



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 272**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03790506 .4**

96 Fecha de presentación : **15.12.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1581794**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **10.01.2003 US 439205 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, Inc.**
40 Landsdowne Street
Cambridge, Massachusetts 02139, US

72 Inventor/es: **Ross, Jeffrey, S.**

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 314 272 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

Métodos para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

5 Antecedentes de la invención

Ya se ha estudiado gran variedad de marcadores moleculares y dependientes de la morfología en cuanto a su capacidad para predecir el resultado de la enfermedad en casos de cáncer de próstata (Isaacs y col. (1997) *Am. J. Pathol.* 150: 1511-1521; Koch y col. (2000) *J. Urol.* 164: 749-753; Alers y col. (2000) *Lab. Invest.* 80: 931-942). Las medidas dependientes de la morfología tradicionales incluyen el grado del tumor, su volumen y su etapa patológica. Se han propuesto numerosos marcadores moleculares por su utilidad clínica potencial, incluyendo la determinación de p21, p27, ciclina D1, p53, bcl-2, E-cadherina, HER-2/neu, metaloproteasas de matriz, telomerasa, GST-Tc (Isaacs y col. (1997) *supra*; Koch y col. (2000) *supra*; Alers y col. (2000) *supra*; Ross y col. (2002) *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2: 129-142; Stattin y col. (1997) *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 185: 1-46). Sin embargo, la amplia utilización de estos marcadores para la individualización de la terapia se ha visto obstaculizada por diversos factores, incluyendo una falta de aceptación general de la relevancia de sus pronósticos, problemas referentes a la especificidad y sensibilidad de las plataformas de ensayo disponibles para cada marcador y el limitado tejido disponible.

El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) es una folato-hidrolasa transmembrana consistente en 750 aminoácidos con un peso molecular de 110 kDa (Israeli y col. (1994) *Cancer Res.* 54: 1807-1811; Murphy y col. (1998) *J. Urol.* 160:2396-2401; Tasch y col. (2001) *Crit. Rev. Immunol* 21: 249-261). La expresión del PSMA ha sido demostrada sistemáticamente mediante inmunohistoquímica (IHC) y otras técnicas en tejidos prostáticos normales e hiperplásicos, en neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y en carcinomas invasivos (Silver y col. (1997) *Clin Cancer Res.* 3:81-85; Murphy y col. (1998) *Cancer* 83: 2259-2269; y Bostwick y col. (1998) *Cancer* 82: 2256-2261). La expresión de PSMA y la actividad enzimática del PSMA es mayor en especímenes de cáncer de próstata que en tejidos de próstata benignos (Bostwick y col. (1998) *supra*; Lapidus y col. (2000) *Prostate* 45: 350-354). El descubrimiento de que en el cáncer de próstata metastásico se expresa PSMA ha conducido al desarrollo inicial de estrategias de procesamiento diagnóstico de imágenes utilizando anticuerpos anti-PSMA y, posteriormente, a ensayos clínicos de anticuerpos anti-PSMA radioconjugados para el tratamiento de enfermedades metastásicas (Gong y col. (1999) *Cancer Metast Rev.* 18: 483-490; Gong y col. (2000) *Mol Urol.* 4: 217-222; Holmes (2001) *Expert Opin Investig Drugs* 10: 5111-519). La identificación de la expresión de PSMA en la neovasculatura de cánceres no prostáticos también ha fomentado el uso potencial de terapias con anticuerpos anti-PSMA para pacientes con carcinomas de riñón, pulmón, colon, mama y otros órganos (Liu y col. (1997) *Clin Cancer Res* 5: 2674-2681; Chang y col. (1999) *Cancer Res.* 59: 3192-3198).

El documento US 6,136,311 se refiere al uso de agentes biológicos que reconocen el PSMA o se unen a él, y a su utilización para detectar células epiteliales normales, hiperplásicas benignas y prostáticas cancerosas.

El documento US 5,935,818 proporciona una molécula de ácido nucleico de mamífero aislada que codifica un PSMA de empalme alternativo y un método para detectar células tumorales micrometastásicas hematogénicas y determinar la progresión del cáncer de próstata en un sujeto.

El documento WO 02/098885 proporciona reactivos y métodos de diagnóstico, detección y tratamiento de cánceres (por ejemplo, cánceres de próstata). En particular, la invención proporciona métodos para generar diversos ligandos de PSMA funcionalizados y la utilización de los mismos en el diagnóstico, la detección, el procesamiento de imágenes y el tratamiento de cánceres de próstata, en particular de aquellos que muestran una sobreexpresión de PSMA.

El documento de Okegawa y col. (2000), *The Prostate* 44:210-218, describe en análisis mediante RT-PCR de la presencia o ausencia de PSMA en muestras de ganglios linfáticos o sangre periférica obtenidas de pacientes con cáncer de próstata, para detectar signos de recurrencia bioquímica del cáncer de próstata.

El documento de Chang y col. (2002), *Urologic Oncology* 7:7-12 es una revisión de diversos estudios realizados con PSMA y cáncer de próstata.

El documento de Okegawa y col. (2000), *The Journal of Urology* 163:1183-1188, describe el análisis de la presencia o ausencia de PSMA en muestras de ganglios linfáticos o sangre periférica obtenidas de pacientes con cáncer de próstata. Dicho documento revela que la detección del cáncer micrometastásico fuera del tumor primario en el paciente puede identificar a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia.

El documento de Loric y col. (2001), *European Journal of Cancer* 37: 1475-1481, revela que la expresión de E-cadherina en tumores ha sido la única variable ensayada que tiene una correlación independiente de la diseminación de células prostáticas en la sangre.

El documento de Adsan y col. (2002), *BJU International* 90:579-585, describe el uso de RT-PCR para evaluar los niveles de PSMA y PSA en circulación en la sangre, con el fin de calcular la etapa del cáncer y establecer una correlación entre las células metastásicas en los ganglios linfáticos y la sangre y la recurrencia.

Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el conocimiento de que un subconjunto de sujetos con cáncer de próstata presenta una sobreexpresión de PSMA en comparación con los niveles de PSMA en otros pacientes con cáncer de próstata y que esta sobreexpresión de PSMA en dicho subconjunto puede ser utilizada para predecir la recurrencia de la enfermedad. De acuerdo con la American Cancer Society, casi el 40% de los hombres con cáncer de próstata tiene una recurrencia local de la enfermedad después de la cirugía, y aproximadamente un 11% presenta un alto riesgo de propagación metastásica de la enfermedad. Se ha comprobado que puede emplearse la sobreexpresión de PSMA en sujetos con cáncer de próstata para determinar la probabilidad de recurrencia del cáncer en el sujeto independientemente de otros factores, tales como el grado de Gleason y/o la etapa del cáncer.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención presenta un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de recurrencia del cáncer de próstata. El método incluye la toma de una muestra de una lesión primaria de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata y la determinación de los niveles de expresión de PSMA en dicho sujeto, donde la sobreexpresión de PSMA en comparación con un patrón de referencia, es decir, un nivel de expresión de PSMA estadísticamente significativo, distingue los sujetos que tienen recurrencia y los sujetos que no tienen recurrencia, por ejemplo los niveles en un sujeto control al que se le ha diagnosticado el cáncer, indican un riesgo de recurrencia del cáncer.

La muestra de tejido puede ser una muestra de biopsia o una muestra obtenida de una prostatectomía parcial o radical del sujeto. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el riesgo de recurrencia puede ser evaluado durante el diagnóstico de un sujeto con cáncer, por ejemplo en la muestra de biopsia, o la evaluación se puede realizar después de los diagnósticos, por ejemplo después de que un sujeto haya recibido un tratamiento anticanceroso, por ejemplo después de una prostatectomía parcial o radical. La muestra se puede obtener antes del tratamiento con una terapia anticancerosa, simultáneamente con el tratamiento y/o después del tratamiento.

En algunas realizaciones se puede determinar la cantidad de proteína de PSMA utilizando cualquier ensayo adecuado, por ejemplo utilizando un anticuerpo anti-PSMA, por ejemplo en un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un *Western blot* o un método inmunohistoquímico. Alternativamente, el nivel de expresión de PSMA se puede determinar a través de la cantidad de ácido nucleico de PSMA (por ejemplo RNAm) en la muestra biológica. Por ejemplo, las cantidades de expresión de ácidos nucleicos de PSMA (por ejemplo, niveles de RNAm) se pueden determinar fácilmente utilizando cualquier ensayo adecuado, por ejemplo *Northern blotting*, RT-PCR, o empleando biochips.

En algunas realizaciones, el riesgo de recurrencia en un sujeto que presenta niveles de expresión de PSMA elevados es superior al 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o más.

La invención presenta un método para evaluar el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata. El método incluye la toma de una muestra de una lesión primaria de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata; la detección del nivel de expresión de PSMA, existiendo una correlación entre una sobreexpresión de PSMA y el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata; y la asignación de un valor del riesgo de recurrencia para el sujeto en cuestión.

En algunas realizaciones, a un sujeto que tiene un nivel de expresión elevado se le asigna un valor de un 50%, 60%, 70%, 80% o más de riesgo de recurrencia. En otras realizaciones, a un sujeto que no presenta un nivel elevado de expresión se le asigna un valor de un 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o menos de riesgo de recurrencia.

La muestra de tejido puede ser una muestra de biopsia o una muestra obtenida de una prostatectomía parcial o radical del sujeto. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el riesgo de recurrencia puede ser evaluado durante el diagnóstico de un sujeto con cáncer, por ejemplo en la muestra de biopsia, o la evaluación se puede realizar después de los diagnósticos, por ejemplo después de que un sujeto haya recibido un tratamiento anticanceroso, por ejemplo después de una prostatectomía parcial o radical.

En algunas realizaciones se pueden determinar las cantidades de proteína de PSMA utilizando cualquier ensayo adecuado, tal como utilizando un anticuerpo anti-PSMA, por ejemplo en un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un *Western blot* o un método inmunohistoquímico. Alternativamente, el nivel de expresión de PSMA se puede determinar a través de la cantidad de ácido nucleico de PSMA (por ejemplo RNAm) en la muestra biológica. Por ejemplo, las cantidades de expresión de ácidos nucleicos de PSMA (por ejemplo, niveles de RNAm) se pueden determinar fácilmente utilizando cualquier ensayo adecuado, por ejemplo *Northern blotting*, RT-PCR, o empleando biochips.

El método de las reivindicaciones adjuntas también incluye la provisión de una base de datos útil para establecer el valor de referencia aquí mencionado o para evaluar de otro modo los niveles de PSMA en uno o más sujetos mediante la generación o recepción de datos, por ejemplo el nivel de PSMA, o la probabilidad o el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata en un paciente, generándose dichos datos mediante el método aquí descrito; y la introducción de los datos en la base de datos.

En la base de datos se introduce un indicador (por ejemplo un valor) del estado de la enfermedad de un paciente y/o un identificador del paciente.

La base de datos prevista en el método de las reivindicaciones adjuntas puede incluir varias entradas, comprendiendo cada una de ellas uno o más de los siguientes elementos: datos (por ejemplo niveles de expresión de PSMA) sobre la probabilidad o el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata en un paciente, un indicador del estado de la enfermedad de un paciente y un identificador del paciente.

Puede evaluarse la probabilidad o el riesgo de recurrencia del cáncer de próstata en un paciente mediante comparación de los datos del paciente (por ejemplo niveles de expresión de PSMA), habiéndose generado dichos datos mediante el método aquí descrito, con los datos de una base de datos aquí descrita.

En el método se puede producir un patrón de referencia, incluyendo en el patrón datos de una base de datos aquí descrita. Por ejemplo, se pueden tomar valores de una base de datos, realizar una operación matemática con los mismos y utilizar el resultado como referencia para llevar a un patrón de referencia, por ejemplo tomando un promedio de diversos valores seleccionados en la base de datos y utilizando el promedio como patrón.

Breve descripción de las figuras

Figura 1A

Fotografía que muestra una inmunotinción de PSMA relativamente débil en un hombre caucásico de 64 años de edad con un cáncer de próstata extracapsular en etapa III Gleason 7 que no había mostrado recurrencia a los 68 meses de observación (anti-PSMA con anticuerpo 7E11, peroxidasa-antiperoxidasa con colorante de contraste de hematoxilina X 200).

