

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 300 176**

21 Número de solicitud: 200600348

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **15.02.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2008**

Fecha de la concesión: **08.04.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
FUNDACIÓ PRIVADA CLÍNIC PER A LA RECERCA
BIOMÉDICA**

72 Inventor/es: **Thomson Okatsu, Timothy;
Bermudo Gascón, Raquel;
Ramírez Ortiz, Ángel;
Abía, David;
Martínez Alonso, Carlos;
Fernández Ruiz, Pedro Luis;
Ferrer Fábrega, Berta y
Campo Güerri, Elías**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, kit para implementar el método.**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, kit para implementar el método.

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata que comprende el análisis *in vitro* de la sobreexpresión o infraexpresión de combinaciones de genes capaces de discriminar con alta significación estadística las muestras de próstata tumoral de las muestras de próstata no tumoral. En particular, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico molecular del cáncer de próstata capaz de llevar a cabo la detección mencionada anteriormente.

ES 2 300 176 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, kit para implementar el método.

5 Campo de la invención

La presente invención se engloba dentro del sector de la biotecnología y específicamente dentro del campo de los métodos de diagnóstico del cáncer de próstata. Así, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata que comprende el análisis *in vitro* de la sobreexpresión o infraexpresión de combinaciones de genes capaces de discriminar con alta significación estadística las muestras de próstata tumoral de las muestras de próstata no tumoral. En particular, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico molecular del cáncer de próstata capaz de llevar a cabo la detección mencionada anteriormente.

15 Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata (CP) es una de las neoplasias de mayor morbimortalidad en los países industrializados y por tanto de gran impacto socio-económico [1], por lo que es objeto de intenso estudio. A pesar de este esfuerzo, y a diferencia de otros tipos de neoplasia, son comparativamente escasos los conocimientos firmes sobre los factores moleculares que determinan su iniciación, su mantenimiento y su progresión maligna. Por otro lado, la característica más singular del CP, su alta dependencia de andrógenos, puede proporcionar importantes claves para comprender algunos de los mecanismos moleculares que subyacen a la biología de este tumor.

Como en otros tumores, existe una predisposición genética a padecer CP, por lo que múltiples estudios han buscado la vinculación entre loci genéticos y la predisposición a padecer CP. Estos estudios han proporcionado una multiplicidad y heterogeneidad de loci genéticos [2]. Ninguno de estos loci y genes explica más que una pequeña proporción de agregaciones familiares de CP y, lo que es más llamativo, ninguno ha sido confirmado en estudios de replicación independientes. Esto se podría explicar por la gran heterogeneidad genética del CP, de modo que varios genes altamente penetrantes pueden estar asociados a diferentes pedigrís de CP familiar, así como por la alta frecuencia de fenocopias, es decir, CP esporádicos incluidos en los estudios de CP familiar, por ser sus características indistinguibles. Alternativamente, es posible que ningún gen esté asociado singularmente a la predisposición al CP, sino que habría una participación de múltiples genes, cada uno de ellos con una penetrancia relativamente baja. Una característica adicional del CP familiar es que no se asocia significativamente con otros tipos de tumores, con la posible excepción de cáncer de mama y tumores del SNC (Sistema Nervioso Central) en agregaciones familiares concretas, lo que indica que el gen o genes implicados no participan en síndromes neoplásicos generalizados, sino que parecen ser “organoespecíficos”. Sin embargo, se han estudiado en CP alteraciones de genes frecuentemente asociados a otras neoplasias, como TP53, BRCA1, PTEN o genes de reparación afectados, p. ej., en HNPCC (cáncer de colon hereditario sin poliposis), encontrándose escasas alteraciones o, como en el caso de TP53 o PTEN, mutaciones que aparecen sólo muy tardíamente en la evolución de los tumores.

El que los genes de predisposición al CP encontrados hasta ahora se encuentren alterados en muy pocos individuos y familias, impide una aproximación preventiva eficaz al problema. Una cuestión relacionada, aunque independiente, es la detección precoz de CP. La determinación de los niveles séricos de PSA (antígeno prostático específico) en sus diferentes formas sigue siendo la referencia más relevante para la detección y el seguimiento clínico del CP. Las dudas surgen cuando se requiere un diagnóstico diferencial, o en casos de CP sin niveles elevados de PSA. Esta proteína es un marcador tisular y de señalización androgénica y no un marcador de malignidad propiamente dicho, por lo que, en sentido estricto, sus niveles séricos son únicamente indicativos de la masa total de glándulas epiteliales prostáticas con capacidad de producirla y secretarla. Por tanto, se observan niveles elevados de PSA no sólo en CP, sino también en HBP (hiperplasia benigna de próstata) y otros procesos prostáticos benignos, y, en sentido contrario, su producción se puede ver comprometida en CP muy indiferenciados, en que las células epiteliales prostáticas neoplásicas pierden la capacidad de expresión de PSA.

Por todo ello, muchos laboratorios buscan nuevas moléculas que ofrezcan mayor especificidad y sensibilidad que el PSA como marcador de detección y seguimiento del CP. La aplicación de técnicas de alto rendimiento (High Throughput, HT) al estudio del CP ha permitido la identificación de moléculas previamente no asociadas a CP y que se han confirmado como excelentes marcadores de malignidad, con una capacidad discriminante y una especificidad muy superiores al PSA cuando se detectan en tejidos [3]. Entre estos marcadores destacan la alpha-metilacil-CoA racemasa (AMACR), la hepsina (HPN) y la sintasa de ácidos grasos (FASN), que se expresan a altos niveles en la gran mayoría de casos de CP, mientras que, a diferencia del PSA, sus niveles de expresión en epitelio prostático normal son mínimos. Por otro lado, la mayoría de células carcinomatosas en CP pierden la expresión de glutatión-S-transferasa π (GSTP1) por hipermetilación de su promotor. Además, puesto que en las glándulas prostáticas carcinomatosas no hay células basales, hay una disminución en CP de la expresión de genes y proteínas característicos de estas células, como son keratinas de alto peso molecular (por ejemplo, CK5 o CK14) o la proteína nuclear p63, un homólogo del supresor tumoral p53, que se expresa en las capas basales de varios epitelios, incluido el prostático.

La disponibilidad de buenos reactivos ha permitido el uso de algunos de estos marcadores en aplicaciones de relevancia clínica tales como la determinación de niveles en muestras de biopsias por punción, demostrándose su utilidad en el diagnóstico de casos dudosos de CP [4]. Sin embargo, a pesar de su gran especificidad tumoral, ninguna de las proteínas mencionadas es secretada fisiológicamente por el epitelio prostático, por lo que su determinación en

suero y otros fluidos, una de las mayores cualidades del PSA como indicador de masa de epitelio prostático activo, no proporciona resultados totalmente coherentes con su determinación tisular. A partir de los estudios de alto rendimiento se están identificando otras moléculas secretadas, que se expresan a niveles anómalos en CP. La determinación de una o más de estas proteínas, aún no siendo específicas de tejido, en combinación con la determinación de niveles de PSA, es un camino prometedor para desarrollar ensayos de mayor especificidad y sensibilidad.

