



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 304 462**

⑤1 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

①2

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02789696 .8**

⑧6 Fecha de presentación : **15.11.2002**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1456413**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

⑤4 Título: **Método de detección de cáncer de próstata.**

③0 Prioridad: **16.11.2001 US 333296 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2008**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2008**

⑦3 Titular/es:  
**The Johns Hopkins University School of Medicine  
111 Market Place, Suite 906  
Baltimore, Maryland 21202, US**

⑦2 Inventor/es: **Sidransky, David**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**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 de detección de cáncer de próstata.

5 **Declaración de apoyo gubernamental**

Esta invención se hizo en parte con apoyo gubernamental bajo la Concesión de NIH N° 1U01CA84986 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH). El gobierno puede tener ciertos derechos en esta invención.

10 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general al campo del estado de metilación de genes y elementos reguladores y más específicamente a la detección de cáncer de próstata por métodos de PCR convencionales y cuantitativos.

15 **Fundamento de la invención**

El adenocarcinoma prostático es el cáncer no cutáneo diagnosticado más comúnmente en hombres en los Estados Unidos. Es probable que siga aumentando la frecuencia porque la gente sobrevive más tiempo y más hombres de mediana edad experimentan examen rutinario de la enfermedad. Los hombres diagnosticados con enfermedad de pequeño volumen de fase temprana tienen el mejor resultado tras el tratamiento curativo. Por tanto, el propósito de los programas de detección temprana es diagnosticar cáncer en una fase temprana curable.

El algoritmo estándar de oro para diagnosis supone actualmente examen rectal digital y medición de antígeno específico de próstata (PSA) en suero y, si alguno es sospechoso, se sigue por biopsia con aguja prostática transrectal. Sin embargo, el PSA del suero puede elevarse en condiciones benignas y la biopsia con aguja puede fracasar al identificar incluso magnitudes significativas de cáncer debido a error de muestreo. Por tanto, se necesita la introducción de ensayos de diagnóstico adicionales para aumentar la sensibilidad de la diagnosis de cáncer de próstata.

Aunque se han descrito varias alteraciones genéticas específicas en adenocarcinoma de próstata, tales como inactivación de TP53 y PTEN, la más común simple y más temprana de éstas es metilación de la región 5'-reguladora del gen GSTP1 (documento WO 99/55905). La detección de esta alteración epigenética en fluidos corporales se ha conseguido con éxito usando técnicas basadas en ADN. Sin embargo, estos estudios más tempranos incluían sólo un número de pacientes relativamente pequeño o se enfocaban principalmente sobre casos de enfermedad avanzada.

Recientemente, se ha desarrollado un método específico de PCR (RTQ-MSP) específica para metilo cuantitativa en tiempo real, que permite la realización de un análisis de multiplicación cuantitativa altamente precisa, rápido y no isotópico mediante la comprobación óptica continua de un ensayo de PCR fluorogénica. La aplicación de este método para evaluar el estado de metilación del gen p16 en aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple, reveló una concordancia completa con el análisis MSP convencional (C-MSP). En este mismo estudio, se mostró que la RTQ-MSP era lo suficientemente sensible para detectar hasta 10 equivalentes de genoma de secuencia de p16 metilado.

Sin embargo, hay necesidad en la técnica de desarrollar ensayos de diagnóstico en fase temprana sensibles y precisos para detectar adenocarcinoma de próstata.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que puede usarse para detectar neoplasia la medición cuantitativa del nivel de metilación de biomarcadores, por ejemplo, la región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1). Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos y juegos útiles para detectar neoplasia, especialmente adenocarcinoma de próstata. En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar neoplasia de próstata. El método incluye determinar una relación de metilación de una muestra, por ejemplo, una muestra de tejido de un sujeto. La relación de metilación es una relación entre el nivel de metilación de una región de promotor, por ejemplo, de glutatona-S-transferasa (GSTP1), con relación al nivel de metilación de una región de un gen de referencia. Si la relación de metilación es más alta en la muestra, por ejemplo, tejido, del sujeto de ensayo que la relación de metilación en una muestra, o tejido de sujetos normales o de un tejido o muestra de un sujeto con hiperplasia, es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto de ensayo.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar neoplasia de próstata determinando el nivel de metilación de una región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1) en una muestra de fluido corporal, tal como orina o suero, de un sujeto. El nivel de metilación se determina usando una reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional, o el método de PCR en tiempo real/cuantitativa. Si el nivel de metilación es más alto en el sujeto de ensayo que el nivel de metilación en un sujeto normal, es indicativo de neoplasia de próstata en el sujeto.

En otra realización todavía, la presente invención proporciona un juego para detectar hiperplasia de próstata. El juego incluye un primer recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de una región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1), un segundo recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación

de una región de un gen de referencia y un tercer recipiente que contiene una primera y una segunda sondas de oligonucleótido, con la primera sonda de oligonucleótido específica para la multiplicación de una región de promotor de GSTP1 y la segunda sonda de oligonucleótido específica para la multiplicación de la región del gen de referencia. En un aspecto, al menos uno de los cebadores para la multiplicación de la región de promotor de GSTP1 o una de las sondas de oligonucleótido es capaz de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

En otro aspecto, el juego contiene un primer recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de una región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1), siendo capaces los cebadores de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado, y una instrucción que describe que el juego es útil para detectar adenocarcinoma de próstata en una muestra de fluido corporal de un sujeto y que un nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1 determinado por reacción en cadena de polimerasa convencional usando los cebadores del primer recipiente que sea más alto que el nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1 en un sujeto normal es indicativo de adenocarcinoma de próstata en el sujeto con una sensibilidad no inferior al 40%.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para detectar neoplasia de próstata multiplicando una región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1) en una muestra biológica de un sujeto mediante cebadores de oligonucleótido en presencia de al menos una sonda de oligonucleótido específica, modificándose la región de promotor por un agente que modifica citosina no metilada para producir un ácido nucleico convertido y siendo capaz al menos un cebador de oligonucleótido o sonda de oligonucleótido específica de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado, y determinar el nivel de metilación de la región de promotor determinando el nivel de multiplicación de la región de promotor en base al desplazamiento mediado por multiplicación de la sonda de oligonucleótido específica. Si el nivel de metilación es más alto en el sujeto de ensayo que el nivel de metilación en un sujeto normal, es indicativo de neoplasia de próstata en el sujeto.

## Descripción breve de las figuras

La Figura 1 muestra las curvas de multiplicación para un caso positivo en carcinoma por GSTP1 QMSP en 4/6 biopsias (LB = base izquierda, LM = medio izquierdo, RA = pico derecho, RB = base derecha). Se hizo pasar cada biopsia por cuadruplicado y se comparó con diluciones estándares de testigo positivo (S1-5 = 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg de ADN estándar respectivamente). Este caso también fue positivo en carcinoma por histología en 2/6 biopsias (base izquierda 2 mm, medio izquierdo 1 mm). La extensión del tumor vista histológicamente en biopsia correspondía con los niveles de metilación de GSTP1 medidos.

La Figura 2 muestra las curvas ROC para histología (azul), GSTP1 QMSP (verde) y ensayos combinados (rojo).

La Figura 3 muestra la distribución de los niveles de metilación de GSTP1 en tejido y fluidos corporales. (a) Se detectó metilación de GSTP1 por RTQ-MSP en el 29% de pacientes con BPH y el 91,3% de pacientes con adenocarcinoma de próstata localizado clínicamente (TRP). Las barras llenas indican la mediana dentro de un grupo de pacientes. Los asteriscos indican las muestras con valores 0 que no pueden representarse en una escala logarítmica (BPH:  $n = 31$ ; TRP:  $n = 69$ ). (b) Niveles de metilación de GSTP1 (RTQ-MSP) en muestras de orina ( $n = 13$ ) y plasma ( $n = 9$ ) apareadas positivas. Las barras llenas indican la mediana dentro de un grupo de pacientes. Los asteriscos indican las muestras con valores 0 que no pueden representarse en una escala logarítmica (orina:  $n = 56$ ; plasma:  $n = 60$ ).

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que puede usarse la medición cuantitativa del nivel de metilación de biomarcadores, por ejemplo, la región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1), para detectar neoplasia, por ejemplo, adenocarcinoma de próstata. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos y juegos útiles para detectar neoplasia, especialmente adenocarcinoma de próstata, determinando el nivel o la relación de metilación de biomarcadores.

Según un aspecto de la presente invención, puede detectarse neoplasia en una célula o tejido midiendo cuantitativamente el nivel de metilación de uno o más biomarcadores. Los biomarcadores de la presente invención pueden ser cualquier marcador cuyo nivel de metilación esté asociado característicamente con el crecimiento anormal o proliferación de una célula o tejido. Por ejemplo, los niveles de metilación de diversos genes supresores de tumores están asociados con neoplasia o crecimiento de tumores y pueden usarse como biomarcadores de la presente invención. En una realización, el biomarcador de la presente invención es glutatona-S-transferasa (GSTP1).

En otra realización, el biomarcador es una región de promotor de GSTP1. La región de promotor de GSTP1 puede ser cualquier región dentro del promotor de GSTP1, por ejemplo, cualquier región que contenga uno o más lugares asociados con metilación, tales como dinucleótidos CpG y adecuados para medición cuantitativa tal como multiplicación por reacción en cadena de polimerasa (PCR). El promotor de GSTP1 incluye usualmente la región reguladora situada aguas arriba o 5' de GSTP1. El análisis de secuencia de la región de promotor de GSTP1 muestra que casi el 72% de los nucleótidos son CG y aproximadamente el 10% son dinucleótidos CpG.

Según la presente invención, la neoplasia en una célula o tejido puede detectarse midiendo cuantitativamente el nivel de metilación de uno o más biomarcadores usando, por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real con al menos un cebador de oligonucleótido o sonda específica de oligonucleótido que sean capaces de

distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado. En general, el nivel de metilación medido cuantitativamente en una muestra biológica de un sujeto, por ejemplo, un ser humano, que sea más alto que el nivel de metilación medido cuantitativamente en una muestra biológica de un sujeto normal es indicativo de neoplasia en el sujeto.