Figura 1B

Fotografía que muestra una sobreexpresión significativa de PSMA detectada mediante inmunohistoquímica en un hombre caucásico de 61 años de edad con un tumor confinado en el órgano etapa II Gleason 7, que mostró recurrencia a los 44 meses y evolucionó a una enfermedad metastásica refractaria de la hormona (anti-PSMA con anticuerpo 7E11, peroxidasa-antiperoxidasa con colorante de contraste de hematoxilina X 200).

Figura 2

Gráfico que muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier correspondientes a la expresión de PSMA en adenocarcinomas prostáticos. En comparación con pacientes cuyos tumores presentaban un nivel de expresión de PSMA correspondiente a la base de referencia, los pacientes con adenocarcinomas prostáticos con una expresión relativamente elevada de proteína de PSMA sufrieron una tasa de recurrencia significativamente mayor ($p = 0,001$).

Figura 3

Gráfico que muestra los niveles de expresión relativa de RNAm de PSMA obtenidos mediante perfiles de transcripción de próstata normal y carcinomas de próstata. Los tumores se clasificaron por la etapa y por el nivel de PSA en suero medido en los pacientes. Los datos fueron normalizados para las secuencias alu y diversos genes domésticos. Se obtuvieron datos de expresión y valores de PSA en suero de 25 especímenes diferentes de próstata normal y de 30 carcinomas de próstata diferentes en diversas etapas.

Figura 4

Gráfico que muestra el análisis TaqManTM tabulado de la expresión de PSMA en el Panel de Enumeración de Células y Órganos Humanos de la Tabla 2. Los datos indican una expresión predominante de PSMA en tumores de próstata, seguidos del sistema nervioso, glándulas salivales, próstata normal e hígado. Éstas son las abreviaturas clínicas utilizadas en los paneles: ACA = adenocarcinoma; Arr = detenido; $\beta 2$ = beta-2-microglobulina; BM-MNC = células mononucleares derivadas de médula ósea; CHF = insuficiencia cardíaca congestiva; CNS = sistema nervioso central; COPD = enfermedad pulmonar obstructiva crónica; DRG = ganglio de la raíz dorsal; H = humano; HMVECs = células endoteliales microvasculares humanas; HT = hipertensivo; HUVEC = células endoteliales de vena umbilical humana; Hyper = hipertensivo; IBD = enfermedad intestinal inflamatoria; Liv = hígado; Met = metástasis; N = normal; PBMC = células mononucleares de sangre periférica; Prol = proliferativo; PSMA = antígeno de membrana específico de la próstata; Sm = pequeño; SMC = células de músculo liso cultivadas; T = tumor.

Figura 5

Gráfico que muestra el análisis TaqManTM del PSMA en el Panel de Tejido Prostático de la Tabla 3. Los datos muestran la expresión relativa de RNAm de PSMA normalizado a $\beta 2$ -microglobulina en diversos especímenes de próstata normal/BPH, tumor primario y metástasis de hígado y ganglios linfáticos, y tejidos control normales de hígado y ganglios. Se detectaron transcripciones de PSMA en todos los especímenes de próstata, con un aumento de éstas en un subgrupo de tumores malignos. No se detectó ningún nivel de plasma bajo en ganglios e hígado normales, respectivamente.

Figura 6

Gráfico que muestra el análisis TaqMan™ de PSMA en estroma y epitelio aislado por microdissección por captura láser de próstata normal, y que muestra PCA. Los datos representan la expresión relativa de RNAm de PSMA normalizado a $\beta 2$ -microglobulina.

Figura 7

Microfotografías de la localización del RNAm de PSMA mediante hibridación *in situ* y de la localización de la proteína de PSMA mediante inmunohistoquímica en una próstata normal (A y B), un adenocarcinoma primario de próstata (C y D) y una metástasis de ganglios linfáticos (E y F).

Descripción detallada de la invención

A pesar del interés actual por el PSMA como objetivo de la terapia para pacientes con HRPC, anteriormente no se había evaluado la expresión del PSMA en el cáncer de próstata como un marcador de pronóstico autónomo. Como muestran los ejemplos descritos más abajo, puede emplearse el estado de la expresión de PSMA para predecir el resultado de la enfermedad de cáncer de próstata. Esto se ha llevado a cabo correlacionando la inmunorreactividad citoplásmica para la proteína de PSMA con el grado del tumor, su etapa, el estado de ploidía del DNA (espectroscopía Feulgen) y la recurrencia bioquímica de la enfermedad. Además, se han utilizado otras técnicas moleculares (perfiles de transcripción (TP) utilizando biochips de DNAc sobre membranas de nylon, RT-PCR (TaqMan), hibridación *in situ*, microdissección mediante captura láser (LCM) y *Western blotting*) para evaluar la regulación del RNA y la proteína en diversas etapas de desarrollo y progresión del PCA.

Se ha comprobado que la expresión de RNAm de PSMA y proteína está muy limitada a tejidos de próstata normal y cáncer de próstata con niveles elevados de RNAm en un subconjunto de PCAs y metástasis, y aumenta en proteína de PSMA inmunorreactiva a medida que el tumor progresa desde una situación localizada hasta una enfermedad metastásica. También se ha comprobado que la sobreexpresión de proteína de PSMA en el tumor predice independientemente el resultado de la enfermedad. Existe una serie de importantes obstáculos que han de ser superados cuando se considera una diana como candidata para la terapia con anticuerpos monoclonales, incluyendo: relevancia clínica de la diana, especificidad tumoral, heterogeneidad de la expresión, interiorización, eliminación del antígeno y actividad biológica del objetivo. Este estudio demuestra una especificidad epitelial y restringida a la glándula prostática para el PSMA, con un aumento adicional de PSMA a nivel de RNAm y proteína en una cantidad significativa de lesiones malignas, y una asociación clínicamente relevante de la sobreexpresión de la proteína de PSMA con una enfermedad agresiva y un pronóstico relativamente malo.

Para que la presente invención se pueda comprender más fácilmente, primeramente se definirán ciertos términos. A lo largo de toda la descripción detallada se establecen otras definiciones.

Tal como se utiliza aquí, el concepto proteína de “PSMA” o “antígeno de membrana específico de la próstata” se refiere a PSMA de mamífero, preferentemente proteína de PSMA humano y dímeros de ésta. El PSMA humano incluye dos productos proteínicos, PSMA y PSM', codificados por las dos variantes de RNAm de empalme alternativo (conteniendo aproximadamente 2.653 y 2.387 nucleótidos, respectivamente) del DNAc de PSMA descritos en Israeli y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 227-230; Su y col. (1995) *Cancer Res.* 55: 1441-1443; US 5,538,866, US 5,935,818 y WO 97/35616. La transcripción larga del PSMA codifica un producto proteínico con un peso molecular de aproximadamente 100-120 kDa caracterizado como un receptor transmembrana de tipo II, que tiene una homología de secuencia con el receptor de transferrina y presenta actividad de NAALADasa (Carter y col. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 749-753). Por consiguiente, el término “PSMA humano” se refiere al menos a dos productos proteínicos, PSMA y PSM' humanos, que tienen o son homólogos (por ejemplo idénticos al 85%, 90%, 95%) a la secuencia de aminoácidos mostrada en Israeli y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 227-230; Su y col. (1995) *Cancer Res.* 55: 1441-1443; US 5,538,866, US 5,935,818 y WO 97/35616; o que son codificados por (a) una secuencia de ácidos nucleicos de PSMA humano natural (por ejemplo Israeli y col. (1993) *Cancer Res.* 53: 227-230 o US 5,538,866); (b) una secuencia de ácidos nucleicos degenerada a una secuencia de PSMA humano natural; (c) una secuencia de ácidos nucleicos homóloga (por ejemplo idéntica como mínimo en aproximadamente un 85%, 90%, 95%) a la secuencia de ácidos nucleicos de PSMA humano natural; o (d) una secuencia de ácidos nucleicos que se híbrida en una de las secuencias de ácidos nucleicos arriba mencionadas bajo condiciones estrictas, por ejemplo condiciones altamente estrictas.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “esencialmente idéntico” (o “esencialmente homólogo”) se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene una cantidad suficiente de residuos aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo con una cadena lateral similar, por ejemplo sustituciones de aminoácidos conservadas) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos, de tal modo que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos tienen actividades similares.

Los cálculos de “homología” entre dos secuencias se pueden llevar a cabo de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para lograr una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para una alineación óptima, y se pueden ignorar secuencias no homólogas para la comparación). En una realización preferente, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines comparativos corresponde como mínimo al 30%, preferentemente como mínimo el 40%, de forma

especialmente preferente como mínimo el 50%, en especial como mínimo el 60% y en particular como mínimo el 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Entonces se comparan los residuos aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácido o en las posiciones de los nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en dicha posición (tal como se utiliza aquí, el término “identidad” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a “homología” de aminoácido o ácido nucleico). La identidad porcentual entre las dos secuencias es función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta la cantidad de huecos y la longitud de cada uno de los huecos que han de ser introducidos para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación de la homología porcentual entre dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferente, la homología porcentual entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:444-453, que ha sido incorporado en el programa GAP del paquete de *software* GCG, utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, con un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En otra realización preferente, la homología porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP del paquete de *software* GCG, empleando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferente (y que debería ser utilizado cuando el médico no está seguro sobre los parámetros que deberían ser aplicados para determinar si una molécula está dentro de una limitación de homología de la invención) consiste en una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de lectura de 5.

Tal como se utiliza aquí, la expresión “hibridación bajo condiciones de rigurosidad baja, rigurosidad media, rigurosidad alta o rigurosidad muy alta” describe las condiciones para la hibridación y el lavado. En *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, que se incorpora aquí por referencia, se puede encontrar orientación para la realización de reacciones de hibridación. En dicha referencia se describen métodos acuosos y no acuosos, y pueden emplearse ambos. Las condiciones de hibridación específicas aquí mencionadas son las siguientes: 1) condiciones de hibridación de rigurosidad baja en 6X cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0,2X SSC, 0,1% SDS como mínimo a 50°C (la temperatura de los lavados se puede aumentar a 55°C para las condiciones de rigurosidad baja); 2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% SDS a 60°C; 3) condiciones de hibridación de rigurosidad alta en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2X SSC, 0,1% SDS a 65°C; y preferentemente 4) las condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato sódico 0,5M, 7% SDS a 65°C, seguido por uno o más lavados a 0,2X SSC, 1% SDS a 65°C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferentes y las que se deberían utilizar, a no ser que se especifique de otro modo.

Tal como se utiliza aquí, el término “recurrencia” se refiere a un aumento de los niveles de PSA después de un tratamiento antitumoral (por ejemplo prostatectomía o radiación) a un valor superior a 0,4 ng/dl en dos análisis consecutivos separados por un período de un mes. Después de un tratamiento antitumoral, por ejemplo una prostatectomía o radiación, los niveles de PSA caen a un valor bajo y, en algunos casos, a niveles indetectables en sangre. Esta caída de los niveles de PSA por debajo de 0,4 ng/dl permite efectuar un seguimiento de los niveles de PSA para determinar si se ha producido una recurrencia del cáncer en un sujeto. La recurrencia del cáncer se puede producir en un período de tiempo corto desde el tratamiento antitumoral, por ejemplo unos meses después del tratamiento, o puede tener lugar varios años después de un tratamiento antitumoral. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de próstata, la recurrencia se puede producir varios años después de un tratamiento antitumoral, por ejemplo hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15 años después del tratamiento. La recurrencia se puede clasificar como “recurrencia local” o “recurrencia distante”. La “recurrencia local” se refiere a cánceres que recurren en tejidos u órganos adyacentes o próximos al tejido u órgano canceroso. Por ejemplo, en sujetos con cáncer de próstata, la recurrencia local se puede producir en tejidos cercanos a la próstata, en las vesículas seminales, en los ganglios linfáticos circundantes de la pelvis, en los músculos cercanos a la próstata, y en el recto y/o en las paredes de la pelvis. La “recurrencia distante” se refiere a cánceres que recurren alejados del tejido u órgano canceroso. Por ejemplo, en sujetos con cáncer de próstata, la recurrencia distante incluye cánceres que se propagan a los huesos u otros órganos.