Por lo tanto existe una necesidad de identificar subconjuntos de marcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata que mejoren significativamente los existentes. En esta invención se proporcionan nuevos métodos para el diagnóstico molecular de CP, con alta capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales, basados en la detección de la expresión de una serie de subconjuntos de genes descritos en la presente invención, así como kits capaces de llevar a cabo dichos métodos y los usos de dichas kits para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. El uso de niveles de expresión de conjuntos de dos o más genes para discriminar muestras tumorales de muestras no tumorales permite alcanzar niveles de significación estadística en tal discriminación que con frecuencia no se alcanza con la determinación del nivel de expresión de un único gen.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos un gen o subconjuntos de al menos dos genes seleccionados del grupo de 45 genes que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NOÑO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYN-GR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, FOXA1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2, FOXF1, MYO6 y ABCC4.

Además la presente invención se refiere pero no se limita a kits, para llevar a cabo los métodos arriba indicados, así como los usos de dichos kits.

Descripción de las figuras

Figura 1. Agrupamiento de muestras analizadas sobre HGF (Human Genome Focus) arrays mediante FADA [13]. Las muestras se agruparon automáticamente en tumorales (círculo situado en la parte inferior de la Figura), normales (círculo situado en la parte superior derecha de la Figura), líneas celulares (círculo situado a la izquierda de la Figura) y muestras de estroma (círculo situado en la parte superior izquierda de la Figura).

Figura 2. Representación de Eisen, tras el análisis por FADA y cluster jerárquico (HC), de los 318 genes sobre e infraexpresados en muestras prostáticas que más significativamente discriminan muestras de tejido prostático normal de muestras de carcinoma prostático [Tabla 2]. Los valores de expresión utilizados para generar el agrupamiento jerárquico son los correspondientes a la tabla 6. La jerarquía se establece mediante el método llamado Hierarchical Clustering. Es un método estándar en estadística aplicada y por tanto cualquier experto en la materia puede derivar el resultado obtenido en la presente invención a partir de los valores numéricos de la Tabla 6. En la parte superior de la imagen: N, muestras de próstata normal; T, muestras de adenocarcinoma prostático; S, muestras de estroma prostático puro; C, células en cultivo. A la derecha se indican los compartimentos a que corresponden predominantemente los distintos grupos de genes. Esta es una interpretación *post hoc*, es decir, hecha a partir de los perfiles de expresión observados para estos genes.

Figura 3. Agrupamiento jerárquico de las 30 muestras analizadas sobre arrays Affymetrix HGF, usando los 45 genes incluidos en el Chip Diagnóstico 1 [Tabla 3]. Los valores de expresión utilizados para generar el agrupamiento jerárquico son los correspondientes a la Tabla 6. El agrupamiento resultante de las muestras se denota de forma idéntica a como se ha descrito para la Figura 2: N, tejido prostático normal; T, tejido tumoral; S, estroma; C, células en cultivo.

Figura 4. Diagrama de Eisen correspondiente al análisis por agrupamiento (cluster) jerárquico de los patrones de expresión en próstata tumoral, normal, estroma prostático puro y líneas celulares, obtenidos sobre arrays Affymetrix HGF, de 22 genes seleccionados y validados por RT-PCR en tiempo real [Tabla 4]. Los valores utilizados para el agrupamiento jerárquico de estos 22 genes se han tomado de la Tabla 6. El agrupamiento resultante de las muestras se denota de forma idéntica a como se ha descrito para la Figura 2: N, tejido prostático normal; T, tejido tumoral; E, estroma; C, células en cultivo.

Figura 5. Diagrama de Eisen correspondiente al análisis por cluster jerárquico de los patrones de expresión en próstata tumoral, normal, estroma prostático puro y líneas celulares, obtenidos sobre arrays Affymetrix HGF, de 14 genes seleccionados y validados por RT-PCR en tiempo real [Tabla 5]. Los valores utilizados para el agrupamiento jerárquico de estos 14 genes se han tomado de la Tabla 6. El agrupamiento resultante de las muestras se denota de forma idéntica a como se ha descrito para la Figura 2: N, tejido prostático normal; T, tejido tumoral; E, estroma; C, células en cultivo.

Figura 6. Discriminación entre muestras de próstata tumoral (T) y próstata normal (N) mediante determinación de niveles de transcrito con arrays de Affymetrix del gen MYO6 en combinación con la determinación de niveles

de transcritos de los siguientes genes: ABCC4, AMACR, BIK, BNIP2, CDK5, CSTA, DST, EIF3S2, EPHA2, ETS2, GJB1, HPN, NIT2, PYCR1, ROR2, TACSTD1 y TP73L. Los valores de expresión utilizados para el agrupamiento jerárquico de estos genes se han tomado de la Tabla 6.

- 5 Figura 7. Discriminación entre muestras de próstata tumoral (T) y próstata normal (N) mediante determinación de niveles de transcrito con arrays de Affymetrix del gen ABCC4 en combinación con la determinación de niveles de transcritos de los siguientes genes: CSTA, GJB1, GSTP1, HOXC6, HPN, LAMB3, MYO6, PRDX4 y TP73L. Los valores de expresión utilizados para el agrupamiento jerárquico de estos genes se han tomado de la tabla 6.
- 10 Figura 8. Detección inmunohistoquímica de la proteína MYO6 en una muestra tisular de un paciente con cáncer de próstata que contiene glándulas tumorales (T) y glándulas normales (N). La tinción es de intensidad claramente superior en las células epiteliales tumorales que en las células epiteliales normales. La tinción para MYO6 presenta un patrón citoplasmático, con refuerzo submembranal.
- 15 Figura 9. Detección inmunohistoquímica de la proteína EPHA2 en una muestra tisular de un paciente con cáncer de próstata que contiene glándulas tumorales (T) y glándulas normales (N). La tinción es exclusivamente en glándulas normales, en concreto en células de la capa basal. La tinción presenta un patrón citoplasmático con refuerzo de membrana.
- 20 Figura 10. Detección inmunohistoquímica de la proteína CX3CL1 en diversas muestras de tejido prostático. Figura 10A: Muestra con glándulas tumorales (T) y normales (N), en que los niveles de CX3CL1 son claramente inferiores en las células tumorales en relación con las células normales. Figura 10B: Muestra con células epiteliales tumorales en que la tinción para CX3CL1 es intensa en la mayoría de células tumorales. Figura 10C: Muestra con PIN (P) y glándulas normales (N), en que la tinción es significativamente más intensa en las células de PIN que en las células epiteliales normales.
- 25

Descripción detallada de la invención

30 Para la realización de la presente invención se analizaron mediante hibridación sobre arrays Human Genome Focus de Affymetrix un total de 31 muestras prostáticas (figura 1).

35 Las señales crudas de hibridación se normalizaron según la normalización de Irizarry *et al.* (2003), y se sometieron a análisis no supervisado mediante el algoritmo FADA [13]. Los genes fueron considerados como diferencialmente expresados entre los grupos normal y tumoral cuando su valor de q asociado (17) era inferior a $2,5 \cdot 10^{-4}$. Este análisis permitió la agrupación automática de muestras, de forma que todas las muestras tumorales, excepto una, se agruparon en un clade y todas las muestras normales se agruparon en otro clade [Figura 1]. En este análisis se incluyeron también líneas celulares prostáticas establecidas y células provenientes de explantes primarios a partir de muestras humanas prostáticas. En el análisis por FADA, las células cultivadas se agruparon independientemente de los 2 clades anteriormente mencionados. A partir de este análisis se dedujeron aquellos genes que más significativamente discriminan muestras tumorales de muestras normales (con un P menor o igual a 10^{-4} en un test t de Student con corrección múltiple), encontrando un total de 318 genes, de los que 134 se encuentran significativamente sobrerepresentados (sobrexpresados) en tumores y 184 significativamente infrarrepresentados en tumores (en la Tabla 2 se muestra una lista de genes capaces de discriminar entre muestras de próstata tumoral y próstata normal, analizados según sus perfiles de expresión obtenidos mediante hibridación sobre microarrays Affymetrix HGF).