5 Un sujeto normal según se usa en la presente invención puede ser cualquier sujeto que no tenga neoplasia detectable por medios distintos de los métodos proporcionados por la presente invención. Por ejemplo, un sujeto normal en adenocarcinoma de próstata puede ser cualquier ser humano que no tenga ningún síntoma clínico de adenocarcinoma de próstata, un nivel normal de PSA y una diagnosis histológica exenta de adenocarcinoma de próstata. En general, un nivel asociado con un sujeto normal según se usa en la presente invención incluye un valor obtenido estadísticamente  
10 asociado con una población de sujetos normales. Por ejemplo, el nivel de metilación en un sujeto normal según se usa en la presente invención incluye el nivel de metilación medio o promedio y un intervalo para una población significativa estadísticamente de sujetos normales.

15 La muestra biológica de la presente invención puede ser cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados por la presente invención. En una realización, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de tejido, por ejemplo, un espécimen de biopsia tal como muestras de biopsia con aguja. En otra realización, la muestra biológica de la presente invención es una muestra de fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma, orina y eyaculado.

20 Según una realización de la presente invención, puede detectarse adenocarcinoma de próstata en una célula o tejido midiendo cuantitativamente el nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1, por ejemplo, usando PCR específica para metilación en tiempo real. Por ejemplo, el nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1 puede determinarse determinando el nivel de multiplicación de la región de promotor de GSTP1 en base a desplazamiento mediado por multiplicación de una o más sondas cuyos lugares de unión están situados dentro del amplicón.

25 En general, la PCR específica para metilación cuantitativa en tiempo real se basa en la comprobación continua de una PCR fluorogénica progresiva por un sistema óptico. Tales sistemas de PCR usan habitualmente dos cebadores de multiplicación y una sonda de hibridación fluorogénica, específica para el amplicón adicional, que se une específicamente a un lugar dentro del amplicón. La sonda puede incluir uno o más restos de marca de fluorescencia. Por  
30 ejemplo, la sonda puede estar marcada con dos colorantes fluorescentes: 1) una 6-carboxifluoresceína (FAM), situada en el extremo 5', que sirve como informador, y 2) una 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), situada en el extremo 3', que sirve como apagador. Cuando tiene lugar multiplicación, la actividad de la exonucleasa 5'-3' de la polimerasa de ADN Taq divide al informador de la sonda durante la fase de extensión, liberándola así del apagador. El aumento resultante de la emisión de fluorescencia del colorante informador se comprueba durante el procedimiento de PCR y  
35 representa el número de fragmentos de ADN generados.

En una realización, se diseñan cebadores de oligonucleótido para unirse específicamente a lugares de unión de cebador metilados, por ejemplo, ADN convertido con bisulfito dentro del extremo 3' de la región de promotor del gen GSTP1, y se diseña una sonda para reasociarse específicamente dentro del amplicón durante la extensión. En  
40 otra realización, se diseñan cebadores de oligonucleótido para unirse a lugares de unión de cebador metilados o no metilados, y se diseña la sonda para reasociarse específicamente con lugar de unión de sonda metilado, por ejemplo, lugar de unión convertido con bisulfito. En otra realización todavía, se diseñan cebadores de oligonucleótido y sondas para unirse específicamente a lugares de unión metilados, por ejemplo, lugares de unión convertidos con bisulfito.

45 Según otro aspecto de la presente invención, se indica neoplasia de una muestra biológica cuando una relación de metilación de un biomarcador es más alta que la relación de metilación en un sujeto normal. La relación de metilación de la presente invención incluye la relación del nivel de metilación de un biomarcador y el nivel de una región en un gen de referencia determinado por el mismo medio usado para determinación del nivel de metilación del biomarcador.  
50 Usualmente, la relación de metilación de la presente invención está representada por la relación del nivel de metilación de un biomarcador y el nivel de una región en un gen de referencia determinado por el mismo medio usado para determinación del nivel de metilación del biomarcador.

55 En una realización, la relación de metilación de la presente invención es la relación del nivel de metilación de un biomarcador y el nivel de una región de un gen de referencia, ambos de los cuales se miden cuantitativamente usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real. Por ejemplo, el nivel de metilación de un biomarcador de una muestra de un sujeto puede medirse cuantitativamente usando un par de cebadores y una sonda de oligonucleótido, en donde un cebador, ambos cebadores, la sonda de oligonucleótido o ambos cebadores y la sonda de oligonucleótido son capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado, por ejemplo, después de modificarse el ácido  
60 nucleico por un agente de modificación, por ejemplo, bisulfito que convierte citosina no metilada en un ácido nucleico convertido.

En otra realización, la relación de metilación de la presente invención es la relación del nivel de metilación de una región de promotor de GSTP1 y el nivel de una región de un gen de referencia, ambos de los cuales se miden cuantitativamente usando PCR en tiempo real. En otra realización aún, la relación de metilación de la presente invención es la relación del nivel de metilación de una región de promotor de GSTP1 medido por PCR en tiempo real específica para metilación y el nivel de una región de un gen de referencia medido por PCR en tiempo real.  
65

La región de un gen de referencia de la presente invención puede ser cualquier región de un gen que tenga uno o más lugares o regiones que estén exentos de lugares de metilación, por ejemplo, exentos de dinucleótidos CpG. Por ejemplo, la región de un gen de referencia puede ser una región que tenga dos lugares de unión de cebador para multiplicación tal como PCR que estén exentos de dinucleótidos CpG o una región que tenga al menos un lugar de unión de sonda de oligonucleótido específica para PCR en tiempo real que esté exento de dinucleótidos CpG. En un aspecto, la región de un gen de referencia de la presente invención es una región de gen MYOD. En otro aspecto, la región de un gen de referencia de la presente invención es una región de gen ACTB. En otra realización todavía, la región de un gen de referencia de la presente invención es una región que no está sujeta frecuentemente a alteraciones del número de copias, tales como multiplicación o supresión de genes.

En general, según la presente invención, el nivel de una región de un gen de referencia se mide cuantitativamente usando PCR en tiempo real con cebadores y sondas específicas que se unen específicamente a lugares después de conversión con bisulfito pero sin discriminar directa o indirectamente el estado de metilación de los lugares.

Según una realización de la presente invención, el adenocarcinoma de próstata está indicado en un sujeto cuando una relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 en una muestra biológica del sujeto es mayor que 5, o 10, porque la relación de metilación está representada por la relación del nivel de metilación de una región de promotor de GSTP1 y el nivel de una región de un gen de referencia, por ejemplo, MYOD o ACTB, por 1000. Por ejemplo, cuando una relación de metilación por 1000 es mayor que 3, o 5 o incluso 10, es indicativo de adenocarcinoma de próstata en el sujeto.

Según otro aspecto de la presente invención, la relación de metilación de la presente invención puede usarse para diagnosticar neoplasia independientemente o en combinación con otros métodos de diagnóstico, por ejemplo, métodos de diagnóstico basados en información genómica, valoración proteómica o análisis histológico de muestras de tejido. En una realización, la relación de metilación de la presente invención se usa independientemente o en combinación con análisis histológico para detectar neoplasia.

En otra realización, la relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 se usa independientemente de análisis histológico para la detección de adenocarcinoma de próstata. En general, según la presente invención, los métodos de utilización de la relación de metilación para detectar adenocarcinoma de próstata como se proporcionan por la presente invención son más sensibles que el análisis histológico en su forma disponible actualmente. Un sujeto que tenga una relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 mayor que la relación de metilación en un sujeto normal, por ejemplo, mayor que 5 o 10, es indicativo de adenocarcinoma de próstata, a la luz del hecho de que se determine que el sujeto está exento de adenocarcinoma de próstata por análisis histológico.

Alternativamente, puede usarse la relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 en combinación con análisis histológico para la detección de adenocarcinoma de próstata. Por ejemplo, según la presente invención, la detección de adenocarcinoma de próstata en un sujeto puede incluir la determinación de la relación de metilación y un análisis histológico de muestras de tejido de próstata, por ejemplo, biopsia con aguja del sujeto, y una relación de metilación más alta que la normal, por ejemplo, mayor que 5 o 10, sola o en combinación con una diagnosis histológica de adenocarcinoma de próstata, es indicativa de adenocarcinoma de próstata.

En otra realización todavía, la relación de metilación de la presente invención puede usarse independientemente o en combinación con diagnósticos basados en valoración proteómica. Por ejemplo, según la presente invención, la relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 en un sujeto puede usarse independientemente o en asociación con la determinación del nivel de PSA en el sujeto para detectar adenocarcinoma de próstata.

Según la presente invención, la relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 no se correlaciona en general directamente con el nivel de PSA, pudiendo usarse así la relación de metilación como una valoración independiente del nivel de PSA para detectar adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, una relación de metilación mayor que la normal de una región de promotor de GSTP1 en un sujeto es indicativa de adenocarcinoma de próstata en el sujeto con un nivel de PSA normal. De igual modo, la relación de metilación puede excluir cáncer en un sujeto con un nivel de PSA falsamente alto. Alternativamente, la detección de adenocarcinoma de próstata puede incluir la determinación de la relación de metilación de una región de promotor de GSTP1 y el nivel de PSA; una relación de metilación mayor que la normal sola o en asociación con un nivel de PSA anormal es indicativo de adenocarcinoma de próstata.

Según otro aspecto de la presente invención, diferentes formas de determinación del nivel de metilación de biomarcadores en asociación con diferentes tipos de muestras biológicas de un sujeto proporcionan diferentes niveles de sensibilidad con respecto a detección de neoplasia. Por ejemplo, según la presente invención para determinación en muestras de fluidos corporales del nivel de metilación de biomarcadores usando PCR convencional proporciona generalmente mejor sensibilidad que la sensibilidad obtenida usando PCR en tiempo real.