También se conocen otros métodos para evaluar el riesgo de recurrencia. Por ejemplo, en sujetos con cáncer de próstata, el riesgo se puede evaluar mediante varios métodos diferentes, incluyendo uno o más de los siguientes: determinación del grado del cáncer; determinación de la etapa del cáncer; y determinación del estado de ploidía del DNA (por ejemplo, determinación del índice de DNA).

Tal como se utiliza aquí, el término “grado” del cáncer o “grado de Gleason” se refiere a un análisis patológico de una muestra, por ejemplo una muestra de biopsia, obtenida de un sujeto. Por ejemplo, en Gleason (1992) *Hum Pathol.* 23:273-279 se describen métodos para determinar el grado de Gleason. En pocas palabras: el aspecto de células cancerosas se compara con el aspecto de tejido prostático normal y se asigna un grado a las células cancerosas de 1 a 5. El grado 1 representa células que son casi normales en comparación con el tejido prostático normal. El grado 5 es el peor e indica que las células tienen una patología muy anormal en comparación con el tejido prostático normal. Los resultados de las dos áreas de cáncer más grandes de la muestra, por ejemplo la muestra de biopsia, se suman para obtener el grado de Gleason. Por ello, las muestras positivas pueden tener un grado de Gleason entre grado 2 y grado 10. un grado de Gleason 6 ó 7 se considera moderado.

Tal como se utiliza aquí, la “etapa” de un cáncer se refiere a cuánto ha avanzado el cáncer. Por ejemplo, en Ohori y col. (1994) *Cancer* 74:104-114 se describen métodos para determinar la etapa de un cáncer. Los sistemas de determinación de etapas más comunes asignan las etapas I, II, III y IV a un cáncer. En el caso del cáncer de próstata, la “etapa I” se refiere a un cáncer que sólo se detecta por un PSA elevado y por biopsia, o en una cirugía por una obstrucción. Los cánceres de la etapa I están localizados en la próstata. La “etapa II” se refiere a un cáncer que se puede palpar en un examen rectal y está limitado a la próstata. Los cánceres de la etapa II también se pueden evaluar por ejemplo mediante gammagrafía ósea y/o exploración por CT/MRI. La “etapa III” se refiere a un cáncer que se ha propagado más allá de la cápsula de la próstata hasta los órganos y/o tejidos locales, pero que todavía no ha metastatizado. Los cánceres de la etapa III se pueden diagnosticar por ejemplo utilizando exámenes rectales digitales, exploraciones por CT/MRI y/o ecografías. La “etapa IV” se refiere a un cáncer que se ha propagado, normalmente hasta ganglios linfáticos distantes, huesos u otros lugares. Los cánceres de la etapa IV se pueden diagnosticar por ejemplo mediante una gammagrafía ósea y/o por exploración con Prostascint.

Se evalúan métodos para determinar el índice de DNA, por ejemplo determinando si el tumor es diploide o no diploide. Por ejemplo, en el Ejemplo 1 se proporciona un método para determinar el índice de DNA.

Evaluación de la expresión de PSMA

La invención se refiere a la medicina de predicción utilizando la expresión de PSMA como determinante del riesgo de recurrencia del cáncer. Dentro del alcance de esta invención se contempla la aplicación de un análisis de expresión de PSMA como parte de un protocolo farmacogenético (por ejemplo mediante el uso de biochips) para evaluar el estado y el pronóstico de los pacientes.

El nivel de RNAm correspondiente al gen de PSMA en una célula se puede determinar por ejemplo mediante formatos *in situ* o *in vitro*.

Las sondas de RNAm de PSMA se pueden utilizar en ensayos de hibridación o amplificación, que incluyen, pero no de forma exclusiva, análisis *Southern* o *Northern*, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y disposiciones de sondas. Un método para detectar niveles de RNAm consiste en poner en contacto el RNAm con una molécula de ácido nucleico (sonda) que se puede hibridar en el RNAm codificado por el gen detectado. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de PSMA completo o una porción de éste, como un oligonucleótido de como mínimo 7, 10, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse bajo condiciones rigurosas en RNAm de PSMA, DNAc o partes de éstos. Las sondas de pueden marcar con un reactivo detectable para facilitar la identificación de la sonda. Los reactivos útiles incluyen, pero no de forma exclusiva, colorantes radiactivos, tintes fluorescentes o enzimas capaces de catalizar un producto detectable.

En un formato, se inmoviliza RNAm (o DNAc) sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo pasando el RNAm aislado sobre gel de agarosa y transfiriendo el RNAm desde el gel de agarosa hasta una membrana, por ejemplo de nitrocelulosa. En un formato alternativo, las sondas se inmovilizan sobre una superficie y el RNAm (o DNAc) se pone en contacto con las sondas, por ejemplo en una disposición bidimensional de biochips. Un especialista puede adaptar los métodos de detección de RNAm conocidos para utilizarlos en la detección del nivel de RNAm codificado por el gen de PSMA.

El nivel de RNAm en una muestra codificado por un ácido nucleico de PSMA se puede evaluar por amplificación de ácido nucleico, por ejemplo mediante RT-PCR (patente US n° 4,683,202), reacción en cadena de ligasa (Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193, 1991), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990), sistema de amplificación de transcripción (Kwoh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989), Q-beta replicasa (Lizardi y col., Bio/Technology 6:1197, 1988), replicación en círculo rodante (patente US n° 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguida de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas conocidas. Tal como se utiliza aquí, el concepto “cebadores de amplificación” se define como un par de moléculas de ácido nucleico que se puede reasociar con regiones 5’ o 3’ de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o viceversa) y contener una región corta en medio. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos y flanquean una región con una longitud de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos. Bajo condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, estos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico, incluyendo la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para los métodos *in situ* se puede preparar/procesar una muestra de tejido e inmovilizar ésta sobre un soporte, típicamente un portaobjetos, y después ponerla en contacto con una sonda que se puede hibridar en RNAm que codifica el gen de PSMA analizado.

Para determinar el nivel de proteína codificado por el gen de PSMA se pueden utilizar diversos métodos. En estos métodos, generalmente un agente que se une de forma selectiva a la proteína, tal como un anticuerpo, se pone en contacto con una muestra para evaluar el nivel de proteína en la muestra. En una realización, el anticuerpo incluye un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (por ejemplo Fab o F(ab’)₂). El término “marcado” con respecto a la sonda o el anticuerpo incluye el marcado directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, enlace físico) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, y también el marcado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con una

sustancia detectable. Ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados para detectar PSMA incluyen, por ejemplo, el 7E11 (que se une al dominio intracelular del PSMA) y también cualquiera de los anticuerpos descritos en las patentes US nº 6,150,508, 6,107,090 y 6,136,311, la publicación PCT WO 02/098897, la publicación PCT WO 97/35616 y la publicación PCT WO 01/09192, la publicación de la solicitud de patente US 2003034903, Schülke y col., (2003) PNAS USA, 100(27):12590-12595; Graver y col., (1998) Cancer Res. 58:4787-4789 (cuyos contenidos se incorporan aquí por referencia).

Los métodos de detección pueden ser utilizados para detectar proteína de PSMA en una muestra biológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para detección de proteína de PSMA incluyen ensayos con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, inmunoensayos enzimáticos (EIA), radioinmunoensayos (RIA) y análisis *Western blot*. Las técnicas *in vivo* para detección de proteína de PSMA incluyen la introducción de un anticuerpo anti-PSMA marcado en un sujeto. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radiactivo (por ejemplo un radioisótopo), cuya presencia y localización en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas estándar de procesado de imágenes. Un radioisótopo puede ser un emisor α , β o γ , o un emisor β y γ . Ejemplos de radioisótopos a utilizar incluyen, de forma no exclusiva: itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio, ástato (^{211}At), renio (^{186}Re), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), y rodio (^{188}Rh). Los radioisótopos útiles como marcadores, por ejemplo para ser utilizados en diagnósticos, incluyen yodo (^{131}I o ^{125}I), indio (^{111}In), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) fósforo (^{32}P), carbono (^{14}C) y tritio (^3H).

En algunas realizaciones, los métodos incluyen la comparación del nivel de expresión de PSMA con un patrón de referencia. Tal como se utiliza aquí, la expresión "patrón de referencia" se puede referir a un patrón que consiste en un nivel estadísticamente significativo de expresión de PSMA que distingue a los sujetos que presentan recurrencia de los sujetos que no la presentan. El patrón puede consistir en un nivel particular de expresión de PSMA. Un especialista puede establecer un patrón de referencia tomando una medida de los niveles de expresión de PSMA en sujetos que presentan recurrencia y en sujetos que no la presentan para definir el patrón. Por ejemplo, tal como se describe aquí en el Ejemplo 1, una determinación de la sobreexpresión de PSMA se puede comparar con un patrón de referencia utilizando análisis inmunohistoquímicos. En pocas palabras: la tinción de una muestra, por ejemplo una muestra de biopsia o una muestra de una prostatectomía, se puede evaluar en cuanto a la intensidad de la tinción y la distribución de la tinción citoplásmica a partir de los resultados inmunohistoquímicos. La distribución de la tinción se clasificó como focal, regional o difusa. La intensidad de la tinción se clasificó como débil, moderada o intensa. Se consideró que los casos en los que el patrón de tinción se clasificó como intensa difusa, intensa regional o moderada difusa sobreexpresaban la proteína de PSMA. Métodos como éste pueden ser utilizados para determinar si hay un aumento estadísticamente significativo de la expresión de PSMA en los sujetos que presentan recurrencia. En algunas realizaciones, el aumento es de como mínimo un 100% del nivel del patrón de referencia, es decir, el nivel de expresión en la muestra es dos veces el nivel de expresión en el patrón de referencia, por ejemplo, la expresión aumenta en un 150%, 200%, 250%, 300% o más.

La siguiente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben ser considerados como limitativos.

Ejemplos

Utilizando especímenes de prostatectomía se realizó una tinción inmunohistoquímica (IHC) para PSMA (anticuerpo 7E11) en secciones de 136 casos de PCA insertadas en parafina y fijadas con formalina. La inmunorreactividad citoplásmica se clasificó en función de su intensidad y distribución y los resultados se correlacionaron con el grado del tumor, la etapa, el estado de ploidía del DNA (espectroscopía Feulgen) y recurrencia de la enfermedad. También se llevó a cabo la validación del PSMA diana en un grupo independiente de próstata normal congelada y especímenes de PCA mediante perfiles de transcripción (TP) utilizando biochips de DNAC, RT-PCR (TaqManTM), hibridación *in situ*, RT-PCR después de microdissección por captura láser (LCM), *Western blotting* e IHC.

Ejemplo 1

Análisis cualitativo y estadístico de muestras de pacientes de PCA. Recogida de especímenes, determinación del grado de tumor y determinación de la etapa patológica

Se seleccionaron aleatoriamente 136 pacientes que habían sido sometidos a prostatectomía radical por adenocarcinoma de próstata (PAC) demostrado por biopsia entre 1987 y 1997 en el Albany Medical Center Hospital. Se revisaron los portaobjetos de cada espécimen de prostatectomía radical teñidos con hematoxilina y eosina y se les asignó un grado de Gleason (Gleason (1992) Human Pathol. 23: 273-279) y una etapa patológica (Otori y col. (1994) Cancer 74: 104-114). Durante la revisión se identificaron múltiples bloques en base a la presencia del tumor adecuado y a la naturaleza representativa del grado del tumor general. Los tumores se clasificaron como de alto grado cuando la clasificación de Gleason combinada era igual a 7 o más y de bajo grado cuando la clasificación combinada era igual a 6 o menos. Los niveles de antígeno específico de próstata (PSA) en suero se obtuvieron, en cada caso, de la historia clínica del paciente. El PSA en suero se midió mediante el método de tándem Hybritech[®] (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Un aumento postoperatorio del nivel de PSA de un nivel de base de referencia de 0 ng/ml a más de 0,4 ng/ml en dos ocasiones consecutivas se consideraba como una evidencia biológica de recurrencia de la enfermedad. La información de seguimiento se obtuvo a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes.

Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica para PSMA se llevó a cabo mediante un método automático en el instrumento inmunohistoquímico Ventana ES (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) utilizando un sistema de detección indirecta de biotín avidin diaminobenzidina (DAB) en secciones de 4 micras de un bloque representativo, en cada caso insertadas en parafina y fijadas con formalina (FFPE). Después de la desparafinización en agua, los sitios determinantes antigénicos se desenmascararon en Citra con vapor durante 60 minutos para la detección del PSMA. El anticuerpo primario, (clon 7E11) PSMA antihumano de ratón, consistía en un anticuerpo monoclonal de ratón de la clase IgG1 dirigido contra el dominio interno de la proteína de PSMA (anticuerpo proporcionado por Millennium Pharmaceuticals, Inc.). El anticuerpo secundario consistía en inmunoglobulinas antirratón de cabra biotiniladas (DAKO Carpintería, CA) en una dilución 1:250. Después del desarrollo del color con DAB, los portaobjetos se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina. En todos los casos se utilizaron elementos benignos como controles positivos internos. Para confirmar la especificidad del anticuerpo primario, en cada lote se procesaron los portaobjetos de control negativo, una inmunoglobulina emparejada con isotipo (Sigma, St. Louis, MO) en la misma concentración que la del anticuerpo primario.

Interpretación de la tinción

La inmunorreactividad por PSMA se interpretó sin conocimiento previo de ninguno de los parámetros clinicopatológicos. En la evaluación semicuantitativa de los resultados inmunohistoquímicos para los dos anticuerpos se tuvieron en cuenta la intensidad de la tinción y la distribución de los resultados citoplásmicos positivos. La distribución de la tinción en las células tumorales se clasificó como focal ($\leq 10\%$), regional (11-50%) o difusa ($> 50\%$). La intensidad de la tinción citoplasmática se clasificó subjetivamente como débil, moderada o intensa. Los casos en los que los patrones de tinción se clasificaron como intensa difusa, intensa regional, moderada difusa y moderada regional se consideraron positivos para la expresión de las dos proteínas. También se consideró que los casos en los que los patrones de tinción se clasificaron como intensa difusa, intensa regional y moderada difusa sobreexpresaban proteína de PSMA.

Análisis cuantitativo de DNA

Se tiñeron secciones FFPE de cinco micras según el método de Feulgen y se analizaron en cuanto al contenido de DNA con un CAS 200 Image Analyzer (Cell Analysis Systems, Lombard, IL). Después de calibrar el instrumento con hepatocitos de rata tetraploides teñidos de forma similar, se midió el contenido de DNA de los PAC en un mínimo de 100 células tumorales y se determinó el índice de DNA tumoral por comparación con las células diploides control de epitelio prostático benigno. Todos los histogramas de las células tumorales se revisaron sin tener conocimiento del grado del tumor, la etapa, el estado de recurrencia o los resultados inmunohistoquímicos. Se consideró que un índice de DNA de 0,77-1,22 era diploide. Los picos en la región tetraploide que contenían menos de un 15% de la población celular total se consideraron como componentes G₂M de poblaciones celulares diploides. Los tumores con picos tetraploides superiores al 15% y picos hiperdiploides no tetraploides se consideraron no diploides (aneuploides) (Smith-Jones y col. (2000) *Cancer Res* 60:5237-5243).

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo comparaciones estadísticas con el *software* STATA (Stata Corporation, College Station, TX). Para determinar la importancia de las asociaciones entre la expresión de PSMA y las variables patológicas se utilizó el test ji-cuadrado. El test t se utilizó para probar la igualdad de los medios entre grupos con sobreexpresión y grupos sin sobreexpresión. El análisis de recurrencia de la enfermedad se llevó a cabo con modelos univariantes y el método de Kaplan-Meier. Se llevó a cabo un análisis multivariante incluyendo parámetros clinicopatológicos y la expresión de PSMA utilizando el modelo de peligros proporcionales de Cox. El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$.

Expresión de la proteína de PSMA mediante inmunohistoquímica (IHC)

Los especímenes utilizados para el estudio de los resultados clínicos basado en IHC de tejido con parafina procedían de 136 pacientes con una edad media de 66 años (intervalo de 49-94) y el nivel medio de PSA preoperatorio era de 12,4 ng/ml (intervalo de 1,6-87,8 ng/ml). De los 136 PAC, 76 (56%) eran tumores de bajo grado (clasificación de Gleason ≤ 6) y 60 (44%) eran tumores de alto grado (clasificación Gleason > 7). En la prostatectomía, 83 (61%) eran tumores confinados en el órgano (etapas I y II) y 53 (39%) eran tumores de etapa avanzada (III y IV). De los 96 casos previamente analizados en cuanto al contenido total de DNA, 68 (71%) eran diploides y 28 (29%) no eran diploides. Se disponía de información de seguimiento de todos los pacientes, de los cuales 52 (38%) presentaban recurrencia postoperatoria bioquímica de la enfermedad. El patrón de inmunotinción para PSMA era citoplásmico, mostrando las células tumorales un valor positivo entre moderado e intenso, a diferencia de la expresión relativamente más débil en elementos benignos. Todos los casos de cáncer de próstata expresaban PSMA (Figura 1A) con una tinción débil difusa o superior. Sesenta y cinco de los 136 (48%) cánceres de próstata sobreexpresaban PSMA, lo que se caracterizaba por la presencia de tinción intensa focal o difusa (Figura 1B). La sobreexpresión de PSMA estaba asociada de forma significativa con un grado de tumor alto ($p = 0,04$). La clasificación media de Gleason de tumores con expresión de

PSMA de fondo era de 5,92 y la clasificación media de Gleason de los tumores con sobreexpresión de PSMA era de 6,33. La sobreexpresión de PSMA también estaba asociada con la presencia de tumores no diploides ($p = 0,010$). El índice de DNA medio en el caso de los tumores con sobreexpresión de PSMA era de 1,32, en comparación con un índice de DNA medio de 1,03 en el caso de los tumores con niveles de expresión de PSMA de fondo ($p = 0,002$). El estado de expresión de PSMA también estaba asociado con una etapa tumoral avanzada, con 33/57 (58%) tumores de la etapa III o IV que sobreexpresaban PSMA en comparación con 31/79 (39%) de casos que no sobreexpresaban PSMA ($p = 0,029$). El nivel medio de PSA en suero de 18,28 ng/ml en el momento del diagnóstico en el caso de los tumores que sobreexpresaban PSMA era significativamente mayor que el nivel medio de PSA en suero de 9,10 ng/ml en el caso del grupo que no presentaba sobreexpresión ($p = 0,006$).

TABLA 1

Correlación entre el estado de expresión de PSMA y los parámetros clínicos y el resultado de la enfermedad en 136 casos de cáncer de próstata tratados mediante prostatectomía radical

136 casos	71 PSMA (-)	65 PSMA (+)	Significación
PSA preoperatorio	9,10 +/- 5,91	18,28 +/- 17,70	$p = 0,006$
Grado tumoral de Gleason	5,92 +/- 1,20	6,33 +/- 1,21	$p = 0,040$
Índice de DNA	1,03 +/- 0,33	1,32 +/- 0,50	$p = 0,002$
Etapa tumoral III/IV (53 casos)	31/79 (39%)	33/57 (58%)	$p = 0,029$
Enfermedad recurrente	20/71 (28%)	37/65 (57%)	$p = 0,001$
Tiempo hasta recurrencia	43,75	34,78	$p = 0,001$

Análisis univariante de la recaída de la enfermedad. En análisis univariantes en los que se utilizó el seguimiento clínico disponible en los 136 casos, el estado de expresión de PSMA presentaba una correlación significativa con la recurrencia bioquímica de la enfermedad ($p = 0,001$) [Figura 2].

Análisis multivariante de la recurrencia de la enfermedad. En análisis multivariantes, el estado de tumor avanzado ($p = 0,018$) y la sobreexpresión de PSMA ($p = 0,002$) eran sistemas de predicción de la recurrencia bioquímica independientes.

En las prostatectomías insertadas en parafina, el 100% de los PCA mostraban un incremento del nivel de expresión de PSMA en comparación con elementos benignos adyacentes. En los tumores primarios, la expresión de PSMA creciente por IHC estaba en correlación con el grado del tumor ($p = 0,030$), la etapa ($p = 0,029$), la aneuploidía ($p = 0,010$) y la recurrencia bioquímica ($p = 0,001$). El nivel medio de PSA en suero de 18,28 ng/ml en el momento del diagnóstico en el caso de los tumores que sobreexpresaban PSMA era considerablemente mayor que el nivel medio de PSA en suero de 9,10 ng/ml en el caso del grupo que no presentaba sobreexpresión ($p = 0,006$). En análisis multivariantes, el estado del tumor ($p = 0,018$) y la sobreexpresión de PSMA ($p = 0,002$) eran sistemas de predicción de la recurrencia bioquímica independientes.

Western blotting

Se realizaron análisis *Western blot* después de electroforesis de extractos de tejido NP-40 en SDS-gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nylon. Las líneas incluían PSMA en especies de próstata humana normal/BPH, *in situ* y con adenocarcinoma primario. También se procesaron como controles unos extractos proteínicos del PSMA y la línea celular de tumor de próstata LNCaP cultivado. Las transferencias se bloquearon e incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-PSMA 7E11, seguido de lavado y detección utilizando IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano, o con sustrato quimioluminiscente.

Los análisis *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal 7E11 confirmaron que los especímenes de próstata neoplásica tenían mayores niveles de proteína de PSMA inmunodetectables. En estos análisis se comprobó que todos los tejidos clínicos de próstata tenían un cierto grado de proteína de PSMA inmunodetectable, pero en un subconjunto de PCA y el espécimen PIN eran evidentes unos niveles elevados.

Los resultados de los análisis *Western blot* confirmaban los resultados de la IHC, que mostraban un aumento del PSMA inmunotransferible asociado con el tumor en la enfermedad maligna que migraba con el peso molecular apropiado.

Ejemplo 2

*Perfiles de expresión de PSMA*5 *Perfiles de transcripción*

Los perfiles de transcripción se llevaron a cabo preparando sondas radiactivas de RNA total aislado de tejidos clínicos congelados rápidamente e hibridándolas en biochips de membrana de nylon que contenían DNA de aproximadamente 25.000 genes humanos. Los datos de expresión se obtuvieron de 25 especímenes diferentes de próstata normal y 30 carcinomas de próstata diferentes en diversas etapas. Para cada espécimen de paciente se establecieron valores de proteína en suero para el Antígeno Específico de la Próstata (PSA) como un indicador del estado de la enfermedad.

Los perfiles de transcripción de RNA aislado de 25 próstatas normales y 30 PCA de diferentes etapas en biochips de 25.000 genes revelaron que el RNAm de PSMA se expresaba de forma prominente en la próstata normal, con un aumento significativo en un subconjunto de carcinomas de próstata primarios (Figura 3). En este subconjunto de perfiles de casos no había una asociación clara entre el aumento de RNAm de PSMA del tumor de próstata y los niveles de base de referencia de proteína de PSA en suero. Aunque había una variabilidad considerable en la expresión de PSMA entre los especímenes clínicos, se observaba claramente un aumento evidente en un subconjunto de tumores de próstata en todas las etapas de la enfermedad en comparación con los niveles medios hallados en tejidos normales.

En los TP, la expresión de RNAm de PSMA se limitaba predominantemente a la próstata normal y maligna con niveles mayores de lo normal en un subconjunto de PCA.

25 *Aislamiento de RNA, síntesis de DNAc y RT-PCR en tiempo real*

Los perfiles de RNAm de PSMA en tejidos humanos se llevaron a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa, transcripción inversa, en tiempo real, utilizando el sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El diseño PSMA TaqMAN™ Probe se basó en el número de acceso M99487 del sitio web de NCBI. Este número de acceso se titula "Human prostate-specific membrane antigen (PSM) mRNA, complete cds" y está fechado el 01/08/1995. Las secuencias se eligieron por el dominio común hallado en todas las variantes notificadas para PSMA (PSM - largo y PSM' - corto). Los números de nucleótidos utilizados corresponden con el número de acceso arriba indicado:

- 35 (P1) Sonda: 5'-tggtcagcaccaccagatagcgc-3' (abarca los nucleótidos 1191-1215)
- (F1) Cebador de avance: 5'-CTATGATGCACAGAAGCTCCTAGAA-3'
- 40 (R1) Cebador inverso: 5'-TGTAGGGCACTTTGAGACTTCCT-3'

La prueba de calidad de los reactivos TaqMan™ diseñados se realizó utilizando un amplímero sintético y la demostración de un rango lineal de 7 log y una inclinación de 3,3, que pasó el análisis de curva estándar.