40

45 En los siguientes apartados se describen con algo más de detalle algunos de estos genes y su relevancia en CP.

50 En primer lugar, se analizaron aquellos genes sobreexpresados en CP previamente estudiados [Figura 2]. La identificación de estos genes sirvió de validación externa del estudio. Los genes de esta categoría incluyen los bien estudiados HPN y AMACR, y, en menor medida, genes como SIM2 y HOXC6. HPN ha sido extensamente caracterizado [19-21], y se ha demostrado muy recientemente que su sobreexpresión puede conducir a un fenotipo transformado en modelos murinos de cáncer de próstata [22]. AMACR también se ha estudiado en muchos laboratorios como marcador de malignidad en CP [23-27], y su uso clínico se ha extendido recientemente [26-29]. SIM2 se ha encontrado de forma más limitada como asociado a CP [29], aunque ya ha sido objeto de estudio como posible diana terapéutica con siRNA y oligonucleótidos antisentido en modelos celulares [29, 31]. HOXC6 se ha estudiado tanto como marcador de malignidad [32-35], como en su papel en la supervivencia de células tumorales prostáticas en cultivo [36].

55

60 En segundo lugar, se analizaron aquellos genes sobreexpresados en CP previamente no relacionados inequívocamente con el tumor de próstata. Entre estos genes hay muchos que aparecen en “listados” de genes de trabajos que usan análisis de MA, pero sin que en tales trabajos se haga un especial énfasis o esfuerzo para su caracterización biológica. Entre estos genes los hay de factores transcripcionales de elevado interés en este contexto (FOXA1, NONO, ZNF278, ZNF85), genes de proteínas de tráfico vesicular (MYO6, RAB17, SYNGR2, RABIF), genes de transportadores de membrana (ABCC4, TMEM4, SLC19A7), genes de enzimas del metabolismo de ácidos grasos y del metabolismo de ácidos nucleicos.

65

En tercer lugar se analizaron aquellos genes infraexpresados en CP. De los 184 genes detectados como significativamente infraexpresados en tumores, hay un número relativamente alto de genes que se expresan en estroma, por lo que se sospecha que, a pesar del cuidado puesto en la selección de muestras para igualar el componente estromal

en muestras tumorales y normales, hay una mayor representación del componente estromal en muestras normales. No obstante, hay también un número alto de genes que parecen propios de epitelio prostático normal, y que son los que permiten la agrupación no supervisada de muestras normales en una misma rama filética, separada de las muestras estromales [Figura 1]. Algunos de estos genes ya han sido descritos como de expresión disminuida en CP. Dos
 5 ejemplo son GSTP1 y LOH11CR2A, para los que ya se ha demostrado que la pérdida de su expresión en tumores se asocia a hipermetilación de islas CpG de sus regiones promotoras [37, 38]. Otro gen interesante es TP73L, que codifica para p63 y del que varias isoformas (principalmente ΔN y TA) participan en la acción efectora del supresor tumoral p53 [39]. Además, se ha demostrado que la expresión de p63 se asocia con células epiteliales basales de la glándula prostática normal, y que la delección de este gen en ratones impide la formación de una próstata normal [40].

Adicionalmente, cultivos primarios de células epiteliales prostáticas, así como líneas celulares prostáticas inmortalizadas con HPV-16, pero no tumorogénicas (p. ej., RWPE1), expresan TP73L, mientras que células prostáticas establecidas a partir de tumores no expresan este gen. Otros genes infraexpresados en tumores son de factores transcripcionales de la familia FOX (FOXO1A, FOXF1) y otros factores transcripcionales, potenciales supresores tumorales (TACC1, SLIT2), receptores transmembrana y sus ligandos (TGFBR3, TGB3, FGFR1, FGF2, FGF7, IL6R), o proteínas de adhesión celular (DDR2, CADH9, ITGA5, GJA1).

Además, se validó mediante inmunohistoquímica sobre muestras parafinadas (en formato Tissue Microarrays) los niveles de expresión de algunas de las proteínas correspondientes a genes sobreexpresados o infraexpresados en CP del presente estudio, así como en estudios previos [13].

Uno de los genes que se encontró sobreexpresado en los estudios transcripcionales, y cuya proteína se estudió por inmunohistoquímica, fue MYO6. El presente estudio inmunohistoquímico validó los datos transcripcionales, demostrando que la proteína MYO6 también se sobreexpresa en una mayoría de tumores. Un claro ejemplo de sobreexpresión de la proteína MYO6 en carcinoma de próstata en relación con glándulas prostáticas normales se muestra en la Figura 8, correspondiente a una muestra que contiene tanto epitelio prostático tumoral como epitelio prostático normal, habiendo sido teñidas con un anticuerpo monoclonal específico de MYO6. Esta proteína es una miosina atípica con funciones en endocitosis y tráfico vesicular, y que previamente se había demostrado que se expresa a altos niveles en adenocarcinoma de ovario, principalmente en asociación con bordes invasivos [41].

También se llevó a cabo el análisis de la expresión *in situ* de varios de los genes infraexpresados en la presente invención, en particular aquellos cuya infraexpresión representa una novedad en esta neoplasia, como el receptor tirosina quinasa EPHA2, el regulador transcripcional SNAI2 o la quimioquina CX3CL1. Son de resaltar estos resultados, en particular en relación con EPHA2 y SNAI2, ya que tanto EPHA2 [42-58] como SNAI2 [59-62] se asociaron en múltiples publicaciones a una sobreexpresión, y no infraexpresión, en múltiples tipos de tumores, entre los que se incluyen los adenocarcinomas de próstata.

Un ejemplo de la pérdida de expresión de la proteína EPHA2 en epitelio prostático tumoral se muestra en la Figura 9, en que se ve que las glándulas prostáticas normales (en células de la capa basal) expresan altos niveles de EPHA2, mientras que las células epiteliales prostáticas tumorales situadas en glándulas adyacentes carecen por completo de reactividad y por tanto no expresan niveles detectables de esta proteína.

En el caso de la quimioquina CX3CL1 (también llamada fractalkina), la expresión determinada mediante RT-PCR en tiempo real indicaba una tendencia a que el epitelio tumoral mostrase niveles de expresión inferiores al epitelio normal. La tinción inmunohistoquímica para la correspondiente proteína, sin embargo, mostró perfiles variables según los casos, de modo que en algunas muestras se da una disminución significativa de la expresión de CX3CL1 en epitelio tumoral, mientras que en otros casos el epitelio prostático tumoral presentaba altos niveles de la misma proteína [Figura 10]. Finalmente, distintos casos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) mostraron niveles variables de tinción para CX3CL1, siendo en algunos casos de intensidad mayor que en el epitelio normal adyacente [Figura 10].

En el contexto de CP, por tanto, nuestros resultados indican que la posible sobreexpresión de estas moléculas no se debe utilizar como indicador de malignidad, o servir como base para diana terapéutica en este tipo de tumores, a diferencia de lo que generalmente se viene aceptando. Antes bien, nuestros datos indican que el nivel de expresión de estas moléculas es bajo o nulo en epitelio prostático maligno.