En una realización, el nivel de metilación de una región de promotor de GSTP1 en una muestra de fluido corporal, por ejemplo, no limitada a suero, plasma, orina o eyaculado, determinada por PCR convencional o no en tiempo real, proporciona mejor sensibilidad para la detección de adenocarcinoma de próstata que la sensibilidad obtenida usando PCR en tiempo real. Por tanto, según la presente invención, puede determinarse el nivel de metilación de una región de promotor de GSTP1 en una muestra de fluido corporal de un sujeto usando PCR convencional no en tiempo real, o

la PCR en tiempo real y un nivel de metilación mayor que el nivel de metilación en un sujeto normal son indicativos de adenocarcinoma de próstata, por ejemplo, a la luz del hecho de que el sujeto tiene un nivel de metilación normal de la región de promotor de GSTP1 determinado por PCR en tiempo real.

Según otro aspecto de la presente invención, proporciona juegos útiles para detectar neoplasia en una célula o tejido, por ejemplo, usando los métodos proporcionados por la presente invención para detectar neoplasia. En una realización, la presente invención proporciona un juego, por ejemplo, un portador compartimentado que incluye un primer recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de un biomarcador, un segundo recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de una región de un gen de referencia y un tercer recipiente que contiene una primera y una segunda sondas de oligonucleótido, específicas para la multiplicación del biomarcador y la la región del gen de referencia, respectivamente.

En otra realización, el juego proporcionado por la presente invención incluye además un cuarto recipiente que contiene un agente de modificación que modifica citosina no metilada para producir un ácido nucleico convertido, por ejemplo, uracilo. Puede incluirse cualquier agente de modificación adecuado en el juego proporcionado por la presente invención. Por ejemplo, el agente de modificación puede ser bisulfito sódico.

En otra realización aún, el juego proporcionado por la presente invención incluye además una sonda para determinación de PSA. En otra realización todavía, el juego proporcionado por la presente invención incluye además una hoja suelta de instrucciones que describe intervalos de relación de metilación normales y/o anormales para la detección de neoplasia, describiendo los tipos de muestras adecuados o inadecuados para la aplicación del juego y/o las especificidad o sensibilidad proporcionadas por los ensayos que utilizan el juego de la presente invención.

Según una realización de la presente invención, el juego proporcionado por la presente invención incluye un primer recipiente que contiene al menos un par de cebadores para multiplicación de una región de promotor de GSTP1, un segundo recipiente que contiene al menos un par de cebadores para multiplicación de una región de un gen de referencia, y un tercer recipiente que contiene una primera y una segunda sondas de oligonucleótido específicas para la multiplicación de la región de promotor de GSTP1 y la región del gen de referencia, respectivamente, con la condición de que uno o más cebadores para multiplicación de la región de promotor de GSTP1 o una o más primeras sondas de oligonucleótido específicas para el amplicón de la región de promotor de GSTP1 sean capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado, directa o indirectamente, por ejemplo, después de modificación con bisulfito. Opcionalmente, el juego proporcionado por esta realización de la presente invención puede incluir adicionalmente una hoja suelta de instrucciones, por ejemplo, que describa que una relación de metilación por 1.000 de una región de promotor de GSTP1 de la presente invención que sea mayor que 3, 5 o 10, es indicativa de carcinoma de próstata, o que el juego puede usarse con una muestra de tejido de próstata, por ejemplo, más adecuado para usarse con una muestra de tejido de próstata.

La presente invención proporciona también un juego útil para detectar adenocarcinoma de próstata, especialmente en muestras de fluidos corporales. El juego incluye un primer recipiente que contiene al menos un par de cebadores capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado para multiplicación de una región de promotor de GSTP1 y una hoja suelta de instrucciones que describe, entre otras cosas, que el juego es útil para detectar adenocarcinoma de próstata en una muestra de fluido corporal de un sujeto y que un nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1 determinado por PCR convencional o no en tiempo real usando los cebadores proporcionados que sea más alto que el nivel de metilación de la región de promotor de GSTP1 en un sujeto normal es indicativo de adenocarcinoma de próstata en el sujeto con una sensibilidad no menor del 40%.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proponen para ilustrar pero no limitar la invención de ninguna manera, configuración o forma, explícita o implícitamente. Aunque sean típicos de los que podrían usarse, pueden usarse alternativamente otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidos por los expertos en la técnica.

### Ejemplo 1

*La metilación de GSTP1 cuantitativa mejora la detección de biopsias por sextantes de adenocarcinoma de próstata*

En este estudio, se hizo una comparación directa de GSTP1 QMSP con examen histológico estándar de biopsias con aguja para ver si podría mejorar la sensibilidad de diagnóstico de cáncer. El análisis de biopsias por sextantes permitió una comparación directa de dos métodos en tejido con la subsiguiente diagnóstico patológica final. La combinación de histología con GSTP1 podría mejorar significativamente la diagnóstico de cáncer de próstata sin afectar la especificidad.

### Materiales y métodos

*Pacientes y recogida de muestras*

Se incluyeron en este estudio 56 pacientes que experimentaban prostatectomía por adenocarcinoma de próstata (intervalo de PSA 0,5-25,8, mediana 5,0) y 16 pacientes que experimentaban cistoprostatectomía por carcinoma de

vejiga en The Johns Hopkins Hospital entre Noviembre de 2001 y Mayo de 2002. Inmediatamente después de la resección, se tomaron biopsias por sextantes (del pico izquierdo y derecho, medio y base) de los 72 especímenes de próstata reseccionados usando una aguja delgada (galga 18) y se congelaron rápidamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- 5 Todas las biopsias con aguja se cortaron en secciones de  $10\ \mu\text{m}$  y se pusieron en una mezcla de 1% de dodecilsulfato sódico y proteinasa K (0,5 mg/ml) a  $48^{\circ}\text{C}$  durante la noche para digerir. Se extrajo después ADN usando precipitación con fenol/cloroformo y etanol como se ha descrito previamente (10). Además, se tomaron cada 10 rebanadas secciones congeladas de  $5\ \mu\text{m}$  y se colorearon con hematoxilina-eosina para examen oculto por luz. Todas las próstatas reseccionadas se seccionaron después en serie y se sometieron totalmente a examen histológico, que se consideró el estándar de oro para determinar la presencia de carcinoma prostático.

#### *Tratamiento con bisulfito*

- 15 Se realizó conversión con bisulfito sódico de  $2\ \mu\text{g}$  de ADN de cada muestra de biopsia como se ha descrito previamente. En breve, se desnaturalizaron muestras de ADN con hidróxido sódico, se incubaron durante 2 horas a  $70^{\circ}\text{C}$  con bisulfito sódico e hidroquinona, se purificaron usando el juego de purificación Wizard (Promega, Madison, WI), se desnaturalizaron adicionalmente y se desaminaron y se precipitaron finalmente en etanol. Se resuspendieron las muestras en  $60\ \mu\text{l}$  de Tris 10 mM (pH 8).

#### *MSP cuantitativa en tiempo real*

- 25 Se analizó la metilación de GSTP1 en las muestras de ADN modificado usando QMSP fluorogénica en tiempo real. Se analizó además en muestras la multiplicación de 2 genes de referencia internos, ACTB y MYOD. Se han descrito previamente cebadores y sondas para GSTP (8), MYOD (8) y ACTB (9). Los cebadores se obtuvieron de Invitrogen (Gaithersburg, MD) y las sondas de Applied Biosystems (Foster City, CA). Las reacciones se realizaron en placas de 384 pocillos usando un detector de secuencias Applied Biosystems 7900 (Foster City, CA). La mezcla de reacción final ( $20\ \mu\text{l}$ ) consistía en 600 nM cada cebador, sonda 200 nM,  $200\ \mu\text{M}$  cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP, sulfato amónico 16,6 mM, Trizina 67 mM, cloruro magnésico 6,7 mM, mercaptoetanol 10 mM, 0,1% de sulfóxido de dimetilo y  $3\ \mu\text{l}$  de ADN modificado (100 ng). Las condiciones de multiplicación fueron iniciación a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos, seguida por 50 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 segundos y  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 min.

- 35 Todas las muestras se hicieron pasar por cuadruplicado y se consideraron positivas en GSTP1 si  $\frac{3}{4}$  de las réplicas mostraban multiplicación. Cada placa de PCR incluía también diluciones en serie de 2 testigos positivos para construcción de curvas patrones, un testigo negativo y múltiples en blanco de agua. Se usó como testigo negativo ADN de leucocitos de un individuo sano. El mismo ADN de leucocitos se metiló *in vitro* con Sss I metiltransferasa en exceso (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar ADN totalmente metilado y se usó como un testigo positivo. Además, se hizo pasar también como un segundo testigo positivo ADN de un linaje celular de cáncer de próstata humano, LNCaP (ATCC; Manassas, VA), del que se sabe que se metila en el lugar de GSTP1.

- 40 Con este ensayo, era posible la detección de ADN de GSTP1 metilado hasta 4 equivalentes de genoma, determinada por diluciones en serie de los testigos positivos usando un factor de conversión de 6,6 pg de ADN por célula diploide. El nivel relativo de GSTP1 metilado en una muestra particular se calculó usando la relación del valor de GSTP1 promediado al valor del gen de referencia interno correspondiente. Esta relación se multiplicó después por 1.000 para una tabulación más fácil.

- 45 En este estudio, se usaron 2 genes de referencia diferentes, MYOD y ACTB. Esto fue así porque los inventores han pasado de usar MYOD como gen de referencia a un conjunto de cebador/sonda de ACTB más fuerte y deseaban comparar directamente los valores de GSTP1/MYOD (G/M) indicados previamente con valores de GSTP1/ACTB (G/A). Todas las estadísticas y cifras se basan en los valores G/M, pero los valores G/A eran virtualmente idénticos y son de aplicación los mismos valores umbral usando este gen de referencia alternativo.