Se preparó RNA y DNAc a partir de especímenes clínicos humanos verificados por un patólogo y a partir de células cultivadas apropiadas para establecer 3 paneles de DNAc diferentes con los que evaluar tejidos, células y la expresión de PSMA específica de la enfermedad mediante análisis TaqMan™. Los paneles son: 1) Panel de Enumeración de Células y Órganos Humanos y 2) Panel de Tejido Prostático Humano. La composición de cada uno de los paneles se describe en las secciones de Resultados y Discusión.

Se aisló RNA total de tejidos y células de acuerdo con el protocolo del fabricante (Tel-Test Incorporation), pero con una extracción adicional con fenol:cloroformo. La calidad del RNA se evaluó utilizando un Agilent Bioanalyzer 2100 con el RNA 6000 Nano Labchip Kit. Se determinaron las proporciones de RNAr 28S/18S y únicamente los especímenes con proporciones superiores a 1 y sin ninguna degradación notable de RNA eran aceptables para la preparación del DNAc. Se obtuvieron 100 µl de DNAc a partir de 2 µg de RNA DNAsa utilizando el Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) tanto con hexámeros aleatorios como con oligo d(T) añadidos como cebadores. Todas las muestras tenían un control de "transcriptasa no inversa" para evaluar la contaminación de DNA residual. Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones secuenciales de reacción de transcriptasa inversa: 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 60 minutos, 95°C durante 5 minutos, y conservación a 4°C hasta el análisis de control de calidad. El control de calidad de DNAc consistía en la cuantificación de dos genes domésticos (18S y β2-microglobulina) utilizando TaqMan™ en el instrumento ABI 7700 con Universal PCR Master Mix y AmpliTaq Gold DNA (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: inicialmente 50°C durante 2 minutos; mantenimiento a 95°C durante 10 minutos; y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los criterios de aprobación para el DNAc fueron los siguientes: 18S (valor de control sin molde [NTC] Ct ≥ 35 y +RT ≤ 15) y β2-microglobulina (valor NTC Ct ≥ 35 y +RT ≤ 23). Para el almacenamiento a largo plazo, los DNAc se guardaron a -20°C y en formas alícuotas si se habían generado grandes volúmenes de DNAc.

Los tejidos utilizados para generar RNA/DNAc y las secciones congeladas para hibridación *in situ* y la captura por láser se obtuvieron de depósitos públicos e instituciones académicas de acuerdo con los diversos acuerdos institucionales que aseguran el consentimiento del paciente y la confidencialidad: BWH - Brigham and Women's Hospital; CHT - Collaborative Human Tissue Network; CLN - Clinomics, Inc.; JHH - Johns Hopkins Hospital; MPI - Millennium Pharmaceuticals, INC.; NDR - National Disease Research Inc.; PIT - University of Pittsburgh; y TEM - Temple University.

Después, los DNAc tisulares y celulares de calidad controlada se depositaron con una pipeta en placas de reacción de 96 pocillos. El control endógeno ($\beta 2$ -microglobulina) y los cebadores y las sondas específicos de PSMA se añadieron a los DNAc, se llevó a cabo el TaqMan™ y se realizó el análisis. Los datos de cada uno de los paneles se presentan en forma de gráficos de barras de los valores de expresión relativa derivados de los resultados del TaqMan™ tabulado. Debajo de los gráficos de barras se enumeran los valores Ct medios obtenidos para el PSMA y el gen doméstico de control endógeno, $\beta 2$ -microglobulina, las diferencias normalizadas y calibradas, y los cálculos de expresión relativa. Estos parámetros se definen de la siguiente manera: Ct = un término de TaqMan™ que representa el ciclo umbral, que es el punto en el que la amplificación por PCR cruza el umbral de la base de referencia; δCt = un término de TaqMan™ que indica el ciclo de PCR umbral para un gen diana normalizado a los valores Ct de un gen doméstico; $\delta \delta Ct$ = un término de TaqMan™ que representa el ciclo de PCR calibrado y normalizado para una diana; y Expresión = un término de TaqMan™ que indica la expresión relativa del gen diana obtenida calculando el valor $2^{-\delta \delta Ct}$.

Se creó un Panel de DNAc de Enumeración de Células y Órganos Humanos consistente en DNAc de poblaciones celulares aisladas, líneas celulares cultivadas y depósitos de 3 especímenes, cada uno de ellos de una variedad de tejidos. Los especímenes de este panel incluían: aorta enferma, vena, células cultivadas de músculos lisos coronarios, células endoteliales cultivadas de vena umbilical humana (HUVEC), hemangioma, corazón, corazón enfermo (insuficiencia cardíaca congestiva), riñón, músculo esquelético, tejido adiposo, páncreas, osteoblastos primarios cultivados, osteoclastos diferenciados cultivados, piel, médula espinal, corteza cerebral, hipotálamo, nervio, ganglios de la raíz dorsal, mama, tumor de mama, ovario, tumor ovárico, próstata, tumor prostático, glándula salival, colon, tumor de colon, pulmón, tumor pulmonar, pulmón con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, colon con enfermedad intestinal inflamatoria, hígado, hígado fibrótico, bazo, amígdala, ganglio linfático, intestino delgado, macrófagos, sinovio, células mononucleares de médula ósea, monocitos de sangre periférica activados, neutrófilos, megacariocitos, células eritroides y un control positivo consistente en depósitos de DNAc de células RAJI, testículo, placenta y cerebro. Este panel de DNAc se analizó en cuanto a la expresión de PSMA utilizando reactivos TaqMan™ que detectan la expresión tanto del dominio externo como de formas citoplásmicas de PSMA. Los depósitos de especímenes de tumor de próstata presentaban la mayor expresión de PSMA, con aumentos relativos de más de 37 veces la expresión observada en los depósitos de muestras de próstata normal no cancerosa y de BPH. Los siguientes tejidos no prostáticos que mostraban la mayor expresión se encontraron en el sistema nervioso central con el siguiente orden de rango: corteza > hipotálamo > ganglios de la raíz dorsal > médula espinal > nervio. Otros tejidos con niveles de RNAm mensurables, pero bajos, fueron: glándula salival, fibrosis de hígado, hígado, intestino delgado, HUVEC, tumor pulmonar, mama, riñón y hemangioma (Tabla 2 y Figura 4).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 314 272 T3

TABLA 2

Panel de Enumeración de Células y Órganos Humanos

Tipo de tejido	Ct PSMA media	Ct β 2 media	$\delta\delta$ Ct	Expresión
Arteria normal	31,9	21,9	9,18	1,724
Aorta enferma	35,26	22,48	11,96	0
Vena normal	39,02	20,72	17,49	0
SMC coronarias	40	21,36	17,83	0
HUVEC	30,59	21,99	8,78	4,5497
Hemangioma	30,77	20,43	9,53	1,3526
Corazón normal	34,62	20,92	12,89	0,1322
Corazón CHF	36,06	21,26	13,98	0
Riñón	30,12	20,76	8,54	2,6773
Músculo esquelético	36,99	22,84	13,34	0
Adiposo normal	38,97	21,96	16,19	0
Páncreas	37,23	22,88	13,54	0
Osteoblastos primarios	40	19,95	19,24	0
Osteoclastos (dif.)	40	17,91	21,27	0
Piel normal	36,77	23,37	12,59	0
Médula espinal normal	28,26	21,56	5,89	16,8629
Corteza cerebral normal	25,74	22,88	2,05	241,4841
Hipotálamo cerebral normal	27,72	22,98	3,92	66,0636

ES 2 314 272 T3

	Nervio	30,04	22,01	7,21	6,7542
5	DRG (ganglio de la raíz dorsal)	28,02	21,93	5,27	25,9162
	Mama normal	30,47	21,75	7,89	4,2011
10	Tumor de mama	31,8	21,43	9,54	1,3387
	Ovario normal	33,42	20,68	11,93	0,2563
	Tumor ovárico	30,98	19,2	10,96	0,5038
15	Próstata normal	26,07	19,71	5,55	21,3444
	Tumor prostático	21,64	20,46	0,37	776,4689
	Glándulas salivales	25,56	20,07	4,67	39,2817
20	Colon normal	30,25	19,31	10,12	0,8986
	Tumor de colon	32,23	21,67	9,74	1,1654
	Pulmón de colon	32,71	18,63	13,27	0,1016
25	Tumor pulmonar	29,78	20,72	8,24	3,2962
	Pulmón COPD	32,38	18,83	12,73	0,1467
	Colon IBD	32,98	18,02	14,15	0,055
30	Hígado normal	27,39	20,48	6,09	14,6293
	Hígado fibrosis	27,36	21,24	5,3	25,3829
35	Bazo normal	33,15	19,06	13,28	0,1009
	Amígdala normal	32,74	18,4	13,53	0,0848
	Ganglio linfático normal	33,2	20,27	12,12	0,2247
40	Intestino delgado normal	28,27	20,7	6,75	9,2585
45	Macrófagos	40	17,45	21,74	0
	Sinovio	40	20,56	18,63	0
50	BM-MNC	40	19,16	20,03	0
	PBMC activados	40	17,89	21,3	0
	Neutrófilos	38	18,16	19,03	0
55	Megacariocitos	38,19	19,13	18,25	0
	Eritroides	40	21,31	17,88	0

Leyenda Tabla 2: Datos TaqMan™ tabulados correspondientes al Panel de Enumeración de Células y Órganos Humanos en el que se enumeran los valores Ct medios obtenidos para PSMA y el gen doméstico, $\beta 2$ -microglobulina, las diferencias normalizadas y calibradas, y los cálculos de expresión relativa. Los diferentes parámetros enumerados se definen de la siguiente manera: Ct = un término de TaqMan™ que representa el ciclo umbral que es el punto en el que la amplificación por PCR cruza el umbral de base de referencia; δCt = un término de TaqMan™ que indica el ciclo de PCR umbral para un gen diana normalizado a los valores Ct de un gen doméstico; $\delta \delta Ct$ = un término de TaqMan™ que representa el ciclo de PCR calibrado y normalizado para una diana; y Expresión = un término de TaqMan™ que indica la expresión relativa del gen diana obtenida calculando el valor $2^{-\delta \delta Ct}$.

ES 2 314 272 T3

El Panel de DNAC de Tejido de Próstata Humana consiste en DNAC derivado de: tejidos de próstata normal y BPH (5 muestras), tumores de próstata primarios (6 muestras con clasificaciones de Gleason [GS] 5-9), metástasis de próstata en hígado (6 muestras), metástasis de próstata en ganglio linfático (4 muestras), hígado normal (3 muestras) y ganglios linfáticos normales (2 muestras). Como se muestra en la Figura 5 y en la Tabla 3, un subconjunto de tumores primarios y metástasis mostraban una mayor expresión de PSMA en comparación con los tejidos de próstata y BPH, hígado o ganglio linfático normales. En hígados y ganglios linfáticos normales se detectaron niveles muy bajos de transcripciones de PSMA y ninguna transcripción de PSMA, respectivamente. En los especímenes malignos que presentaban una expresión mayor que los valores medios de tejido normal/BPH, el grado de aumento de PSMA variaba entre 1,1 y 20 veces dichos valores. La cuantificación de RNAm de PSMA por TaqMan™ RT-PCR mostraba el mismo patrón de expresión que el observado en los experimentos de transcripción, con un aumento de PSMA en un subconjunto de tumores, una gran variabilidad en la sobreexpresión.

