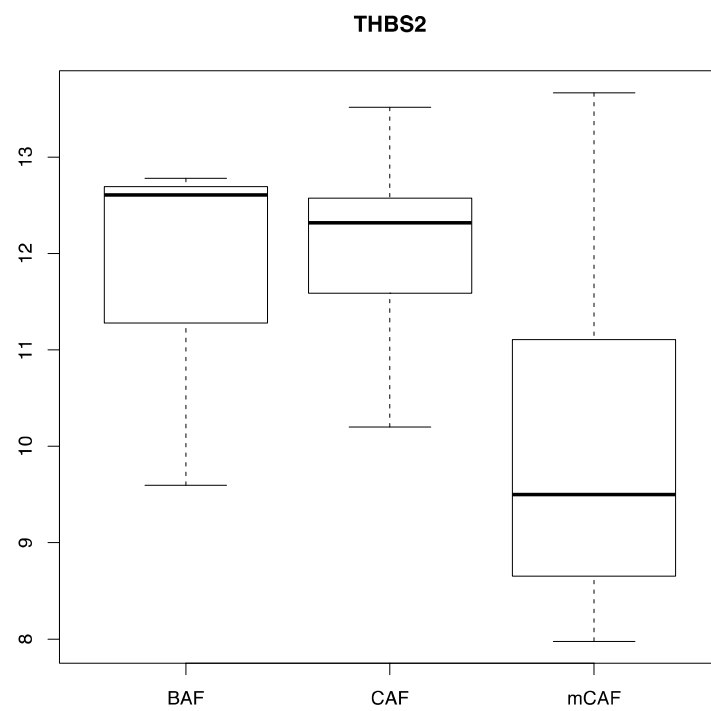


Figura 2-3

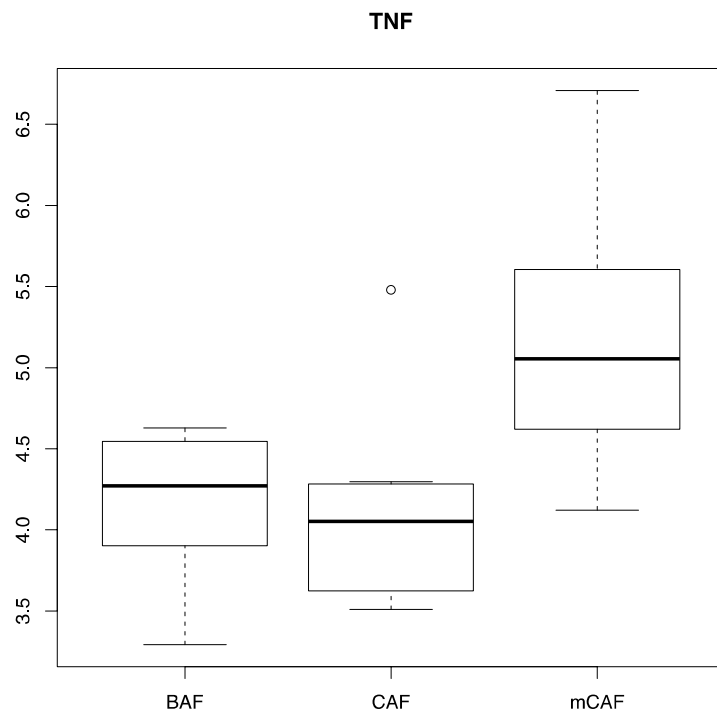


Figura 2-4