#### *Análisis estadístico*

- 55 Se indican para todas las proporciones intervalos de confianza del 95% binómicos exactos. Todos los análisis se hicieron usando el caso como unidad de análisis. El significado estadístico y la precisión de aumentos de la sensibilidad se calcularon usando un ensayo de McNemar, teniendo en cuenta el apareamiento de lecturas dentro de casos. Las diversas combinaciones sensibilidad-especificidad producidas usando diferentes umbrales para GSTP1 se presentan en forma de curvas características de operador receptor (ROC). Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico Stata 7.0 (Stata Corp., College Station, TX).

#### *Resultados*

- 65 Se analizó de manera oculta en setenta y dos conjuntos de biopsias, usando histología y metilación de GSTP1 (56 conocidos positivos y 16 negativos supuestos) la presencia de adenocarcinoma de próstata en el espécimen de resección. Un examen de patología quirúrgica final de los especímenes de cistoprostatectomía detectó adenocarcinoma de próstata no diagnosticado clínicamente en 5/16 (31%) casos, que aumentó el número de positivos verdaderos a 61, dejando 11 casos negativos verdaderos. Esto se tomó como el estándar de oro con el que se compararon los análisis de biopsia ocultos por histología y metilación de GSTP1. Las fases y grados patológicos de los 61 casos

fueron: 19 T2a (Gleason 4-7), 29 T2b (Gleason 6-7), 11 T3a (Gleason 6-7) y 2 T3b (un Gleason 7 y un carcinoma de conducto).

Sólo 1 biopsia de las 6 de cada caso necesitó denominarse positiva usando cualquier ensayo para el caso de ser denominado positivo por ese ensayo. En base a esto, la sensibilidad y especificidad de la histología y la metilación de GSTP1 como ensayos de diagnóstico se calcularon separadamente y en combinación (Tabla 1).

TABLA 1

*Sensibilidad y especificidad para histología y GSTP1 QMSP usando diferentes umbrales*

Ensayo	Sensibilidad Histología y combinada con GSTP1	Sensibilidad GSTP1 solo	Aumento de sensibilidad para ensayos combinados (95% CI)
Histología	64% (39/61)		
GSTP1>10	75% (46/61)	70% (43/61)	11% (5-22)
GSTP1>5	79% (48/61)	75% (46/61)	15% (7-26)
GSTP1>2	85% (52/61)	82% (50/61)	21% (12-34)
GSTP1>1	89% (54/61)	89% (54/61)	25% (15-37)

La valoración histológica oculta de las biopsias detectó adenocarcinoma de próstata en 39/61 casos, una sensibilidad del 64% (CI 51-76%). La extensión del carcinoma detectada en biopsias para cada caso varió de 0 a 20 mm, mediana 1 mm. Los 11 casos negativos verdaderos se encontró que eran negativos, una especificidad del 100%. Como los criterios histológicos aplicados a los especímenes de biopsia fueron los mismos que los usados para el examen de próstata total, sería de esperar una especificidad del 100% para la biopsia salvo que la biopsia separara todas las células anormales, de modo que la precisión para esta estimación del 100% es más alta de lo que indicaría un intervalo de confianza estadístico, lo que supone independencia de un ensayo y ensayo estándar de oro.

Para GSTP1 solo, usando el valor umbral establecido previamente de 10 en estudios experimentales, se detectó cáncer en 43/61 casos (intervalo 0-791,4, mediana 41,3), una sensibilidad del 70% (se muestra un ejemplo en la Figura 1). Se encontró que eran negativos los 11 casos negativos verdaderos (intervalo 0-2,5, mediana 0), una especificidad del 100% (CI: 72%-100%). Usando GSTP1 en combinación con histología (que define carácter positivo en cualquiera como un ensayo positivo), se diagnosticaron correctamente 46/61 casos como positivos, aumentando la sensibilidad al 75%, una mejora del 11% (CI 5-22%) sobre histología sola. Se mantuvo aún una especificidad del 100% usando un umbral de GSTP1 más bajo de 5. Para este umbral, GSTP1 solo tenía una sensibilidad del 75% (46/61) {p = 0,06 por ser más sensible que la histología}. En combinación con histología, se diagnosticaron correctamente 48/61 casos, una sensibilidad del 79% y una mejora del 15% (CI 7-26%) sobre la histología sola. Se usaron curvas ROC para presentar y contrastar el funcionamiento de biopsia sola, GSTP1 solo y GSTP1 en combinación con histología (Figura 2)).

En el umbral óptimo, el análisis de GSTP1 QMSP diagnosticó correctamente 9 casos de cáncer de próstata errados por la histología y la histología detectó 2 casos errados por GSTP1 QMSP, lo que muestra la importancia de usar ambos criterios. Se obtuvieron a continuación muestras de ADN de tumor primario puro de los 2 casos errados por QMSP por microdissección de secciones de bloques de parafina y se analizó en ellas metilación de GSTP1 (datos no representados). Un tumor fue negativo por GSTP1 (carcinoma de 0,1 mm detectado en una biopsia por histología); el otro tumor era débilmente positivo por GSTP1 y la histología detectó carcinoma de 1 mm y 0,1 mm en 2/6 biopsias, aunque los valores de GSTP1 no alcanzaron el umbral positivo. Para los 9 casos detectados por GSTP1 QMSP pero no por histología, los valores de GSTP1 variaron de 6,2 a 64,2 (mediana 13,0) y fueron positivos en 2 biopsias para 3/9 y 1 biopsia para 6/9 casos. Un caso fue un carcinoma de conducto extenso atípico, 3 fueron T2a pequeño y 5 fueron T2a-b de moderado a extenso en examen de patología quirúrgica formal.

Los 5 casos de cistoprostatectomía en los que se encontró contener incidentalmente cáncer de próstata incluían 2/5 que contenían una extensión moderada de cáncer (Gleason 7) presente en ambos lóbulos, ambos de los cuales se detectaron por GSTP1 QMSP y uno de los cuales se detectó por histología en análisis de biopsia; los restantes 3/5 casos contenían cada uno sólo un pequeño foco de carcinoma (Gleason grado 6 o inferior) y no se detectaron por ningún ensayo. La progresión natural de estas pequeñas lesiones incidentales y la terapia apropiada (de haberla) permanecen para ser totalmente investigados.

Con el fin de investigar si GSTP1 podría mejorar la sensibilidad de diagnosis rutinaria de adenocarcinoma de próstata en biopsia con aguja, se analizaron biopsias por sextantes tomadas de pacientes que experimentaron prostatectomía por adenocarcinoma de próstata diagnosticado previamente y de pacientes que experimentaron cistoprostatectomía por carcinoma de vejiga, sin diagnosis conocida de cáncer de próstata. Se analizó de manera oculta en estas biopsias por sextantes adenocarcinoma de próstata en el espécimen de resección por histología y por GSTP1 QMSP:



En un umbral óptimo de 5, la adición de análisis GSTP1 QMSP mejoró la sensibilidad de diagnóstico en el 15% (del 64 al 79%) mientras se mantenía 100% de especificidad. La mejora destacada en la diagnosis de un cáncer por adición de un ensayo molecular simple ofrece un fuerte apoyo al uso de análisis de metilación de GSTP1 anticipadamente como adjunto a la histología en biopsias con aguja trans-rectales de diagnóstico.

La histopatología se considera el estándar de oro por el que se establece la diagnosis de cáncer de próstata. Sin embargo, en biopsias, el error de toma de muestras y diversos artefactos técnicos se reconocen como limitaciones del método. Este estudio muestra que puede errarse en un número significativo de cánceres pequeños (22/61, 36%) por análisis histológico de secciones congeladas de biopsias por sextantes. Esto incluía 18 de 56 casos que ya se habían pre-seleccionado con una diagnosis histológica previa de cáncer de próstata en base a una biopsia con aguja dirigida o aleatoria antes de prostatectomía. En una población de hombres que experimentan biopsias por sextantes de diagnóstico, este número es probablemente similar o incluso superior.

El examen histológico en secciones congeladas es técnicamente más difícil que de secciones de parafina, y esto puede explicar por qué se han errado algunos tumores en histología. Una comparación de secciones embebidas en parafina fijadas con formalina con análisis GSTP1 en los mismos especímenes de biopsia con aguja puede haber producido resultados más favorables para histología. También secciones congeladas hacen particularmente difícil la diagnosis de PIN de grado alto. Es posible que el análisis GSTP1 detectara PIN de grado alto en algunos de los 9 casos errados por histología (un marcador histológico conocido de cáncer).

Sin embargo, todo el ADN de tumor puro ensayado de estos casos era fuertemente positivo en GSTP1, y no se encontraron positivos por análisis GSTP1 4/4 otros casos, de los que se indicó subsiguientemente que contenían PIN de grado alto en examen de patología quirúrgica formal. Es por tanto más probable que GSTP1 QMSP mejore la sensibilidad superando el error de toma de muestras. Esto puede deberse a sensibilidad pura (capaz de detectar hasta 4 células de cáncer) o al efecto de campo reconocido en muchos cánceres, en los que células que rodean el neoplasma albergan algunas pero no todas las alteraciones genéticas en el tumor primario, y no muestran siempre así caracterizaciones morfológicas neoplásticas.

Para la investigación y diagnosis de adenocarcinoma de próstata, se toman múltiples biopsias con aguja trans-rectales, aunque sólo se necesita encontrar una positiva para establecer la diagnosis. En este estudio, como análisis secundario, se halló que aunque se encontrara el mismo número de biopsias positivas para ambos ensayos en 37/72 casos, más biopsias de cada paciente con cáncer eran positivas por GSTP1 QMSP que por histología en 31/72 casos y 4/72 casos tenían más biopsias positivas en histología que por GSTP1 QMSP. El número más común (modal) de biopsias positivas por caso fue 3/6 para GSTP1 QMSP y 1/6 para histología. Esto apoya el beneficio de análisis molecular para cada biopsia tomada y podría ser especialmente útil para la diagnosis de cánceres muy pequeños en los que la evidencia sugiere que un número incrementado de biopsias puede aumentar la precisión del diagnóstico.