TABLA 3

Análisis TaqMan™ de PSMA en especímenes clínicos de próstata

Tipo de tejido	Ct PSMA medio	Ct β 2 medio	$\delta\delta$ Ct	Expresión
N/BPH	22,8	18,3	4,5	44,19
N/BPH	26,39	22,47	3,92	66,29
N/BPH	28,98	22,02	6,97	7,98
N/BPH	26,54	23,02	3,52	87,47
N/BPH	24,12	21,15	2,97	127,63
PCA: GS5	22,94	21,26	1,68	312,08
PCA: GS5	21,86	19,26	2,61	164,37
PCA: GS7	23,41	21,77	1,64	320,86
PCA: GS7	25,62	21,99	3,63	80,77
PCA: GS9	24,95	21,44	3,5	88,08
PCA: GS9	27,1	20,81	6,29	12,74
Met. hígado	27,59	23,86	3,73	75,36
Met. hígado	26,58	23,37	3,21	108,07
Met. hígado	25,89	23,62	2,27	208,05
Met. hígado	25,22	24,42	0,79	576,34
Met. hígado	32,77	23,45	9,31	1,57
Met. hígado	26,18	22,63	3,56	84,79
Met. ganglio	27,97	23,87	4,1	58,31
Met. ganglio	24,59	22,45	2,14	226,88
Met. ganglio	24,98	22,29	2,7	153,89
Met. ganglio	23,04	23,46	-0,43	1342,57
Hígado N	27,09	22,04	5,06	29,98
Hígado N	28,43	22,95	5,48	22,41
Hígado N	26,52	21,97	4,55	42,54
Ganglio N	36,49	21,97	4,55	42,54
Ganglio N	36,34	19,73	16,62	0,00

Leyenda Tabla 3: Datos TaqMan™ tabulados correspondientes a tejidos de próstata y tejidos normales control, se enumeran los valores Ct medios obtenidos para PSMA y el gen doméstico, β 2-microglobulina, las diferencias normalizadas y calibradas (δ Ct y $\delta\delta$ Ct, respectivamente), y los cálculos de expresión relativa (el valor $2^{-\delta\delta$ Ct). Los tumores primarios tienen las clasificaciones de Gleason (GS) indicadas. La RT-PCR TaqMan™ confirmó una expresión mayor de RNAm de PSMA en un subconjunto de PCA y metástasis. En otros órganos no se observó ninguna expresión de PSMA o sólo se vio una baja expresión de PSMA.

Microscopía de disección por láser con análisis TaqMan™ de poblaciones celulares aisladas

Se separaron secciones de ocho μ m de próstata normal y carcinoma de próstata congelados en elementos epiteliales y estromales utilizando un instrumento de microdisección por captura láser Pix Cell™ (Arcturus Engineering Inc. Mountain View, CA). Se tomaron típicamente de 1.000 a 3.000 disparos por tapón y se utilizaron tapones que contenían células aisladas para sellar tubos Eppendorf que contenían 100 μ l de reactivo de aislamiento de RNA. Se preparó DNAC y se realizó el TaqMan™ tal como se describe más arriba.

El enriquecimiento por microdisección mediante captura láser (LCM) de poblaciones celulares epiteliales y estromales confirmó que la expresión de PSMA se limitaba predominantemente al epitelio de los tejidos de próstata no cancerosa, con un notable aumento en el epitelio maligno (Figura 6).

El enriquecimiento por LCM de estroma y epitelio de próstata indicó que el RNAm de PSMA se expresa de forma preferente en el epitelio y que dicha expresión aumenta en caso de una transformación maligna.

Hibridación in situ

La hibridación *in situ* (ISH) se realizó utilizando secciones de tejido congeladas, fijadas en formalina, acetiladas, deshidratadas y deterioradas, con ribosondas marcadas con 35 S. Se generaron sondas de ISH T3 sentido y T7 antisentido específicas del gen mediante PCR para el dominio encontrado en todas las variantes de PSMA notificadas y que incluye el dominio de amplificación de TaqMan™. Las sondas se marcaron mediante transcripción inversa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, en presencia de 35 S-UTP, ATP no marcado, GTP, CTP y de 200 a 500 ng de DNA molde, con purificación en columnas MicroSpin G-25. Se hibridaron portaobjetos con un 50% de formamida, Tris-HCl 10 mM, 0,2 mg/ml RNAt de levadura, 1X Denhardt's, 10% sulfato de dextrano, NaCl 600 mM, 0,25% SDS y 2×10^6 cpm/ μ l de ribosonda. La hibridación se llevó a cabo a 55°C durante una noche y después se realizó el lavado de los portaobjetos secuencialmente con rigurosidad baja y alta con 2X SSC y 0,2X SCC a 60°C, y luego con 20 μ g/ml de RNasa A, 37°C. Los portaobjetos hibridados lavados se deshidrataron, se sumergieron en la emulsión fotográfica NBT2 (VWR), se incubaron durante 10 a 14 días a 4°C, se revelaron con Kodak Dektol Developer and Fixer y se sometieron a tinción de contraste con hematoxilina. Los resultados se presentan como el rango de intensidades de hibridación estimado según la cantidad de granos plateados sobre las células epiteliales y el porcentaje aproximado de células positivas.

Se realizó una hibridación *in situ* de una cantidad limitada de secciones congeladas de tejidos de próstata normal, PIN (neoplasia intraepitelial prostática), cánceres de próstata primarios y lesiones metastásicas. El RNAm de PSMA se expresaba de forma preferente en el epitelio de próstata normal, benigna y maligna y se correlacionó con las mediciones de IHC de la proteína de PSMA en las mismas muestras (Figura 7). Había una heterogeneidad considerable de la expresión de RNAm de PSMA, caracterizada por una variabilidad interglandular e intraglandular de la intensidad de señal y del porcentaje de células positivas (Tabla 4). Una señal ISH de PSMA fuerte también era una característica de la mayoría de las metástasis óseas. Las metástasis de hígado mostraron una hibridación de RNAm de PSMA más heterogénea. En la Tabla 5 se enumeran las clasificaciones de Gleason de los tumores sometidos a análisis por ISH y muestra que los tumores de grado mayor tienden a tener una probabilidad mayor de presentar áreas intensas de expresión de RNAm de PSMA. Seis de los carcinomas primarios presentaban poblaciones de células con una señal de ISH fuerte para el PSMA (2 tumores - GS9, 3 tumores - GS7 y 1 tumor - GS5), 4 tumores mostraban una hibridación moderada (1 tumor - GS7, 1 tumor - GS6 y 2 tumores GS5) y un tumor GS5 no contenía ninguna célula marcada.

TABLA 4

Señal de hibridación in situ de PSMA en tejidos prostáticos

Normal/BPH	18/19 especímenes positivos, en su mayoría de débiles a moderados, con gran variabilidad interglandular e intraglandular
	6/19 [+++] (< 50% células marcadas) 12/19 [++ a +] (< 75% células marcadas) 1/19 [-]
PIN	5/5 lesiones <i>in situ</i> muestran una hibridación de moderada a fuerte
	3/5 [+++] (> 75% células marcadas) 2/5 [++] (< 75% células marcadas)
Adenocarcinoma	10/11 tumores muestran señal de moderada a fuerte
	7/12 [+++] (> 50% células marcadas) 3/12 [++ a +] (< 75% marcadas) 1/12 [-]
Metástasis en ganglios linfáticos	7/8 metástasis muestran hibridación de moderada a alta
	7/8 [+++ a ++] (> 50% células marcadas) 1/8 [+] (< 20% células marcadas)
Metástasis de hígado	4/7 metástasis muestran una señal de débil a alta
	3/7 [+++ a +] (>50% células marcadas) 1/7 [++] (<10% células marcadas) 3/7 [-]
Metástasis ósea	4/5 metástasis muestran células tumorales positivas con una señal de intensidad variable
	2/5 [+++ a +] (>75% células marcadas) 2/5 [++] (<20% células marcadas) 1/5 [-]

Leyenda Tabla 4: Resumen de hibridación *in situ* para RNAm de PSMA en un panel de próstata normal/BPH, PIN, carcinomas primarios de próstata, y metástasis de hígado y huesos. Se indica la intensidad de hibridación, con clasificaciones de 3+ a 1+, y el porcentaje de células positivas.

TABLA 5

Lista de las etapas de Gleason de PCA con su clasificación de hibridación de RNAm de PSMA

Etapas de Gleason	Tejido	Diagnóstico	Resultados de ISH
			Tumor
GS5	Próstata	Adenocarcinoma/PIN	(+++)
GS5	Próstata	Adenocarcinoma	(-)
GS5	Próstata	Adenocarcinoma	(++)
GS5	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)
GS6	Próstata	Adenocarcinoma	(++)
GS7	Próstata	Adenocarcinoma	(++)
GS7	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)
GS7	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)
GS7	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)
GS9	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)
GS9	Próstata	Adenocarcinoma	(+++)

Mayor intensidad de señal	GS9	GS7	GS5 y GS6
(+++)	3 tumores	3 tumores	1 tumor
(++)		1 tumor	3 tumores
(-)			1 tumor

Leyenda Tabla 5: Asociación de la clasificación de Gleason con la intensidad de hibridación *in situ* de RNAm de PSMA. Se indica la intensidad de hibridación, con clasificaciones de 3+ a 1+ y el porcentaje de células positivas.

La hibridación *in situ* demostró un aumento de la expresión específica epitelial de RNAm de PSMA en PCA primarios y metástasis.

Estos resultados parecen indicar que la expresión de PSMA está limitada en gran medida a los tejidos de próstata normal y PCA y, por primera vez, que la sobreexpresión de proteína de PSMA inmunorreactiva en tumores primarios predice independientemente la recurrencia bioquímica de la enfermedad. La validación del PSMA como diana terapéutica en PCA ha sido acompañada recientemente por los primeros resultados de ensayos clínicos en los que se ha utilizado el anticuerpo anti-PSMA radioconjugado, huJ591, que parecen demostrar reducciones significativas en los niveles de PSA en suero y un encogimiento de la masa tumoral de tejidos blandos.

Un descubrimiento consistió en que la sobreexpresión de proteína de PSMA determinada mediante inmunoquímica en especímenes de prostatectomía presentaba una correlación significativa con niveles elevados de PSA en suero preoperatorios, un alto grado del tumor, el contenido de DNA no diploide y una etapa tumoral avanzada, y predecía de forma independiente la recaída bioquímica de la enfermedad. Esto parece ser el primer intento de relacionar los niveles de PSMA medidos en especímenes de prostatectomía primaria con el resultado del cáncer de próstata, aunque una expresión de PSMA elevada ha sido asociada con un mayor grado tumoral y una enfermedad metastásica. En comparación con los otros factores de pronóstico posibles arriba descritos, la detección de los niveles de PSMA en el tumor primario tiene la ventaja de estar relacionada con la selección específica de una terapia con anti-PSMA

como diana. En este estudio se ha utilizado el anticuerpo anti-PSMA 7E11 para la IHC basada en parafina. Este anticuerpo fue el primer anticuerpo de PSMA desarrollado y reconoce el dominio interno de la molécula de PSMA. Posteriormente se desarrolló una serie de anticuerpos que se unían al dominio externo de la molécula de PSMA. El fundamento para el desarrollo de anticuerpos de PSMA que reconocen el dominio externo consistía en la anticipación de una terapia selectiva para el cáncer de próstata y la conjugación del anticuerpo selectivo con radioisótopos, toxinas y quimioterapia.

El anticuerpo 7E11 se ha utilizado para desarrollar un radioconjugado para el procesamiento de imágenes diagnósticas. Se utiliza la inmunogammagrafía ^{111}In Capromab Pendetide (Prosta-Scint[®]) para la gestión del cáncer de próstata, pero está limitada por la dependencia del anticuerpo 7E11 de la exposición del dominio interno del PSMA, que no tendrá lugar en células tumorales desprovistas de apoptosis o necrosis. Recientemente se han presentado anticuerpos del dominio externo del PSMA, como el anticuerpo J-591, para el tratamiento del HRPC, y también son prometedores como reactivos para el procesamiento de imágenes.