Como consecuencia de los anteriores análisis, se ha identificado y definido un conjunto de genes, correspondiente al grupo de 318 genes, y varios subconjuntos de genes, a partir de este primero, útiles para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales, en los que la determinación de los niveles de mRNA y/o proteína representa una signatura diagnóstica de cáncer de próstata que mejora significativamente los métodos existentes de diagnóstico de dicho cáncer.

Con objeto de diseñar un método de diagnóstico de cáncer de próstata en un formato más reducido que el conjunto de 318 genes, más práctico y cercano a la práctica clínica (por ejemplo mediante análisis RT-PCR tipo microarray o chip de diagnóstico) se llevó a cabo una selección de grupo menor de genes incluidos en este primer conjunto (ver Ejemplo 2). Esta selección de un subconjunto de 45 genes representa una de las múltiples alternativas que se pueden obtener a partir del análisis de este grupo de genes original, y no debe ser entendida como una limitación del alcance de la presente invención. Un experto en la materia puede establecer grupos de genes distintos a los descritos en la presente invención.

El primero de los subconjuntos contiene un conjunto cuidadosamente seleccionado de 45 genes, validados por RT-PCR en tiempo real, con una alta capacidad de discriminación entre muestras normales y tumorales [Tabla 3, Figura 3]. Otra versión generada, para el análisis de un número aún más limitado de genes, validados por RT-PCR en tiempo real, mantiene prácticamente la misma capacidad de discriminación entre muestras normales y tumorales que el anterior. Dicho subconjunto de genes incluidos en este diseño corresponde a los 22 genes validados mostrados en la Tabla 4 y Figura 4, o incluso un subconjunto aún más reducido, que corresponde a los 14 genes mostrados en la Tabla 5 y Figura 5. Otras versiones generadas de subconjuntos de genes con alta capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales que entran dentro del alcance de la presente invención se muestran en las Figuras 6 y 7. La identificación de los niveles de expresión de todos estos subconjuntos de genes sirven de base para el desarrollo de un kit o dispositivo de diagnóstico de cáncer de próstata de relativo bajo coste y alto rendimiento para cuantificar múltiples transcritos, en tiempo real, en una plataforma que permite analizar simultáneamente un diverso y alto número de muestras. Preferentemente, cuando el kit de diagnóstico se basa en la cuantificación de transcritos, se requiere menos de 1 ng de RNA total por muestra. Igualmente, es posible el desarrollo de un kit o dispositivo de diagnóstico de cáncer de próstata basado en la determinación de los niveles de proteína de dichos genes en muestras tumorales.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo de 45 genes que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, FOXA1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2, FOXF1, MYO6 y ABCC4.

En otro aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados del grupo de 45 genes que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, FOXA1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2, FOXF1, MYO6 y ABCC4 donde la capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminatoria de los mismos genes por separado.

En particular, la capacidad discriminatoria cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes es un 1%, preferentemente un 10%, más preferentemente un 25%, aún más preferentemente un 50% mayor que la capacidad discriminatoria de al menos uno de los genes por separado.

En el contexto de la presente invención, se define la “capacidad discriminatoria” como la capacidad de discriminar entre muestras tumorales y no tumorales cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el conjunto de datos obtenidos a partir de los experimentos de análisis de expresión para un gen o para un subconjunto de al menos dos genes del grupo de 45 genes objeto de la presente invención.

Por ejemplo, al aplicar un determinado método de clasificación al conjunto de muestras descrito en la tabla 6, la capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales de los genes MYO6 y CDK5 determinados individualmente era de 93,6% y 87,1%, respectivamente, mientras que la capacidad discriminatoria de la determinación conjunta de ambos genes era de 96,8%. Aún otro ejemplo, la capacidad discriminatoria de los genes ABCC4 y FOXO1A determinados individualmente era de 87,1% y 83,9%, respectivamente, mientras que la capacidad discriminatoria de la determinación conjunta de ambos genes era de 96,8%.

El término “muestra problema” tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos (sangre, orina, saliva, etc.), obtenidos mediante biopsias, raspados o cualquier otro método conocido por un experto en la materia que sirva para el mismo fin, de un vertebrado susceptible de tener cáncer de próstata donde dicho vertebrado es un humano.

En una realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados del grupo de 22 genes que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, MYO6 y ABCC4 donde la capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminatoria de los mismos genes por separado.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados del grupo de 14 genes que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, MYO6 y ABCC4 donde la capacidad discriminatoria entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminatoria de los mismos genes por separado.

ES 2 300 176 B1

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados de la tabla 3 donde al menos uno de dichos genes seleccionados es el gen MYO6 o el gen ABCC4.

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión del gen MYO6 en combinación con el análisis del nivel de expresión de al menos un gen del grupo que consiste en: ABCC4, AMACR, BIK, BNIP2, CDK5,
10 CSTA, DST, EIF3S2, EPHA2, ETS2, GJB1, HPN, NIT2, PYCR1, ROR2, TACSTD1 y TP73L.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión del gen MYO6 en combinación
15 con el análisis de la sobreexpresión de al menos un gen del grupo que consiste en: ABCC4, AMACR, BIK, CDK5, EIF3S2, GJB1, HPN, NIT2, PYCR1, TACSTD1.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión del gen MYO6 en combinación
20 con el análisis de la infraexpresión de al menos un gen del grupo que consiste en: BNIP2, CSTA, DST, EPHA2, ETS2, ROR2, y TP73L.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, del nivel de expresión del gen ABCC4 en combinación
25 con el análisis del nivel de expresión de al menos un gen del grupo que consiste en: CSTA, GJB1, GSTP1, HOXC6, HPN, LAMB3, MYO6, PRDX4 y TP73L.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión del gen ABCC4 en combinación
30 con el análisis de la sobreexpresión de al menos un gen del grupo que consiste en: GJB1, HOXC6, HPN, MYO6, PRDX4.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión del gen ABCC4 en combinación
35 con el análisis de la infraexpresión de al menos un gen del grupo que consiste en: CSTA, GSTP1, LAMB3, y TP73L.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión de MYO6 o ABCC4, TACSTD1, HPN,
40 AMACR o APOC1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3 o EPHA2.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión de MYO6, ABCC4, TACSTD1,
50 HPN, AMACR, APOC1 o GJB1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2 o ETS2.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión de MYO6, ABCC4, TACSTD1,
55 HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2 o FOXA1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2, o FOXF1.

60 Por “gen sobreexpresado” tal y como se utiliza en la presente invención debe entenderse, en general, la expresión anormalmente alta de un gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células procedentes de un tejido prostático tumorigénico respecto a la expresión de dicho gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células normales del mismo tejido no tumorigénico. En el caso de la determinación
65 de niveles de expresión mediante hibridación sobre microarrays Affymetrix definimos como gen “sobreexpresado” en una muestra de cáncer de próstata aquél cuyos niveles de expresión son al menos 2,0 veces superiores a los niveles de expresión de la correspondiente muestra de tejido prostático no tumoral. Cuando la determinación se realiza mediante RT-PCR cuantitativa definimos como “sobreexpresión” cuando el niveles de expresión en la muestra tumoral del gen

en cuestión es al menos 1,5 veces el nivel de expresión en la correspondiente muestra prostática normal. Por otra parte, cuando se analizan varias muestras tumorales, un gen se considera “generalmente sobreexpresado”, o “sobreexpresado” en tales tumores de próstata cuando dicho gen está sobreexpresado en al menos un 70% de las muestras tumorales estudiadas, comparando los niveles normalizados de dicho gen, determinados en muestras de tejido prostático tumoral, con la media aritmética de los niveles normalizados de al menos cinco muestras de tejido prostático no tumoral, definiendo cuantitativamente los niveles de “sobreexpresión” tal como se describe arriba para determinaciones sobre microarrays o mediante RT-PCR cuantitativa.