En cada caso específico, los niveles de GSTP1 eran más altos en biopsias de ese caso que tenía también la mayor extensión de tumor observada en histología (como en la Figura 1). Sin embargo, los valores de GSTP1 absolutos no se correlacionaban directamente con una magnitud específica de tumor vista en biopsia por todos los casos debido al amplio intervalo de niveles de metilación de GSTP1 entre diferentes tumores primarios. Los niveles de GSTP1 QMSP no se correlacionaban directamente con los valores de PSA como se ha mostrado previamente.

En diversas relaciones de umbral de 3-10 para GSTP1 QMSP, los 11 casos negativos verdaderos eran negativos aunque los intervalos de confianza eran aún amplios debido a los escasos números analizados. Una alta especificidad es muy importante para cualquier ensayo de diagnóstico, particularmente cuando las opciones de tratamiento para la enfermedad diagnosticada incluyen cirugía grave. Incluso usando una relación de umbral muy conservadora de 10 para GSTP1 QMSP, la sensibilidad de la diagnosis mejoraba sustancialmente (11%), proporcionando una forma segura de mejorar la sensibilidad del diagnóstico para cáncer de próstata en biopsia con aguja.

Al menos, los pacientes a los que se encontró que tenían histología negativa pero elevado GSTP1 en biopsia con aguja podrían hacerse prioritarios como de alto riesgo para una biopsia de repetición temprana a fin de mejorar la posibilidad de diagnosis de cáncer lo más pronto posible. Podrían emplearse también técnicas de formación de imagen adicionales para identificar áreas sospechosas para biopsias más directas. (REF.). La adición de GSTP1 QMSP a histología rutinaria (parafina) es probable que mejore la sensibilidad de biopsias con aguja de diagnóstico por cantidades paralelas a las mostradas en este estudio, pero que requieren estudio adicional.

El GSTP1 QMSP es un ensayo de diagnóstico fuerte, reproducible y altamente específico para adenocarcinoma de próstata que podría mejorar drásticamente la sensibilidad de la diagnosis de cáncer de próstata cuando se usa en combinación con histología rutinaria. Los estudios experimentales múltiples y esta prueba anticipada actual continúan apoyando el uso de este método molecular para mejorar la precisión de biopsias de diagnóstico rutinarias para cáncer de próstata.

## Ejemplo 2

*Hipermetilación de GSTP1 cuantitativa*5 *En fluidos corporales de pacientes con cáncer de próstata*

Se investigó el potencial de detección de hipermetilación de GSTP1 en ADN de orina y plasma evacuados como marcador específico de cáncer de próstata en dos grupos de pacientes, uno de los cuales albergaba cáncer de próstata localizado clínicamente, y un grupo testigo consistente en pacientes con hiperplasia prostática benigna (BPH). Se usó  
 10 RTQ-MSP para cuantificar el nivel de metilación de GSTP1. Los resultados se compararon con C-MSP. La razón para el primer método es que RTQ-MSP permite análisis rápido de un gran número de muestras en un ensayo altamente reproducible usando pequeñas cantidades de ADN plantilla. Además, la cuantificación puede permitir discriminación entre enfermedad benigna y neoplásica, y podría ser útil para comprobar esta enfermedad.

15 *Materiales y métodos**Pacientes y recogida de muestras*

Se seleccionaron para este estudio sesenta y nueve pacientes con adenocarcinoma de próstata localizado clínicamente, diagnosticados consecutivamente y tratados principalmente con prostatectomía radical en el Instituto de Oncología Portugués-Oporto. Todos los casos se identificaron por antígeno específico para próstata del suero (PSA) elevado en análisis rutinarios y se conformaron mediante biopsia de próstata por sextantes (fase T1C). Adicionalmente, se incluyeron con fines de testigo 31 pacientes con BPH, sometidos a resección transuretral de la próstata (TURP).

25 Todas las platinas histológicas se examinaron y se determinó la fase de cada tumor (sistema de determinación de fase TNM) y se graduó (sistema de graduación Gleason). Se recogió de cada espécimen quirúrgico tejido congelado rápidamente guardado a -80°C o tejido prostático embebido en parafina. Se cortaron secciones para la identificación de adenocarcinoma (especímenes de prostatectomía radical) y BPH (tejido TURP). Para extracción de ADN, estas áreas se micro-disecccionaron a partir de una media de cincuenta secciones de 12 µm de espesor para enriquecimiento  
 30 (> 70%) de adenocarcinoma y tejido hiperplástico. El tejido embebido en parafina se micro-disecccionó de manera similar, pero se puso en xileno durante 3 horas a 48°C para separar la parafina. Se extrajo también ADN de plasma y orina evacuada recogidos de cada paciente, como se ha descrito previamente. En breve, se digirió ADN durante la noche a 48°C en 1% de SDS/proteínasa K (0,5 mg/ml), se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó en etanol.

35 *Tratamiento con bisulfito*

Para realizar la conversión con bisulfito sódico de ADN genómico, se usó una modificación de un método descrito previamente. Se dan detalles de este método en otra parte.

40 *MSP cuantitativa en tiempo real*

Se determinaron los niveles de metilación de promotor de gen GSTP1 y el número de copias de gen MYOD1 (usado como testigo para la calidad de multiplicación del ADN plantilla) por RTQ-MSP basada en fluorescencia, como se ha descrito previamente<sup>20</sup>. Brevemente, se diseñaron cebadores y sondas para multiplicar específicamente cualquier  
 45 ADN de promotor convertido con bisulfito para el gen de interés, GSTP1. Para muestras de tejido, el nivel relativo de ADN de GSTP1 metilado se expresó como la relación entre los valores de GSTP1 frente a MYOD1 obtenidos por el análisis RTQ-MSP, en cada muestra particular, y multiplicado después por 1.000.

Todas las muestras de plasma y orina se sometieron también a análisis RTQ-MSP, para metilación de GSTP1 y gen MYOD1. El nivel de metilación de GSTP1 en fluidos corporales se expresó como copias de GSTP1 metilado (equivalentes de genoma - GE) por 50 ml para muestras de orina y por 1 ml para muestras de plasma<sup>21</sup>. La especificidad de la reacción para el ADN metilado se confirmó separadamente usando un testigo positivo (linaje celular LNCaP), y un testigo negativo (linaje celular Du145). Se incluyeron en cada grupo blancos de agua múltiples. Las secuencias de cebador y sonda usados se describieron en un artículo previo de los inventores<sup>15</sup>.

55 El número más bajo de equivalentes de genoma detectados por RTQ-MSP fue 3,16 GE, determinado por diluciones en serie del testigo positivo (ADN de LNCaP). Esta cifra se calculó en base a un factor de conversión de 6,6 pg de ADN por célula<sup>22</sup>.

60 *MSP convencional*

Se han descrito previamente secuencias de cebador para GSTP1 metilado o no metilado modificado. Se realizó C-MSP usando los testigos negativo y positivo apropiados como se ha descrito antes. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR usando una temperatura de reasociación de 62°C. Los productos de PCR se cargaron directamente en un gel de  
 65 poliacrilamida al 6% no desnaturalizante, se colorearon con bromuro de etidio y se visualizaron bajo iluminación UV.

*Análisis estadístico*

Se realizaron ensayos de Mann-Whitney para comparar la distribución de edad y niveles de PSA en el suero entre los pacientes con BPH y aquellos con adenocarcinoma. Se determinaron correlaciones entre las relaciones de metilación del tumor y nivel de PSA, puntuación Gleason y fase patológica calculando el coeficiente de correlación de Spearman. Las asociaciones entre estado de metilación de GSTP1 en orina y plasma, y la fase patológica y la puntuación Gleason, se examinaron usando el ensayo chi-cuadrado y el ensayo exacto de Fisher. Se realizaron análisis estadísticos con Statistica for Windows, versión 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK) y Epi Info, versión 6 (CDC, Atlanta, GA). Se alcanzó significado estadístico en  $P < 0,05$ .

**Resultados**

Se estudiaron anticipadamente 69 pacientes con adenocarcinoma de próstata localizado clínicamente con una edad mediana de 63 años (intervalo: 52-74). Como grupo testigo, se incluyeron 31 pacientes con BPH (edad mediana = 64 años, intervalo: 53-82). No se encontró una diferencia significativa estadísticamente entre las distribuciones de edad de estos dos grupos ( $p = 0,33$ ). El valor mediano del PSA del suero preoperativo fue 10,3 ng/ml (intervalo: 1,69-48,3) y 3,43 ng/ml (intervalo: 0,67-31) para pacientes con cáncer y BPH, respectivamente ( $p < 1E-5$ ).

Se determinó el estado de metilación del promotor del gen GSTP1 en las muestras de tejido, para pacientes con cáncer de próstata y para testigos, por C-MSP y RTQ-MSP (Figura 3a). Se encontró que sesenta y tres de 69 (91,3%) adenocarcinomas eran positivos en metilación de GSTP1. No se encontró correlación entre la relación de metilación en las muestras de tumor y los niveles de PSA ( $r = 0,04$ ,  $p = 0,74$ ), puntuación Gleason ( $r = 0,13$ ,  $p = 0,36$ ) o fase patológica ( $r = 0,23$ ,  $p = 0,57$ ). En el grupo de BPH, 9 de 31 (29%) muestras de tejido mostraban también hipermetilación de GSTP1. No se encontró discordancia entre los dos métodos MSP.

Después de examinar los cambios de metilación en el tejido, se analizaron las muestras de ADN de orina y plasma apareadas, usando ambos métodos MSP de manera oculta. En todos los casos, se pudo multiplicar ADN de todas las muestras, es decir, tejido, orina y plasma. Se encontró hipermetilación de GSTP1 en 13 de 69 (18,8%) sedimentos de orina y 9 de 69 (13,0%) muestras de ADN de plasma de pacientes con cáncer de próstata, usando RTQ-MSP (Figura 3b). La mediana y los alcances intercuartiles (IQR) de GE de GSTP1 metilado fueron 3,039 GE/ml (IQR: 0,857-3,529) y 140,533 GE/ml (IQR: 54,6-552,267) para muestras de orina y plasma, respectivamente. C-MSP fue capaz de detectar metilación de GSTP1 en 21/69 (30,4%) orinas y en 25/69 (36,2%) plasmas de las mismas muestras.