También se llevó a cabo una evaluación de la regulación de la expresión de RNAm de PSMA utilizando perfiles de transcripción con biochips de DNAC de más de 50 especímenes clínicos, cuantificación por RT-PCR en tiempo real con TaqMan[™] e hibridación *in situ*. Se comprobó que el RNAm de PSMA es expresado en todos los especímenes de próstata normales y malignos, con un aumento significativo en un subconjunto de tumores primarios y metástasis. La LCM y estudios *in situ* confirmaron que el PSMA es expresado de forma preferente por el epitelio de próstata frente al estroma y, con frecuencia, esta expresión aumenta en células malignas. Estos descubrimientos están respaldados por un reciente estudio de perfiles de transcripción, que comprobó que una expresión elevada de RNAm de PSMA sólo era inferior a la proteasa de tipo hepsina en su asociación con un cáncer de próstata de alto grado. En conjunto, estas técnicas moleculares diversas no sólo demuestran que el PSMA está presente en la mayoría de los especímenes de próstata, si no en todos ellos, y muestra un aumento a nivel de RNA y proteína en un subconjunto de PCA y lesiones metastásicas, sino que estos datos también sirven para validar el PSMA como una diana terapéutica que puede beneficiar a una cantidad considerable de pacientes de cáncer de próstata.

Otras realizaciones

Se ha de entender que, aunque la invención se ha descrito en relación con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción está prevista para ilustrar y no para limitar el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar si un sujeto presenta un riesgo de recurrencia del cáncer de próstata **caracterizado** porque incluye la determinación de los niveles de expresión de PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) en una muestra obtenida de una lesión primaria de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata, donde una sobreexpresión de PSMA en relación con un patrón de referencia, que es un nivel de expresión de PSMA estadísticamente significativo que distingue los sujetos que tienen recurrencia y los sujetos que no la tienen, indica un riesgo de recurrencia del cáncer.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el patrón de referencia consiste en los niveles de expresión de PSMA en un sujeto de control al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata y que no presenta recurrencia de dicho cáncer de próstata.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra consiste en una muestra de biopsia o una muestra obtenida de una prostatectomía parcial o radical del sujeto.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el riesgo de recurrencia se determina en base al diagnóstico de cáncer de próstata, o después de que al sujeto se le haya diagnosticado cáncer de próstata, o después de que el sujeto haya sido tratado con un tratamiento anticanceroso que puede consistir en una prostatectomía radical o parcial.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los niveles de expresión de PSMA se determinan determinando los niveles de proteína de PSMA en una muestra, preferentemente mediante un método seleccionado entre un ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un *Western blot* o un método inmunohistoquímico, o determinando los niveles de ácido nucleico de PSMA en una muestra, preferentemente mediante un método seleccionado entre *Northern blotting*, RT-PCR y métodos basados en biochips.
- 30 6. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque a un sujeto que no presenta un nivel de expresión elevado se le asigna un valor de un 40% o menos de riesgo de recurrencia, preferentemente un valor de un 30% o menos de riesgo de recurrencia.