Por “gen infraexpresado” tal y como se utiliza en la presente invención debe entenderse, en general, la expresión anormalmente baja de un gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células procedentes de un tejido prostático tumorigénico respecto a la expresión de dicho gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células normales del mismo tejido no tumorigénico. En el caso de la determinación de niveles de expresión mediante hibridación sobre microarrays Affymetrix definimos como gen “infraexpresado” en una muestra de cáncer de próstata aquél cuyos niveles de expresión son 0,5 veces, o menos, en relación con los niveles de expresión de la correspondiente muestra de tejido prostático no tumoral. Cuando la determinación se realiza mediante RT-PCR cuantitativa definimos como “infraexpresión” cuando el niveles de expresión en la muestra tumoral del gen en cuestión es al 0,75 veces, o inferior, con respecto al nivel de expresión en la correspondiente muestra prostática normal. Por otra parte, cuando se analizan varias muestras tumorales, un gen se considera “generalmente infraexpresado” o “infraexpresado” en tales tumores de próstata cuando dicho gen está infraexpresado en al menos un 70% de las muestras tumorales estudiadas, comparando los niveles normalizados de dicho gen, determinados en muestras de tejido prostático tumoral, con la media aritmética de los niveles normalizados de al menos cinco muestras de tejido prostático no tumoral, definiendo cuantitativamente los niveles de “infraexpresión” tal como se describe arriba para determinaciones sobre microarrays o mediante RT-PCR cuantitativa.

Se consideró que una muestra presentaba sobreexpresión o infraexpresión de una proteína respecto a otra muestra, cuando la diferencia del porcentaje de tinción epitelial entre las dos muestras era superior al 20% y/o la intensidad era al menos un grado diferente.

Y, finalmente, en una realización aún más preferida la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, de la sobreexpresión o infraexpresión de los 318 genes indicados en la Tabla 2.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema del nivel de expresión de al menos un gen o subgrupos de dos genes seleccionados de la tabla 3 donde el análisis del nivel de expresión de dichos genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción y/o determinando el nivel de proteína codificada por el gen o fragmentos de la misma.

En una realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema del nivel de expresión de al menos un gen o subgrupos de dos genes seleccionados de la tabla 3 donde el análisis del nivel de expresión de dichos genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa), RT-LCR (retrotranscripción en combinación en combinación con la reacción en cadena de la ligasa), SDA o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema del nivel de expresión de al menos un gen o subgrupos de dos genes seleccionados de la tabla 3 donde la determinación del nivel de expresión de dichos genes se realiza determinando el nivel de proteína codificada por el gen o fragmentos de la misma, mediante la incubación con un anticuerpo específico (donde el análisis se lleva a cabo mediante Western blot y/o inmunohistoquímica); mediante geles de electroforesis; mediante chips de proteína; mediante ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

El término “anticuerpo” tal y como se utiliza en la presente descripción incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

ES 2 300 176 B1

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un Kit para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata. Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para analizar la variación en el nivel de expresión de al menos un gen o subgrupos de dos genes de cualquiera de los métodos anteriores. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye un dispositivo para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, en adelante dispositivo diagnóstico de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar la variación en los niveles de expresión de al menos un gen o subgrupos de dos genes de cualquiera de los métodos anteriores.

Una realización preferente de la presente invención consiste en un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: análisis Northern blot, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retro-transcripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), hibridación o microarrays.

Otra realización preferente de la invención lo constituye un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm que consiste, a título ilustrativo y sin que limite la invención, en un microarray de ADN, un gene-chip de ADN o un chip microelectrónico de ADN, que comprende sondas génicas.

Otra realización preferente de la invención lo constituye un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de proteína mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: ELISA, Western blot y un dispositivo tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, donde la sobreexpresión de los genes MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3 o EPHA2 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

En una realización preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, donde la sobreexpresión de MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1 o GJB1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFB3, CLU, ROR2 o ETS2 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, donde la sobreexpresión de los genes MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, o FOXA1 o el análisis de la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFB3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2 o FOXF1 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere pero no se limita a un método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata con alta capacidad discriminatoria, entre muestras tumorales y no tumorales, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema, donde la sobreexpresión o infraexpresión de los 318 genes indicados en la tabla 2 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que la invención pertenece. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

5 *Identificación de los genes asociados a un cluster identificativo de un patrón tumoral de cáncer de próstata*

Para la realización de la presente invención se analizaron mediante hibridación sobre arrays Human Genome Focus de Affymetrix una serie de 31 muestras prostáticas humanas (figura 1):

- 10 I. 20 muestras enriquecidas en epitelio tumoral.
- II. 7 muestras enriquecidas en epitelio normal (<1% de células carcinomatosas).
- 15 III. 1 muestra que comprende un grupo de 5 muestras normales (POOL N).
- IV. 3 muestras consistentes exclusivamente en tejido estromal.

Los tejidos recogidos se incluyeron en OCT, se congelaron en isopentano y se almacenaron a -80°C. Las muestras fueron evaluadas histológicamente y seleccionadas para el análisis de acuerdo con dos criterios: (a) un mínimo del 90% de pureza de epitelio normal o tumoral en las muestras normales y tumorales, respectivamente; (b) ausencia o presencia mínima de focos de inflamación o de atrofia. Todas las muestras, excepto tres (una normal y dos tumorales), provienen de la zona periférica, incluyendo las muestras de estroma. El contenido epitelial medio estimado en las muestras tumorales fue del 70%, del cual, un promedio del 90% presentaba características neoplásticas. El contenido epitelial medio estimado en las muestras normales era del 40%, con ausencia de glándulas tumorales. Las muestras estromales presentaban menos del 1% de epitelio. De cada muestra, se usaron 20-30 criosecciones, de 20 µm de grosor cada una, para la extracción de RNA total de los tejidos. La primera y la última sección de cada muestra se tiñeron con hematoxilina-eosina para confirmar el diagnóstico y la calidad de las muestras. La Tabla 1 describe las características clínico-patológicas correspondientes a las muestras utilizadas.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 300 176 B1

TABLA 1

Características clínico-patológicas correspondientes a las muestras usadas en el estudio

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

MUESTRAS ESTROMALES		
1E		
2E		
18E		
MUESTRAS TUMORALES	PUNTUACIÓN DE GLEASON	ESTADIO*
3T	8	T2
4T	7	T3a
5T	7	T3a
6T	7	T3a
7T	6	T2
8T	9	T3a
9T	9	T3a
10T	7	T3a
11T	7	T3a
12T	6	T3a
13T	7	T2
14T	7	T2
15T	5	T2
16T	7	T3a
17T	9	T2
18T	7	T2c
19T	8	T2
20T	6	T2
21T	7	T3a
22T	7	T3a
MUESTRAS NORMALES		
7N		
9N		
12N		
13N		
14N		
17N		
21N		
CULTIVOS PRIMARIOS	MUESTRA DE ORIGEN	
PC17	17T	
PC23	23T	

*Estadaje clínico y patológico según la clasificación internacional TNM de adenocarcinoma prostático.