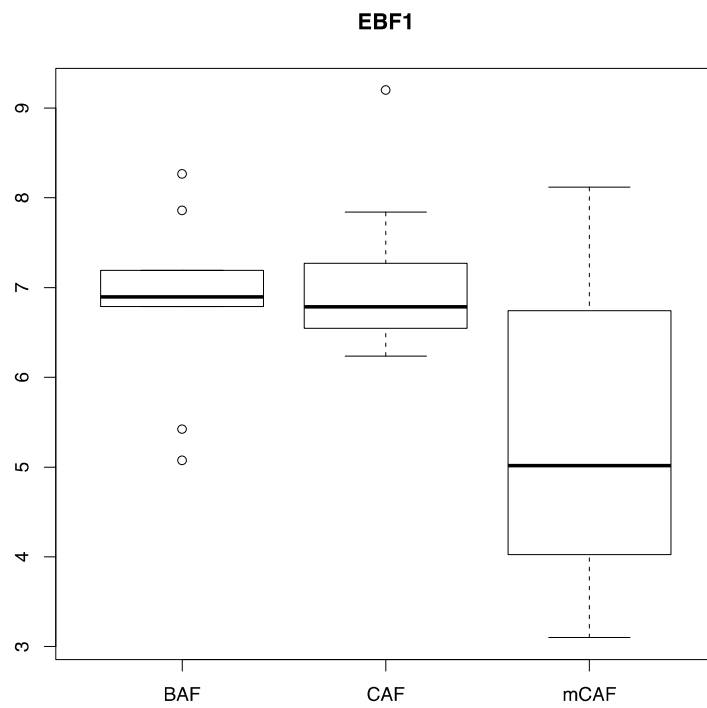


Figura 2-5

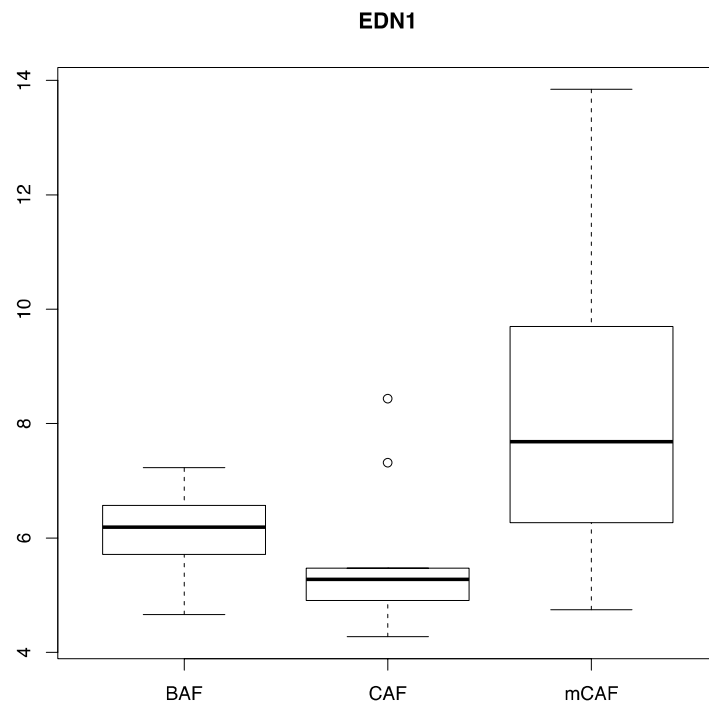


Figura 2-6

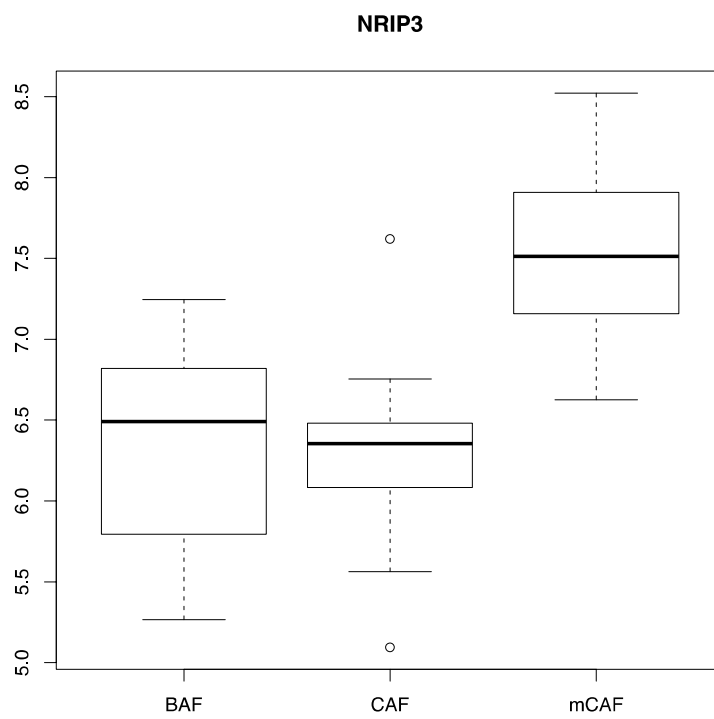