35

40

45

50

55

60

65

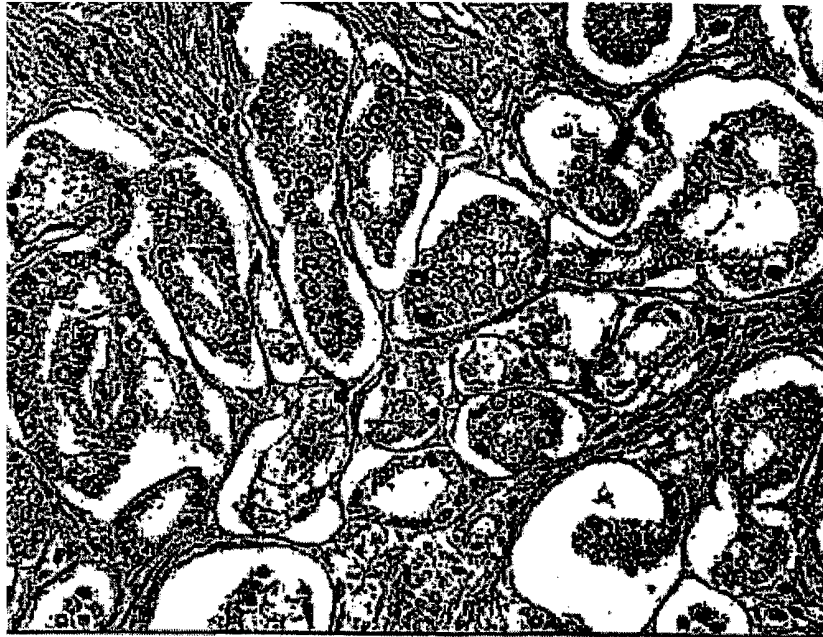


Figura 1A

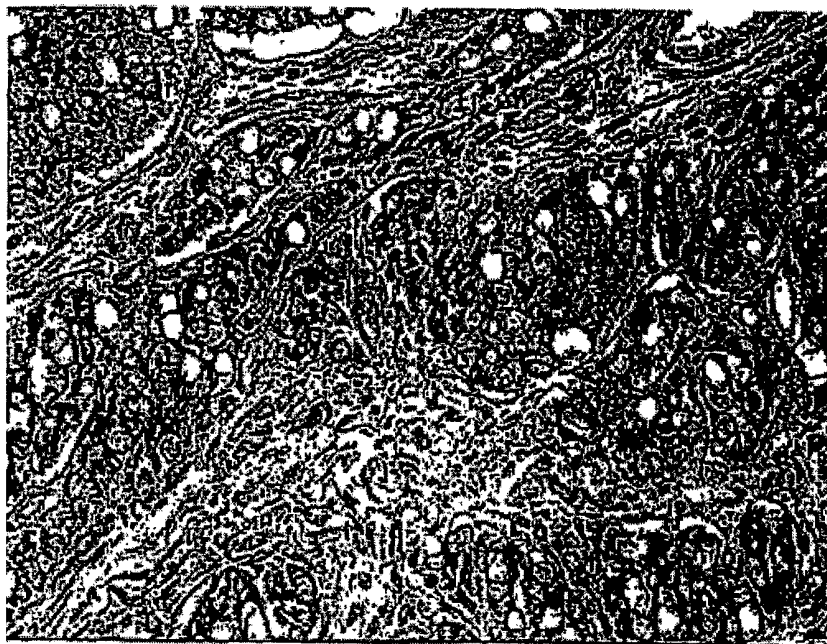


Figura 1B

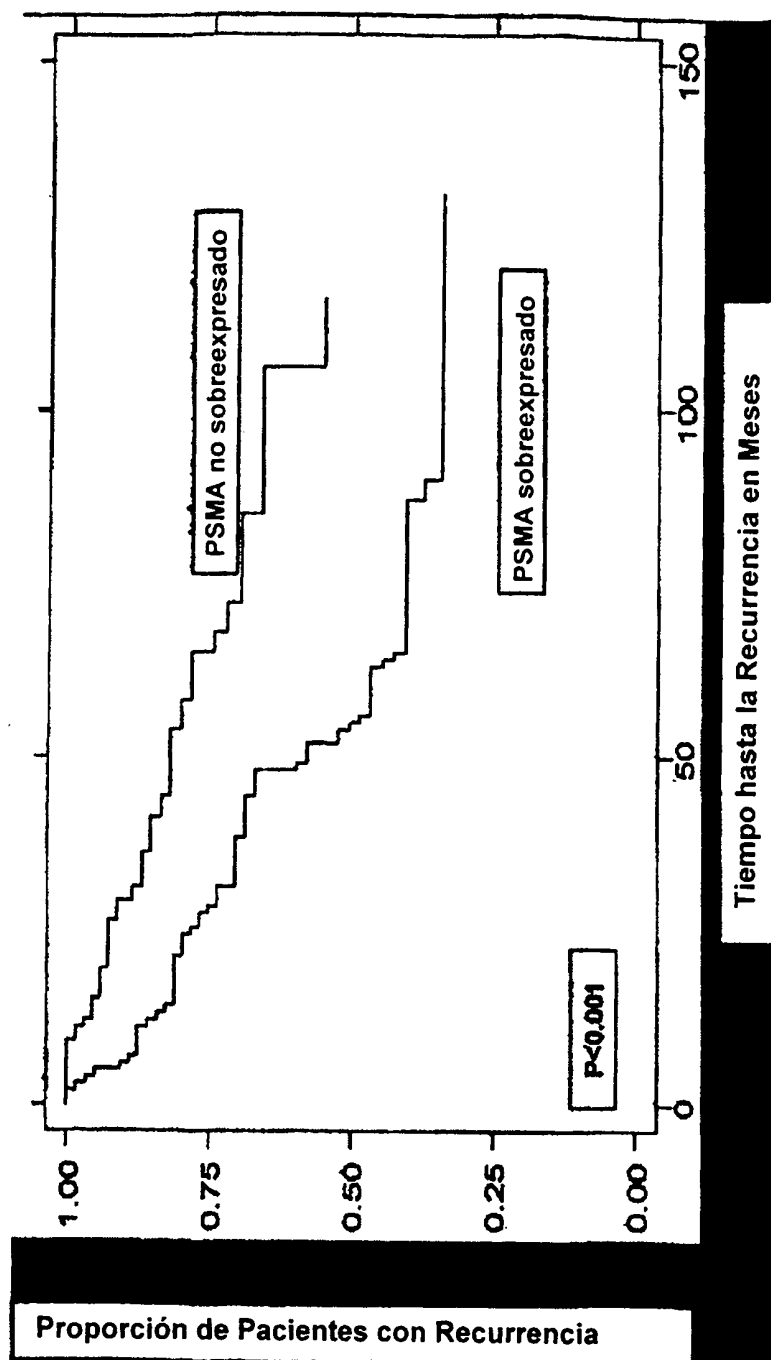


Figura 2

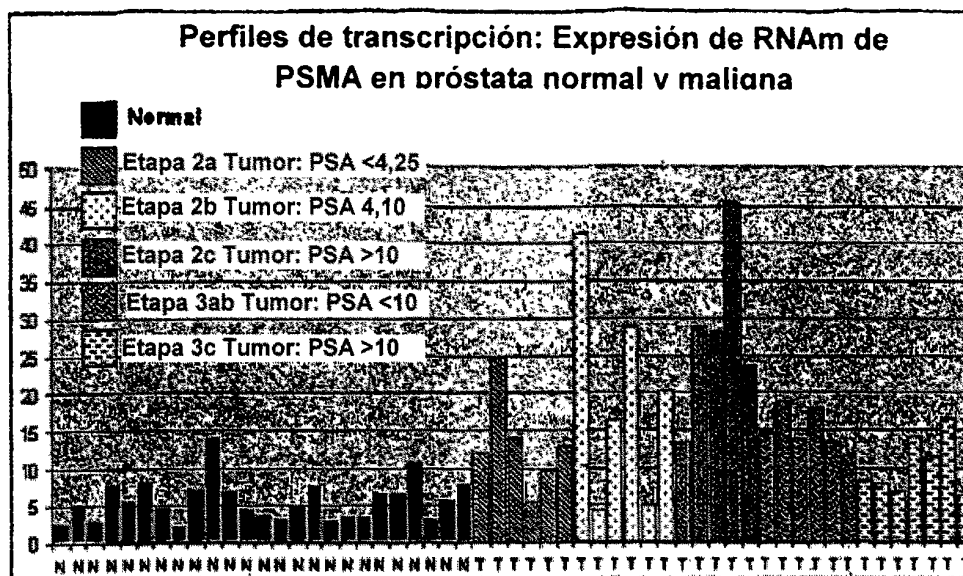


Figura 3

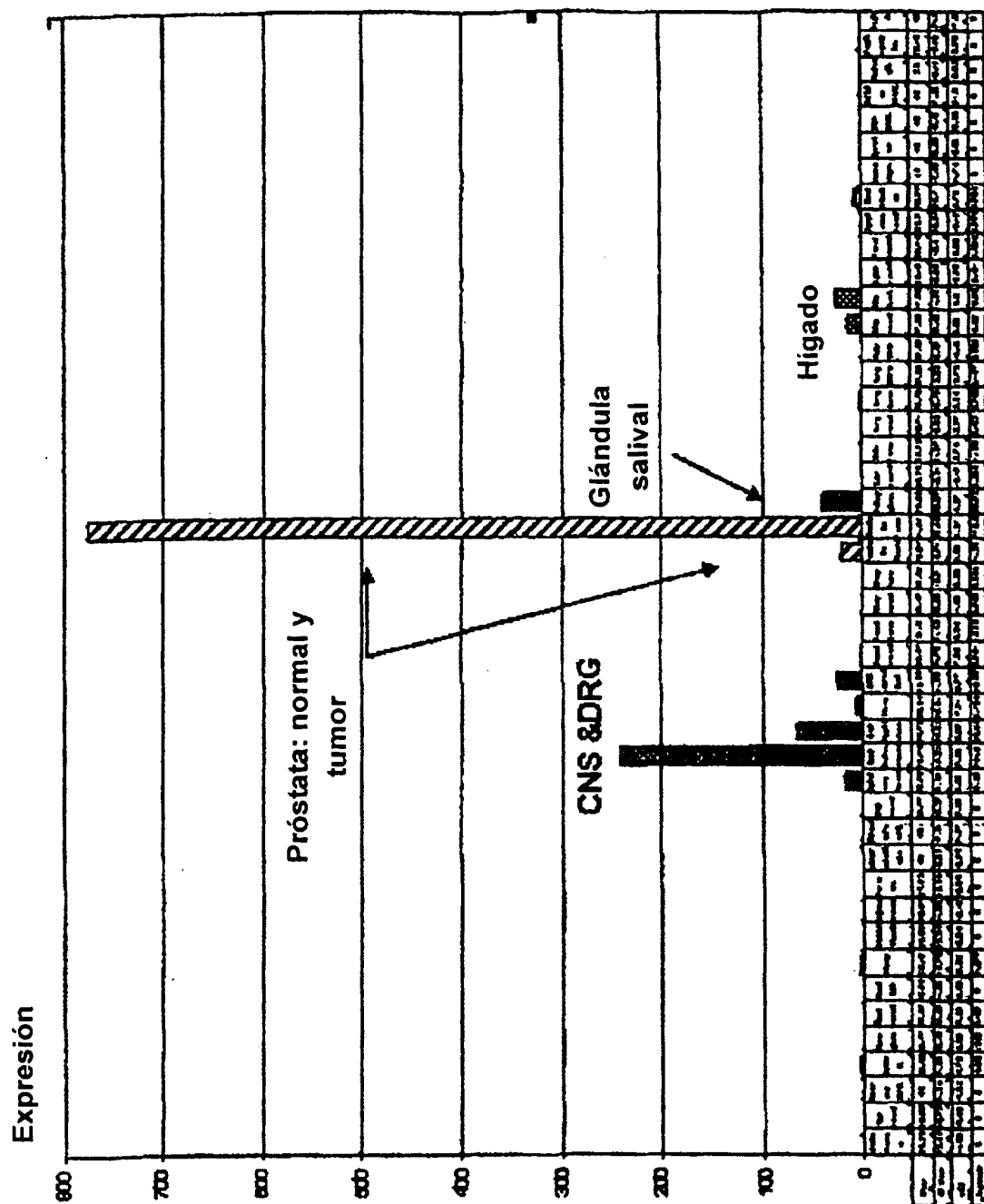


Figura 4

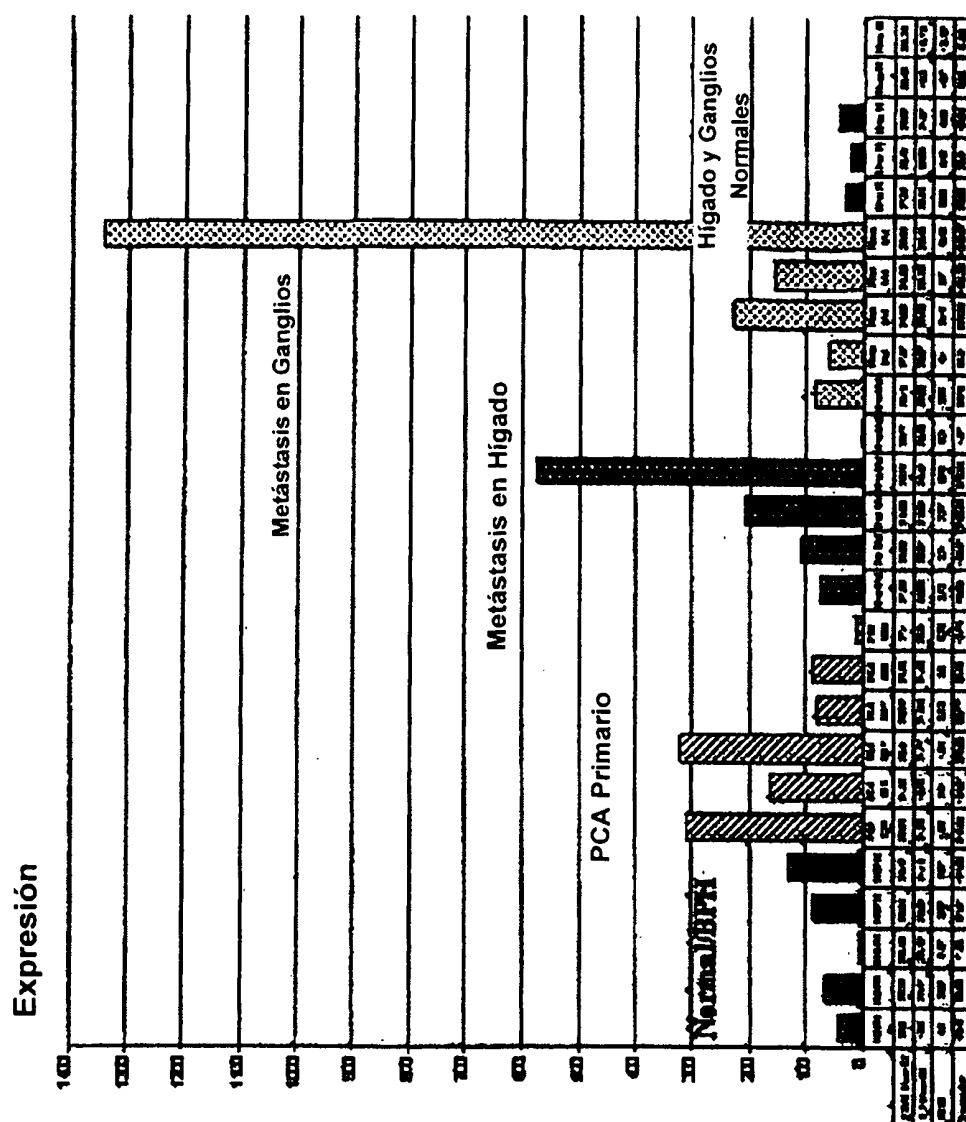


Figura 5

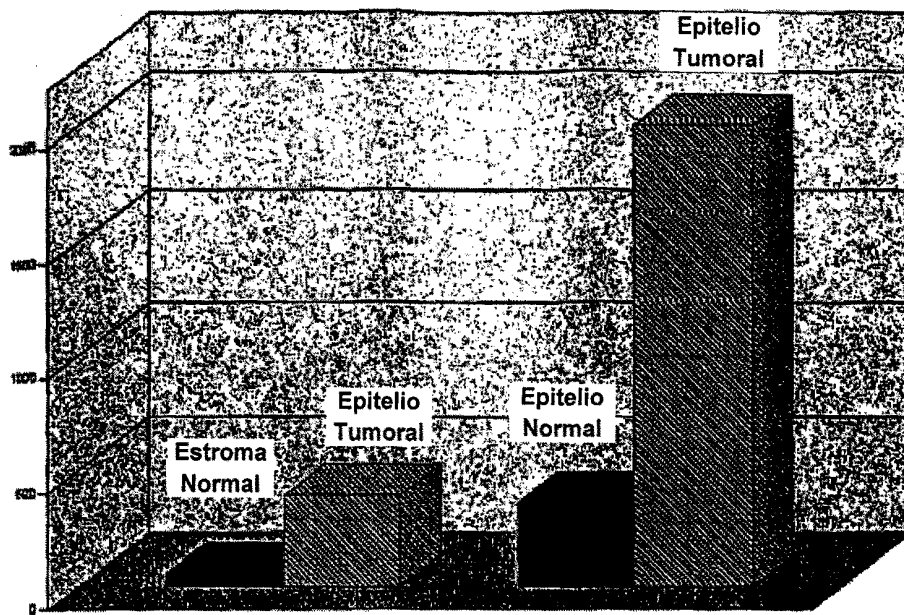


Figura 6

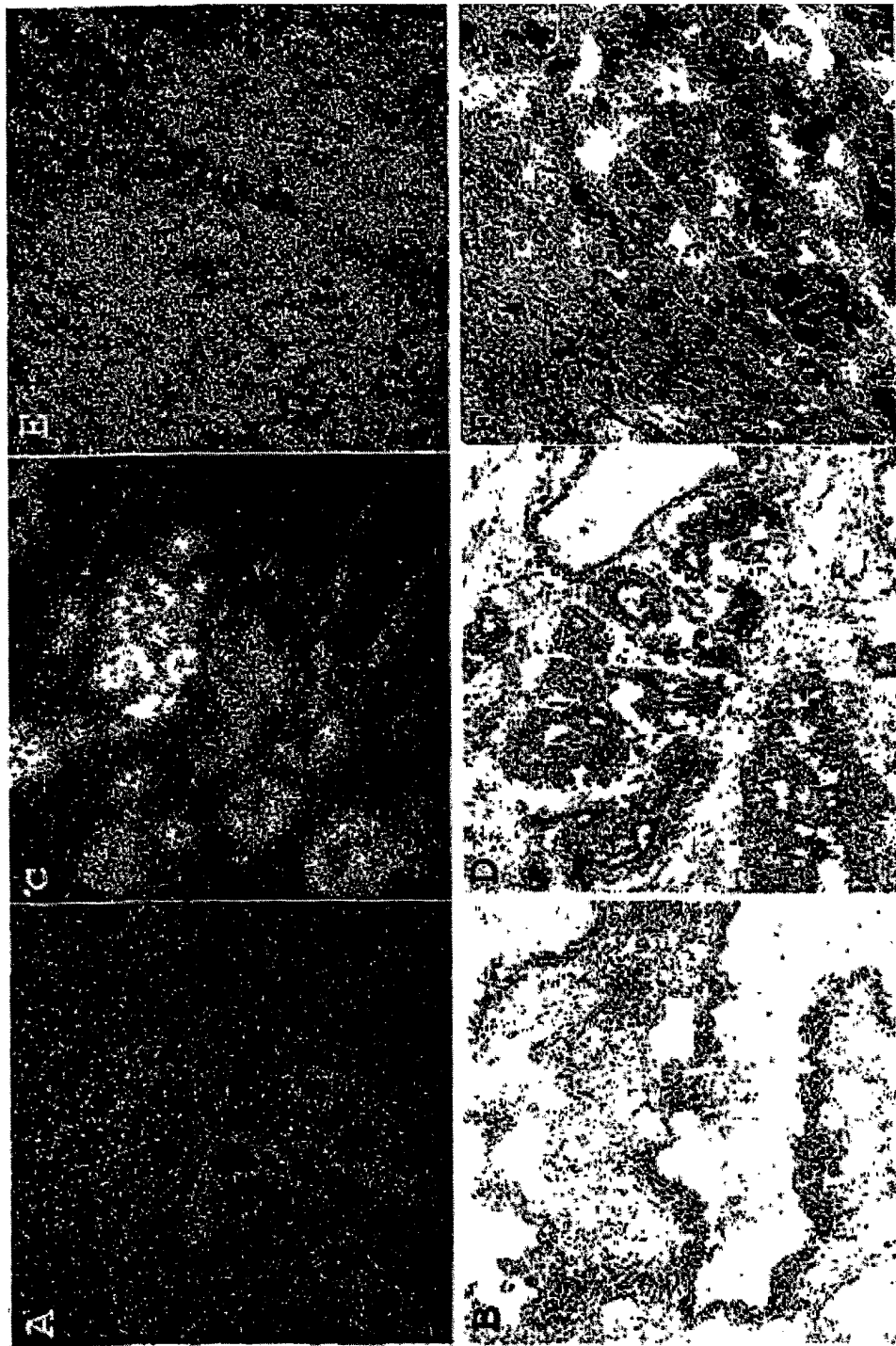


Figura 7