La puntuación de Gleason va desde 2 hasta 10 y describe la agresividad de las células cáncerosas, y por tanto, la posibilidad que tiene el tumor para diseminarse. Cuanto más baja es la puntuación, menor es la probabilidad de diseminación del tumor.

ES 2 300 176 B1

Las líneas HeLa y RWPE-1 (obtenidas de la American Type Culture Collection) se cultivaron en DMEM (PAA, Ontario, Canada) suplementado con el 10% de suero (FBS) y KSFM (Gibco, Carlsbad, CA), respectivamente, con el objeto de utilizarlas como controles. Los cultivos primarios (PC17 and PC23) se derivaron de prostatectomías radicales de pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado, en los cuales el adenocarcinoma era detectado macroscópicamente. Los explantes de tejido se lavaron en PBS, se disgregaron y se cultivaron en KSFM (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con 5- α -dihidrotestosterona a una concentración de 10^{-11} M. Después de 4-5 semanas de cultivo, y dos pases, los cultivos fueron morfológicamente evaluados para asegurar la ausencia de fibroblastos, y se usaron para obtener RNA total.

Las muestras de tejido se microdisecionaron por láser. Se usaron criosecciones de 8 μ m de grosor, que fueron montadas sobre portaobjetos recubiertos de membrana plástica (PALM Mikrolaser Technology, Bernried, Germany), se fijaron durante 3 minutos en etanol 70%, se tiñeron con hematoxilina de Mayer (SIGMA, St. Louis, MO), se deshidrataron en una serie de alcoholes, se dejaron secar durante 5 minutos y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La microdisección de las muestras se realizó con el sistema MicroBeam de PALM (PALM Mikrolaser Technology). Se recogió aproximadamente 1.2 mm² de epitelio normal o tumoral para cada muestra y se estimó una homogeneidad del 99% mediante visualización microscópica.

La extracción del RNA total de las muestras de tejido y las líneas celulares se llevó a cabo mediante el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). El RNA total de las muestras microdisecionadas se extrajo con el kit RNeasy Micro Kit (Qiagen). En todos los casos, se hizo una digestión con DNase I (Qiagen), y la calidad y la concentración del RNA se evaluó con el aparato 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Para el análisis de expresión génica mediante hibridación sobre “microarrays” se usó RNA aislado a partir de 7 muestras de tejido prostático normal con su correspondiente pareja (es decir, del mismo paciente y misma resección quirúrgica) de muestra prostática tumoral, una muestra consistente en la mezcla a partes iguales del RNA extraído de 5 muestras de tejido prostático normal (“pool” normal), 13 muestras tumorales no emparejadas (es decir, sin representación de tejido prostático normal del mismo paciente), 3 muestras de estroma prostático normal puro (sin tejido epitelial), dos líneas celulares epiteliales establecidas (HeLa y RWPE-1) y dos cultivos primarios de próstata (PC17 y PC23). La síntesis de cDNA se hizo a partir de 2 μ g de RNA total, usando un cebador (“primer”) con una secuencia promotora para la RNA polimerasa T7 añadida en el extremo 3’ (Superscript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de la síntesis de la segunda cadena, se realizó una transcripción *in vitro* usando el kit de marcaje BioArray High Yield RNA (Enzo, Farmingdale, NY) para obtener cRNA marcado con biotina.

Previamente a la hibridación, lavado y escaneo de los microarrays, los cRNA (15 μ g) fueron calentados a 95°C durante 35 min para proporcionar fragmentos de 35-200 bases de longitud. Cada muestra se añadió a una solución de hibridación [100 mM ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico, 1 M Na⁺, y 20 mM EDTA] en presencia de 0,01% Tween-20 a una concentración final de cRNA de 0.05 μ g/ml. Cinco pg de cRNA fragmentado se hibridaron sobre un TestChip (Test3, Affymetrix, Santa Clara, CA) como control de calidad. Diez pg de cada cRNA fragmentado se hibridaron sobre Affymetrix Human Genome Focus Arrays a 45°C durante 16 h, se lavaron y se tiñeron en la Affymetrix Fluidics Station 400 y se escanearon a 3 μ m de resolución en un scanner Agilent HP G2500A GeneArray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Posteriormente, se realizó el análisis informático y la normalización de los resultados obtenidos. Las señales crudas de hibridación se normalizaron según la normalización descrita por Irizarry *et al.*, utilizando el algoritmo RMA [14], disponible como parte del paquete Bioconductor de Affymetrix. El primer paso en la normalización RMA es la sustracción de la señal de fondo; esto se consigue considerando que las sondas PM observadas pueden ser modeladas como un componente de la señal que sigue una distribución normal. Los parámetros de las distribuciones se ajustan a partir de los datos y entonces se elimina el componente de ruido. Después se realiza una normalización entre arrays, mediante la normalización cuantil-cuantil a nivel de sonda, usando el método propuesto por Bolstad *et al.* [15]. El objetivo es escalar todos los chips a la misma distribución empírica. Finalmente, las intensidades observadas de los grupos de sondas, se resumen para obtener la medida de expresión de cada gen usando el algoritmo medianpolish [16], el cual se ajusta a este modelo de manera robusta.

Previamente a la selección de genes expresados diferencialmente y al modelaje de redes génicas o de grupos de muestras genotípicamente coherentes (ver más adelante), se comprobó la coherencia genotípica de las muestras pertenecientes a cada uno de los grupos. Los datos de expresión normalizados fueron analizados con el programa FADA [13]. Este programa aplica un Análisis Factorial de modo Q (es decir, en el espacio de la muestra), una herramienta multivariable relacionada con el PCA, acoplada a algoritmos de clustering. Los genes fueron considerados como diferencialmente expresados entre los grupos normal y tumoral cuando su valor q asociado [17] era inferior a $2,5 \cdot 10^{-4}$. Los valores q fueron calculados a partir de los p-valores obtenidos del t-test usando el algoritmo Benjamini-Hochberg step-down false-discovery rate (FDR) [18], tal y como está implementado en el paquete de multitest del Bioconductor. Este algoritmo ajusta los p-valores hacia arriba para eliminar los efectos del testeo múltiple.

En el contexto de la presente invención se entiende que los valores de un parámetro distinguen dos clases o categorías de muestras (en nuestro caso, muestras tumorales de muestras normales) con alta significación cuando el valor de p en una comparación estadística (aplicando, p. ej., t-test) entre las dos categorías es inferior a 0.001. En la Tabla 6 se muestran los datos numéricos que corresponden a los niveles de expresión de los genes indicados en la primera columna para las muestras que se indican en la primera fila. Las muestras terminadas en T corresponden a próstata tu-

ES 2 300 176 B1

moral y las terminadas en N corresponden a próstata normal. La tabla 6 muestra también valores de expresión para las líneas celulares HeLa (procedente de un carcinoma de cérvix humano) y RWPE-1 (epitelio prostático humano transformado con el herpesvirus HPV16), y para dos explantes primarios derivados de tumores prostáticos, denominados PC17 y PC23. Los dígitos son valores de las señales obtenidas por hibridación de cRNAs marcados sobre microarrays Affymetrix HGF, normalizados por el método RMA [14].

Este análisis permitió la agrupación automática de las muestras, de forma que todas las muestras tumorales, excepto una, se agruparon en un clade y todas las muestras normales se agruparon en otro clade (Figura 1). Al mismo tiempo, las células cultivadas y las muestras estromales se agruparon independientemente de los 2 clades anteriormente mencionados (Figura 1).