Además, todos los casos positivos en hipermetilación de GSTP1 por RTQ-MSP (plasma y/u orina) también fueron positivos por C-MSP. De modo importante, no hubo ningún caso en el que el sedimento de orina o el ADN del plasma albergaran metilación cuando el tumor correspondiente era negativo. No se encontró asociación entre estado de metilación de GSTP1 del plasma y fase patológica o puntuación Gleason ( $p = 0,84$  y  $p = 0,26$ , respectivamente). De manera similar, no se encontró correlación entre estados de metilación de GSTP1 en muestras de orina y la fase patológica o la puntuación Gleason ( $p = 0,09$  y  $p = 0,83$ , respectivamente).

En pacientes con BPH, se detectó hipermetilación en 1/31 (3,2%) muestras de orina, y ambos métodos MSP eran concordantes (5,549 GE/ml). El tejido de BPH comparado no albergaba hipermetilación de GSTP1 (representando un positivo falso potencial o error de etiquetado de laboratorio: véase discusión posterior). Todas las muestras de plasma de pacientes con BPH eran negativas (usando ambos métodos) en hipermetilación de GSTP1.

Se encontró metilación de promotor de GSTP1 en más del 90% de las muestra de tejidos de tumores y en menor grado en suero y orina apareados como se ha indicado previamente. Estos hallazgos confirman la alta frecuencia de esta alteración genética, y continúan soportando su aplicación en métodos de detección de cáncer de próstata basados en ADN. Los niveles medianos de hipermetilación de GSTP1 en suero eran significativamente más altos que los niveles de ADN en orina, por análisis cuantitativo (Fig. 3b).

Este estudio muestra claramente que están presentes mayores cantidades de ADN en plasma que en orina, especialmente cuando se considera el volumen total mucho mayor que se toma como muestra. Este hallazgo podría relacionarse con la extracción de ADN de sedimentos de orina, es decir, principalmente de células tumorales vertidas en orina. Así, se sugiere que se libera preferentemente ADN de tumor libre en la circulación más que en el sistema de conductos de la próstata. Estos resultados también son consecuentes con la propensión del cáncer de próstata a diseminarse tempranamente por todo el cuerpo.

Entre los pacientes con cáncer de próstata que tenían hipermetilación de GSTP1 en el tumor primario, 37 (53,6%) presentaban también esta alteración en ADN de orina o plasma usando C-MSP. El número de casos positivos en plasma era ligeramente más numeroso que los encontrados en orina (36,2% frente a 30,4%). Se indicó la misma tendencia en un estudio previo, en el que el 72% de los pacientes eran positivos en plasma o suero, y sólo el 36% en orina.

Sin embargo, hay algunas diferencias principales entre Goessl *et al.* y el estudio de los presentes inventores, que impiden comparaciones directas entre ellos. Goessl *et al.* incluían un gran número (45%) de pacientes de fase IV (no tratables por resección quirúrgica curable) en los que la probabilidad de células de tumor circulantes es bastante alta, produciendo quizá una proporción de detección más alta. Realmente, todos los pacientes de fase avanzada eran

positivos en metilación de GSTP1 en su estudio. La proporción de detección en orina era también superior a la de los presentes inventores, pero en sus casos se realizó masaje prostático previo a la recogida de muestras, aumentando el vertido de células de próstata en orina.

La proporción de detección en orina encontrada en este estudio refuerza los resultados del trabajo preliminar previo de los inventores. Así, pueden considerarse varias estrategias para mejorar la proporción de detección de hipermetilación de GSTP1 en fluidos corporales. Un método sería aumentar el número y/o volumen de muestras de orina y plasma, permitiendo una mayor toma de muestras de ADN de tumor.

Además, el masaje prostático podría aumentar el vertido de células en orina, pero este procedimiento podría limitar la aceptabilidad del ensayo. Aunque se detectó en eyaculados una mayor proporción de hipermetilación de GSTP1 (aproximadamente el 50%), la naturaleza del procedimiento de toma de muestras, especialmente en hombres mayores, puede imposibilitar su uso extenso. Eventualmente, refinamientos técnicos adicionales del método de PCR podrían contribuir a un aumento de sensibilidad, aunque estos procedimientos se han optimizado sustancialmente.

La especificidad de la hipermetilación de GSTP1 permanece alta porque se detectó raramente en el ADN de orina y plasma de pacientes en los que no se alteraba este marcador en el tejido de tumor. Además, la metilación de GSTP1 no se ha detectado generalmente en otras malignidades genitourinarias, incluyendo carcinomas de vejiga.

Se usaron como testigos treinta y un pacientes con BPH, sin evidencia de albergar adenocarcinoma de próstata. Aunque se indicó que la hipermetilación de GSTP1 era rara en tejido normal, 9 de estos pacientes (29%) presentaban esta alteración en tejido prostático. Los hallazgos de estos inventores podrían explicarse por hipermetilación de GSTP1 relacionada con la edad, porque una evidencia reciente sugiere que la metilación de promotor de ciertos genes en tejidos de apariencia normal está asociada con el envejecimiento. Sin embargo, no se vieron modelos relacionados con la edad en el grupo de muestras (BPH y cáncer). Además, no se puede descuidar la posibilidad de que podrían haberse reseccionado pequeños focos de adenocarcinoma con hipermetilación de GSTP1 durante el procedimiento TURP, juntos con glándulas hiperplásticas.

En un paciente con BPH, se detectó hipermetilación de GSTP1 en orina pero no en tejido equilibrado, por ambos métodos MSP. Este resultado podría interpretarse como un positivo falso, disminuyendo la especificidad de este método. En pacientes de estos inventores con cáncer de próstata no se detectó hipermetilación en ADN de orina o plasma de tumores no metilados apareados. Así, es tentador sugerir que este paciente con BPH podría albergar adenocarcinoma de próstata oculto, localizado en la región periférica del órgano, de la que no se tomó muestras por TURP. Un seguimiento cuidadoso puede clarificar esta observación interesante.

En estudios previos, se ha usado con éxito hipermetilación de promotor de varios genes para detectar ADN de tumor en fluidos corporales de varios tipos de cáncer, a saber, fluido de lavado bronquial, esputo y suero de pacientes con cáncer de pulmón, y suero de pacientes con cáncer de cabeza y cuello. En estos estudios, se encontró que el método C-MSP tenía una alta sensibilidad (1:1.000). Sin embargo, este método no permite cuantificación de la extensión del estado de metilación del gen.

En este estudio, un gran número de muestras de orina y plasma fueron positivas en hipermetilación de GSTP1 usando C-MSP, comparando con RTQ-MSP (53,6% frente a 31,9%). Este hallazgo sugiere que el primer método es significativamente más sensible que el último, quizá debido a la mayor especificidad de la sonda interna diseñada para análisis cuantitativo y el alto nivel de fondo de la fluorescencia intrínseca al análisis RTQ-MSP.

No obstante, el límite inferior de la detección RTQ-MSP determinado en el presente estudio (3,16 GE) era más sensible que el nivel indicado por Lo *et al.* (10 GE) en mieloma. Sin embargo, la cantidad de ADN de células de cáncer de próstata presentes en orina y plasma puede ser muy baja, perjudicando su detección por RTQ-MSP. Realmente, Lo y colaboradores eran capaces de detectar hipermetilación en cantidades razonables de células obtenidas de aspirados de médula ósea de sus pacientes.

Estos resultados sugieren que RTQ-MSP podría ser particularmente útil en la identificación de enfermedad neoplásica en material clínico rico en células, tal como biopsias con aguja. A este respecto, RTQ-MSP tiene la ventaja de permitir la cuantificación del número de copias metiladas de GSTP1, lo que puede posibilitar la discriminación entre tejido normal metilado y carcinoma.

La hipermetilación de GSTP1 puede detectarse en orina y plasma en una gran proporción de pacientes con cáncer de próstata de fase temprana que albergan metilación de ADN en el tejido como se muestra aquí. Puesto que tantos pacientes mueren de cáncer de próstata cada año, estos resultados podrían tener implicaciones significativas para el desarrollo de métodos moleculares como adjuntos a la detección de cáncer. Además, tales ensayos pueden ser útiles en la vigilancia de pacientes y detección de enfermedad residual mínima, una vez establecido el estado de metilación de GSTP1 del tumor primario.

## Referencias

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, *et al*: Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin 51:15-36, 2001.

**Han M, Partin AW, Pound CR, et al:** Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 28:555-65, 2001.

**Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al:** Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11733-7, 1994.

**Lee WH, Isaacs WB, Bova GS, et al:** CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:443-50, 1997.

**Herman, JG, Graff JR, Myohanen S, et al:** Methylation-specific PCR.: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9821-6, 1996.

**Esteller M, Corn PG, Urena JM, et al:** Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 58:4515-8, 1998.

**Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al:** Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 7:2727-30, 2001.

**Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al:** Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93:1747-52, 2001.

**Harden SV, Guo Z, Epstein JI, et al:** Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes between benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol In press*, 2002.

**Ahrendt SA, Chow IT, Xu LH, et al:** Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 91:332-9, 1999.

**Saiki R.K, Gelfand DH, Stoffel S, et al:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91, 1988.

**Landis SH, Murray T, y Bolden S, et al:** Cancer Statistics. Ca. *Cancer Clin*, 49:8-31, 1999.

**Andriole GL, y Catalona WJ:** The case for aggressive diagnosis and therapy of localized prostate cancer, en: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, y Lange PH (Eds) *Principles and practice of genitourinary oncology*. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1996, págs. 457-464.