Figura 2-7

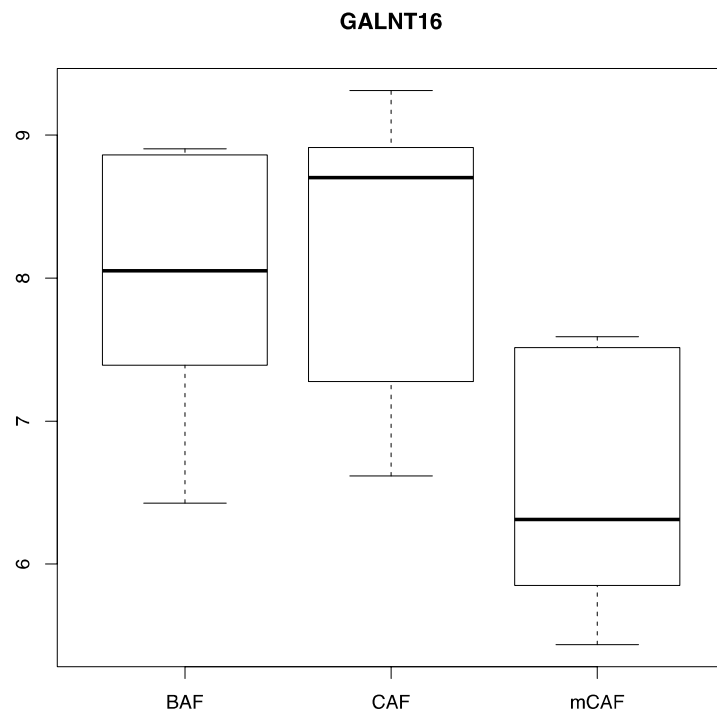


Figura 2-8

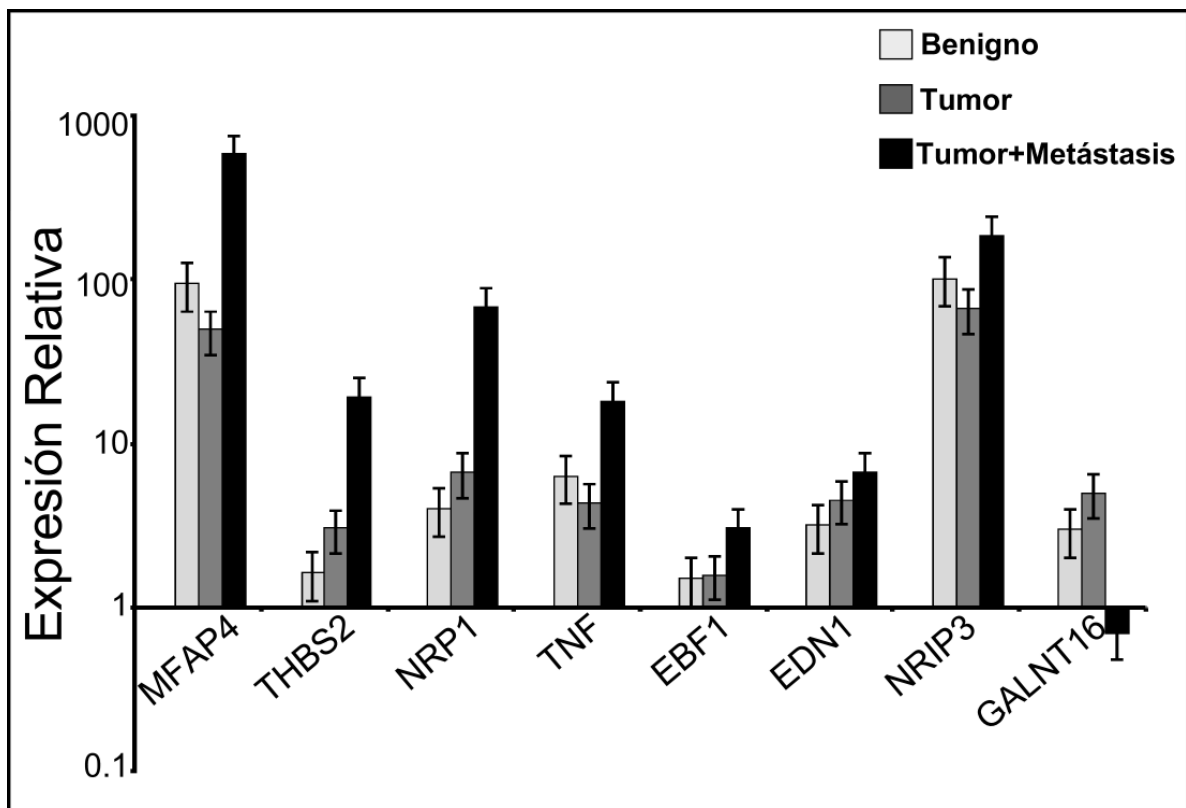


Figura 3