A partir de este análisis se identificaron aquellos genes que más significativamente discriminan muestras tumorales de muestras normales (con un P menor o igual a 10^{-4} en un test t de Student con corrección múltiple), encontrando un total de 318 genes, de los que 134 se encuentran significativamente sobrerrepresentados (sobreexpresados) en tumores y 184 significativamente infrarrepresentados (infraexpresados en tumores (Tabla 2).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 300 176 B1

TABLA 2

Lista de 318 genes capaces de discriminar entre muestras de próstata tumoral y próstata normal, analizados según sus perfiles de expresión obtenidos mediante hibridación sobre microarrays Affymetrix HGF

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Genes sobreexpresados en próstata tumoral		Genes infraexpresados en próstata tumoral	
Símbolo del gen	Cluster Unigene	Símbolo del gen	Cluster UniGene
ABCC4	Hs.508423	ACTB	Hs.520640
ACAT1	Hs.232375	ACTC	Hs.118127
ACY1	Hs.334707	ADAMTS5	Hs.58324
ADSL	Hs.75527	ALDH1A2	Hs.435689
AKR1A1	Hs.474584	ALDH2	Hs.436437
AMACR	Hs.508343	ANK2	Hs.137367
AP1M2	Hs.18894	ANXA2	Hs.511605
AP1S1	Hs.489365	APG1/HSPA4L	Hs.135554
APOC1	Hs.110675	ARHE	Hs.6838
APRT	Hs.28914	ARL7	Hs.111554
ATP5G1	Hs.80986	ASC/PYCARD	Hs.499094
ATP5G2	Hs.524464	ATP1A2	Hs.34114
ATP6V1F	Hs.78089	ATP2B4	Hs.343522
ATP6V1G1	Hs.388654	B4GALT5	Hs.370487
B4GALT3	Hs.321231	BHMT2	Hs.114172
BIK	Hs.475055	BIN1	Hs.193163
C15orf2	Hs.451286	BNIP2	Hs.283454
TRIB3	Hs.516826	BPAG1/DST	Hs.485616
CAMKK2	Hs.297343	CALM1	Hs.282410
CDK5	Hs.166071	CAPG	Hs.516155
CGREF1	Hs.546335	CAV1	Hs.74034
COX5A	Hs.401903	CAV2	Hs.212332
COX7A2L	Hs.339639	CD59	Hs.278573
CSTF3	Hs.44402	CES1	Hs.499222
CYB561D2	Hs.149443	CHST2	Hs.8786
DECR2	Hs.513233	CLIC4	Hs.440544
DHPS	Hs.79064	CLU	Hs.436657
DKC1	Hs.4747	CNN1	Hs.465929
DOM3Z	Hs.153299	CNN2	Hs.169718
DXS9879E	Hs.444619	COL13A1	Hs.211933
ECHS1	Hs.76394	COL17A1	Hs.117938
EIF3S2	Hs.530096	COL18A1	Hs.517356
Continuación			

ES 2 300 176 B1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ENTPD5	Hs.131555	CORO1C	Hs.330384
EPB41L4B	Hs.269180	CRYAB	Hs.408767
EPB42	Hs.368642	CSRP1	Hs.108080
ERP70	Hs.93659	CSTA	Hs.518198
ETFA	Hs.39925	CX3CL1	Hs.531668
FARSLA	Hs.23111	CYB5R2	Hs.414362
FBP1	Hs.494496	CYP27A1	Hs.516700
FKBP4	Hs.524183	CYP4B1	Hs.436317
FLJ10458	Hs.85570	DDR2	Hs.275757
FOXA1	Hs.163484	DES	Hs.471419
GABRD	Hs.113882	DF	Hs.155597
GALNT7	Hs.127407	DMPK	Hs.546249
GBL	Hs.29203	DNAJB4	Hs.380282
GJB1	Hs.333303	DPYSL3	Hs.519659
GOLPH2	Hs.494337	DVS27/C9orf26	Hs.348390
GTF3C2	Hs.75782	EDNRB	Hs.82002
GUSB	Hs.255230	EFEMP2	Hs.381870
HEBP2	Hs.486589	EFS	Hs.24587
HOXC6	Hs.820	ELF4	Hs.271940
HPN	Hs.182385	EMILIN1	Hs.63348
HRI/EIF2AK1	Hs.520205	EMP3	Hs.9999
HSD17B4	Hs.406861	ENIGMA/PDLIM7	Hs.533040
HSPD1	Hs.113684	EPAS1	Hs.468410
HYPK	Hs.511978	EPHA2	Hs.171596
ICA1	Hs.487561	ETS2	Hs.517296
KPTN	Hs.25441	EVA1	Hs.116651
LASS2	Hs.285976	FCGRT	Hs.111903
LIM/PDLIM5	Hs.480311	FEM1B	Hs.362733
MDH2	Hs.520967	FER1L3	Hs.500572
METTL3	Hs.168799	FEZ1	Hs.224008
MARCKSL1	Hs.75061	FGF2	Hs.284244
MRPL17	Hs.523456	FGF7	Hs.122006
MYO6	Hs.149387	FGFR1	Hs.264887
NDUFA7	Hs.515112	FGFR2	Hs.533683
NDUFB4	Hs.304613	FLJ10539	Hs.528650
NDUFV2	Hs.464572	FLNA	Hs.195464
NFS1	Hs.194692	FLNC	Hs.58414
NIT2	Hs.439152	FLRT3	Hs.41296
Continuación			

ES 2 300 176 B1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

NME1	Hs.118638	FOXF1	Hs.155591
NME2	Hs.463456	FOXO1A	Hs.370666
NONO	Hs.533282	FZD7	Hs.173859
NT5M	Hs.513977	GABRP	Hs.26225
P24B/TMED3	Hs.513058	GAS1	Hs.65029
P2RX4	Hs.321709	GATM	Hs.75335
P4HB	Hs.464336	GBP2	Hs.386567
PCSK6	Hs.498494	GJA1	Hs.74471
PAFAH1B3	Hs.466831	GNAZ	Hs.555870
PAICS	Hs.518774	GPR161	Hs.271809
PCCB	Hs.63788	GPR87	Hs.58561
PDCD8	Hs.424932	GPRC5B	Hs.148685
PDE3B	Hs.445711	GRK5	Hs.524625
PDIR	Hs.477352	GSTM4	Hs.348387
PECI	Hs.15250	GSTP1	Hs.523836
PGLS	Hs.466165	HEPH	Hs.31720
PLEKHB1	Hs.445489	CFH	Hs.363396
POLD2	Hs.306791	HLF	Hs.196952
PP3111	Hs.514599	HSD11B1	Hs.195040
PPA2	Hs.480452	HSPB8	Hs.400095
PPIH	Hs.256639	IL6R	Hs.135087
PRDX4	Hs.83383	ILK	Hs.5158
PYCR1	Hs.458332	ISYNA1	Hs.405873
RAB11A	Hs.321541	ITGA5	Hs.505654
RAB17	Hs.44278	ITGB4	Hs.370255
RAB1F	Hs.90875	KCNJ8	Hs.102308
RAP1GA1	Hs.148178	KCNMB1	Hs.484099
REPIN1	Hs.521289	KRT14	Hs.355214
REPS2	Hs.186810	KRT15	Hs.80342
RGS10	Hs.501200	KRT17	Hs.2785
RPL12	Hs.408054	KRT5	Hs.433845
RPL39	Hs.300141	KRT7	Hs.411501
RPL7A	Hs.499839	LAMB3	Hs.497636
RPS15	Hs.406683	LAPTM4B	Hs.492314
RUSC1	Hs.226499	LMCD1	Hs.475353
SERP1	Hs.518326	LMNA	Hs.491359
SERPINB6	Hs.519523	LOH11CR2A	Hs.152944
SFRS9	Hs.555900	MAOB	Hs.46732
Continuación			