**Isaacs WB, y Isaacs JT:** Molecular genetics of prostate cancer progression, en: Raghavan D, Scher HI, Leibel SA, y Lange PH(Eds.) *Principles and practice of genitourinary oncology*. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1996, págs 403-408.

**Cairns P, Gkanii K, y Halachami S, et al:** Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res*, 57: 4997-5000, 1997.

**Lee W-H, Morton RA, y Epstein JI, et al:** Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 11733-11737, 1994.

**Lee W-H, Isaacs WB, y Bova GS, et al:** CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6:443-450, 1997.

**Esteller M, Corn PG, y Urena JM, et al:** Inactivation of Glutathione S-Transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*, 58: 4515-4518, 1999.

**Brooks JD, Weinstein M, y Lin X, et al:** CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 531-536, 1998.

**Esteller M, Sanchez-Cespedes M, y Rosell R, et al:** Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in Serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 59: 67-70, 1999.

**Sanchez-Cespedes M, Esteller M, y Wu L, et al:** Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck patients. *Cancer Res*, 3: 1229-1235, 2000.

**Cairns P, Esteller M, y Herman JG, et al:** Detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*, 7: 2727-2730, 2001.

- Goessl C, Krause H, y Müller M, et al:** Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res*, 60: 5941-5945, 2000.
- Heid CA, Stevens J, y Livak KJ, et al:** Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986-994, 1996.
- Lo YM, Wong IHN, y Zhang J, et al:** Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 59: 3899-3903, 1999.
- Jerónimo C, Usadel H, y Henrique R, et al:** Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 93: 1747-1752, 2001.
- Hermanek P, Hutter RVP, y Sobin LH, et al:** Prostate, en: Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, y Wittekind C (Eds.): *Illustrated Guide to the TNM/pTNM Classification of malignant tumors*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1997, Pigs: 272-280.
- Gleason DF, Mellinger GT, y Veterans Administration Cooperative Urological Research group:** Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. *J Urol*, 111:58-64, 1974.
- Ahrendt SA, Chow JT, y Xu L-H, et al:** Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, 91: 332-339, 1999.
- Olek A, Oswald J, y Walter JA:** A modified and improved method of bisulfite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 24: 5064-5066, 1996.
- Eads CA, Danenberg KD, y Kawakami K, et al:** CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res*, 59: 2302-2306, 1999.
- Lo VM, Chan LYS, y Chan ATC, et al:** Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 59: 5452-5455, 1999.
- Saiki RK, Gelfand DH, y Stoffel S, et al:** Primer-directed enzymatic of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491, 1988.
- Sharifi R, Shaw M. y Ray V, et al:** Evaluation of cytologic techniques for diagnosis of prostate cancer. *Urology*, 21: 417-420, 1983.
- Suh CI, Shanafelt T, y - May DJ, et al:** Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Molecular and Cellular Probes*, 14: 211-217, 2000.
- Ahuja N, Li Q, y Mohan AL, et al:** Aging, DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res*, 58: 5489-5494, 1998.
- Toyota M, e Issa JP:** CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Mot*, 9: 349-357, 1999.
- Herman 7G, Graff JR, y Myöhänen S, et al:** Methylation-specific PCR, a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 9821-9826, 1996.

# REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:

determinar una relación de metilación de una muestra biológica de un sujeto, en el que la relación de metilación es el nivel de ADN metilado de una región de promotor de glutatona-S-transferasa (GSTP1) con relación al nivel de ADN de una región de un gen de referencia MYOD o ACTB, en el que una relación de metilación mayor que la relación de metilación de una muestra biológica de un sujeto normal es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto, para detección de la neoplasia de próstata en fase temprana.

2. El método de la reivindicación 1ª, en el que la muestra es un fluido corporal.

3. El método de la reivindicación 2ª, en el que el fluido corporal es suero, plasma, eyaculado u orina.

4. El método de la reivindicación 1ª, en el que la muestra es una muestra de tejido de próstata.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en el que el nivel de ADN metilado de una región de promotor de GSTP1 se determina usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.

6. El método de la reivindicación 5ª, en el que al menos un cebador usado en la PCR es capaz de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado; o

en el que ambos cebadores usados en la PCR son capaces de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado;

o en el que una sonda usada en la PCR es capaz de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado; o

en el que ambos cebadores y una sonda usados en la PCR son capaces de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el nivel de ADN de la región del gen de referencia se determina usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, en el que el nivel de ADN de la región del gen de referencia se determina usando reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real, en el que la región contiene un primero y un segundo lugar de unión de cebador y un lugar de unión de sonda y en el que el primero y el segundo lugar de unión de cebador y el lugar de unión de sonda están exentos de dinucleótidos CpG.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, en el que la región del gen de referencia está exenta de dinucleótidos CpG.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, en el que una relación de metilación por 1.000 mayor que 3 es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto; o

en el que una relación de metilación por 1.000 mayor que 5 es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto; o

en el que una relación de metilación por 1.000 mayor que 10 es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, que comprende además realizar un análisis histológico de la muestra, en el que la muestra es muestra de tejido de próstata.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, en el que una relación de metilación mayor que 5 es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto; o

en el que una relación de metilación mayor que 10 es indicativa de neoplasia de próstata en el sujeto.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 12ª, que comprende además medir el nivel de PSA del sujeto.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 13ª, en el que el sujeto tiene un nivel de PSA normal.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 14ª, en el que el sujeto tiene un nivel de PSA mayor que un nivel de PSA normal.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 15ª, en el que la neoplasia de próstata es adenocarcinoma de próstata.

17. Un juego útil para detectar adenocarcinoma de próstata que comprende

un primer recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de una región de promotor de glutathione-S-transferasa (GSTP1),

un segundo recipiente que contiene un par de cebadores para multiplicación de una región de un gen de referencia MYOD o ACTB y

un tercer recipiente que contiene una primera y una segunda sondas de oligonucleótido,

en el que la primera sonda de oligonucleótido es específica para la multiplicación de la región de promotor de GSTP1 y la segunda sonda de oligonucleótido es específica para la multiplicación de la región del gen de referencia,

en el que al menos uno de los cebadores para la multiplicación de la región de promotor de GSTP1 o una de las sondas de oligonucleótido es capaz de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

18. El juego de la reivindicación 17<sup>a</sup>, que comprende además un cuarto recipiente que contiene un agente de modificación que modifica citosina no metilada para producir un ácido nucleico convertido.

19. El juego de la reivindicación 17<sup>a</sup>, que comprende además una instrucción que describe una relación de metilación indicativa de adenocarcinoma de próstata.

20. El juego de la reivindicación 19<sup>a</sup>, que comprende además una instrucción que describe que una relación de metilación mayor que 5 es indicativa de adenocarcinoma de próstata.

21. El juego de la reivindicación 19<sup>a</sup>, que comprende además una instrucción que describe que una relación de metilación mayor que 10 es indicativa de adenocarcinoma de próstata.

22. El juego de la reivindicación 19<sup>a</sup>, que comprende además una instrucción que describe que una relación de metilación mayor que 50 es indicativa de adenocarcinoma de próstata.

23. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 22<sup>a</sup>, en el que la región del gen de referencia está exenta de dinucleótidos CpG.

24. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 23<sup>a</sup>, en el que la región del gen de referencia contiene un primer y un segundo lugar de unión de cebador y un lugar de unión de oligonucleótido y en el que el primer y el segundo lugar de unión de cebador y el lugar de unión de oligonucleótido están exentos de dinucleótidos CpG.

25. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 24<sup>a</sup>, en el que los cebadores para multiplicación de la región de promotor de GSTP1 son capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

26. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 25<sup>a</sup>, en el que la primera sonda de oligonucleótido es capaz de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

27. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 26<sup>a</sup>, que comprende además una instrucción que describe que el juego es útil para detectar adenocarcinoma de próstata en una muestra de tejido de próstata de un sujeto.

28. El juego de una cualquiera de las reivindicaciones 17<sup>a</sup> a 27<sup>a</sup>, que comprende además una sonda para PSA.

29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> o la reivindicación 16<sup>a</sup>, en el que el nivel de ADN metilado de la región de promotor de glutathione-S-transferasa (GSTP1) se determina por multiplicación usando cebadores de oligonucleótido en presencia de al menos una sonda de oligonucleótido específica,

en el que la región de promotor se modifica por un agente que modifica citosina no metilada para producir un ácido nucleico convertido, y en el que al menos un cebador de oligonucleótido o sonda de oligonucleótido específica es capaz de distinguir entre ácido nucleico no metilado y metilado,

en el que la determinación del nivel de ADN metilado de la región de promotor se basa en desplazamiento mediado por multiplicación de la sonda de oligonucleótido específica,

en el que un nivel de metilación mayor que el nivel de metilación en un sujeto normal es indicativo de adenocarcinoma de próstata en el sujeto.

30. El método de la reivindicación 29<sup>a</sup>, en el que la etapa de multiplicación es una reacción en cadena de polimerasa (PCR).

31. El método de la reivindicación 29<sup>a</sup> o la reivindicación 30<sup>a</sup>, en el que el agente es bisulfito.



## ES 2 304 462 T3

32. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 29<sup>a</sup> a 31<sup>a</sup>, en el que al menos dos cebadores de oligonucleótido son capaces de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

5 33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 29<sup>a</sup> a 32<sup>a</sup>, en el que al menos una sonda de oligonucleótido específica es capaz de distinguir entre ácido nucleico metilado y no metilado.

34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 29<sup>a</sup> a 33<sup>a</sup>, en el que la sonda de oligonucleótido específica comprende además al menos un resto de marca de fluorescencia.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

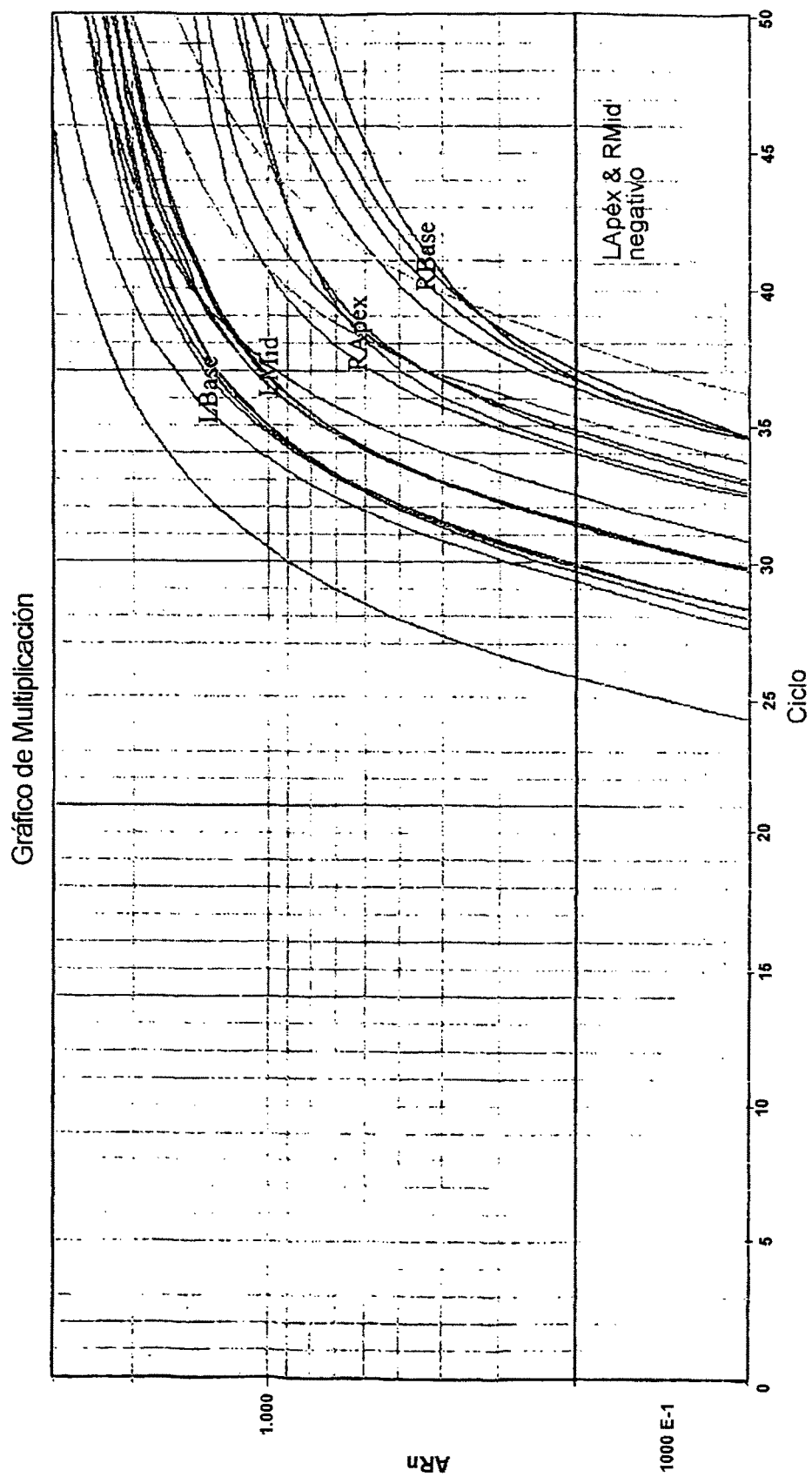


FIGURA 1

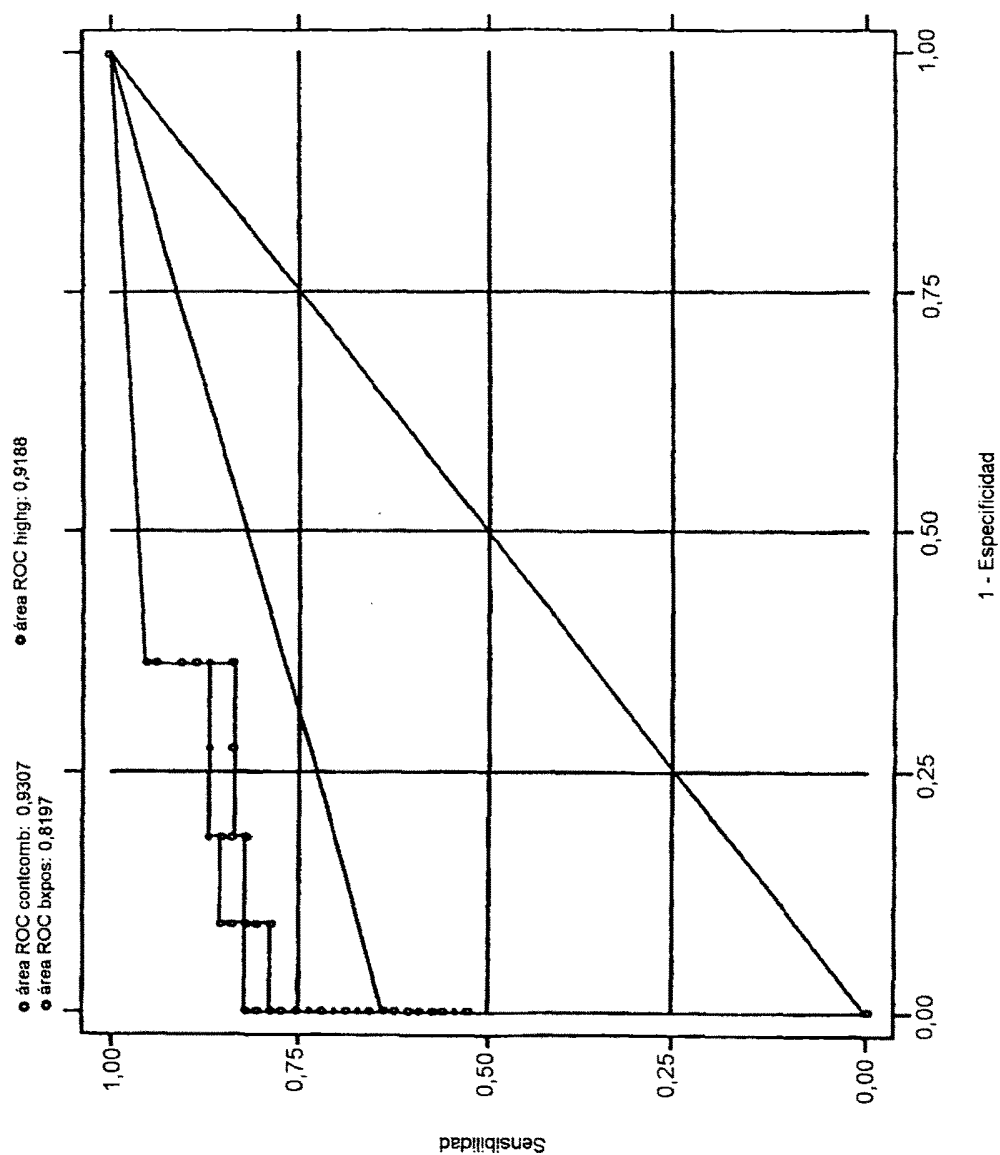


FIGURA 2

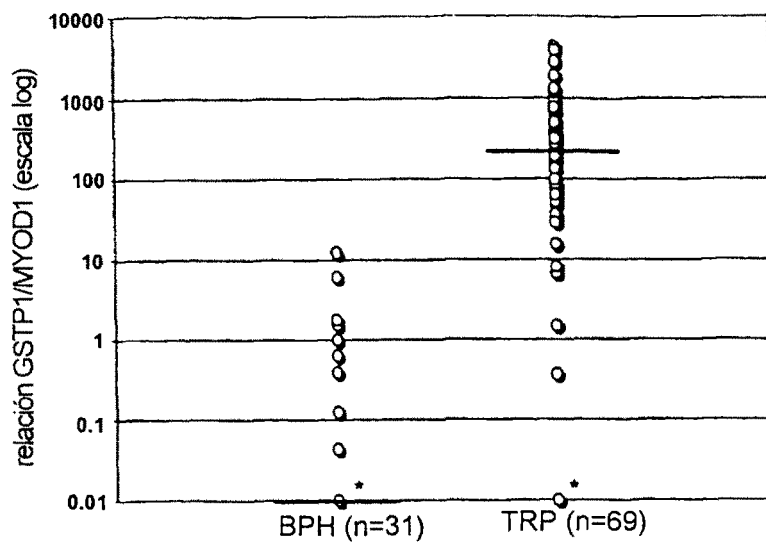


FIGURA 3a

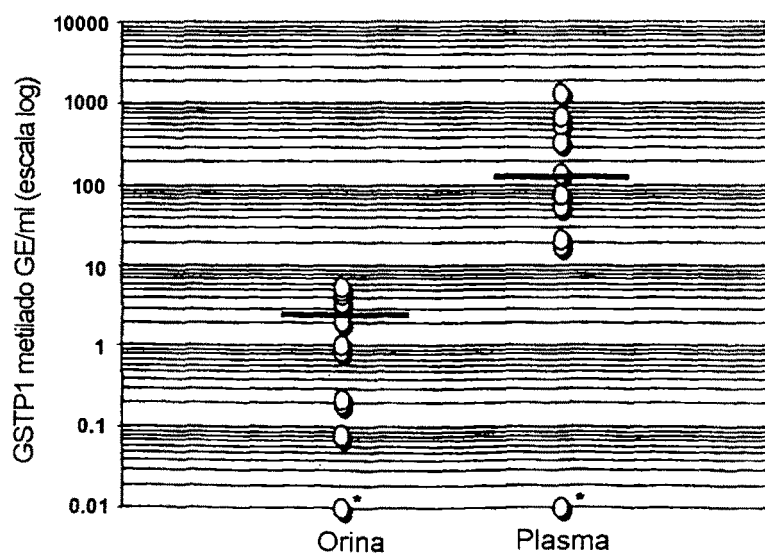


FIGURA 3b