ES 2 300 176 B1

	SFRS9	Hs.555900	MAP1B	Hs.535786
	SIM2	Hs.146186	MAPRE1	Hs.472437
5	SLC19A1	Hs.84190	MBNL2	Hs.125715
	SLC25A10	Hs.511841	MCAM	Hs.511397
	SND1	Hs.122523	MEF2C	Hs.444409
10	SNRPD2	Hs.515472	ZNF258	Hs.554935
	SSR2	Hs.74564	MYH11	Hs.460109
	STK16	Hs.153003	NAB1	Hs.107474
15	STX3A	Hs.530733	NT5E	Hs.153952
	SYNGR2	Hs.464210	OPTN	Hs.332706
	TACSTD1	Hs.692	PALM2-AKAP2	Hs.259461
20	TIMM13	Hs.75056	PCDH9	Hs.407643
	TM4SF13	Hs.364544	PDE2A	Hs.503163
	TM9SF2	Hs.130413	PDE4A	Hs.89901
25	TMEM4	Hs.8752	PDLIM4	Hs.424312
	TRAP1	Hs.30345	PER2	Hs.58756
	TREM2	Hs.435295	PFKFB3	Hs.195471
30	TRIM36	Hs.519514	PGRMC1	Hs.90061
	TRIP13	Hs.436187	PLEKHA1	Hs.287830
	TROAP	Hs.524399	PLN	Hs.170839
35	TXN	Hs.435136	PLP2	Hs.77422
	UCK2	Hs.458360	POPDC2	Hs.16297
	WDR23	Hs.525251	PPP1R12A	Hs.49582
40	ZMPSTE24	Hs.132642	PPP1R12B	Hs.444403
	ZNF278	Hs.517557	PRNP	Hs.472010
	ZNF85	Hs.37138	PSIP1	Hs.493516
45			PTBP2	Hs.269895
			PTGER2	Hs.2090
50			PTGIS	Hs.302085
			RABGEF1	Hs.530053
			RARRES2	Hs.521286
55			RASL12	Hs.27018
			RBBP7	Hs.495755
60			RBM9	Hs.282998
			REMS1	Hs.470412
65			Continuación	

ES 2 300 176 B1

		RBP1	Hs.529571
5		RBEMS	Hs.334587
		ROCK2	Hs.58617
		ROR2	Hs.98255
10		RRAS	Hs.515536
		S100A6	Hs.275243
15		SART2	Hs.486292
		SCHIP1	Hs.134665
		SCRG1	Hs.7122
20		SEC23A	Hs.272927
		SERPINB1	Hs.381167
25		SERPINE2	Hs.38449
		SLC25A12	Hs.470608
		SLC8A1	Hs.468274
30		SLIT2	Hs.29802
		SMARCD3	Hs.444445
35		SMTN	Hs.149098
		SNAI2	Hs.360174
40		SNX7	Hs.197015
		SRD5A2	Hs.458345
		SRF	Hs.520140
45		ST5	Hs.117715
		STAT5B	Hs.132864
50		SVIL	Hs.499209
		TACC1	Hs.279245
		TAZ	Hs.409911
55		TCF7L1	Hs.516297
		TCIRG1	Hs.495985
60		TGFB3	Hs.2025
		TGFBR3	Hs.482390
65		TMG4/PRRG4	Hs.471695
		Continuación	

ES 2 300 176 B1

		TP73L	Hs.137569
5		TPM2	Hs.300772
		TRIM29	Hs.504115
		TRPC1	Hs.250687
10		TU3A	Hs.8022
		VAMP3	Hs.66708
		VCL	Hs.500101
15		WDR1	Hs.128548
		WFDC2	Hs.2719
20		ZFHX1B	Hs.34871

Ejemplo 2

Validación de los genes identificados como más relevantes en los experimentos de hibridación sobre microarrays mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el formato TagMan LDA

Para esto se ha realizado RT-PCR en tiempo real de los genes de mayor interés biológico y como marcadores a partir del panel completo de 318 genes identificados anteriormente, usando tanto muestras no microdisseccionadas como muestras microdisseccionadas por láser con el instrumento PALM. El objeto del análisis RT-PCR es determinar los niveles de expresión de estos genes en un formato, tipo chip de diagnóstico, más reducido y cercano a la práctica clínica.

Se llevó a cabo un RT-PCR en tiempo real para cada réplica de tejido prostático (triplicados) o de muestras microdissecadas (cuadruplicados), ya sea de tejido tumoral o normal. Así, se usó 1 ng de RNA total de partida para la síntesis de cDNA con la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) y hexámeros aleatorios a 42°C durante 50 min., seguido por un tratamiento con RNasa a 37°C durante 20 min. Los cDNA resultantes se usaron para realizar la PCR a tiempo real en un instrumento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando un array TaqMan de Baja Densidad (Applied Biosystems), diseñado expresamente, que contenía primers y sondas específicos para 45 genes de interés y el gen RPS18 como calibrador y que se ha definido como Chip Diagnóstico 1 (ver Tabla 3). Las condiciones del termociclador se establecieron según las especificaciones del fabricante. Los datos obtenidos se analizaron usando el software SDS 2.1 (Applied Biosystems) aplicando el método $\Delta\Delta C_t$ de cuantificación relativa.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 300 176 B1

TABLA 3

Lista de los 45 genes que mejor discriminan entre muestras de próstata tumoral y próstata normal

Genes sobreexpresados en próstata tumoral		Genes infraexpresados en próstata tumoral	
Símbolo del gen	Cluster Unigene	Símbolo del gen	Cluster Unigene
PP3111	Hs.514599	DDR2	Hs.275757
CAMKK2	Hs.297343	CLU	Hs.436657
ZNF85	Hs.37138	TP73L	Hs.137569
MYO6	Hs.149387	SNAI2	Hs.360174
SND1	Hs.122523	ETS2	Hs.517296
NONO	Hs.533282	KRT5	Hs.433845
ICA1	Hs.487561	TGFBR3	Hs.482390
ABCC4	Hs.508423	GSTP1	Hs.523836
PYCR1	Hs.458332	ROR2	Hs.98255
ZNF278	Hs.517557	LAMB3	Hs.497636
TACSTD1	Hs.692	BPAG1/DST	Hs.485616
APOC1	Hs.110675	CSTA	Hs.518198
BIK	Hs.475055	CX3CL1	Hs.531668
HOXC6	Hs.820	GJA1	Hs.74471
CDK5	Hs.166071	BNIP2	Hs.283454
AMACR	Hs.508343	PER2	Hs.58756
LASS2	Hs.285976	EPHA2	Hs.171596
HPN	Hs.182385	FOXO1A	Hs.370666
NME1	Hs.118638	FOXF1	Hs.155591
PRDX4	Hs.83383	-	-
GJB1	Hs.333303	-	-
SYNGR2	Hs.464210	-	-
SIM2	Hs.146186	-	-
EIF3S2	Hs.530096	-	-
NIT2	Hs.439152	-	-
FOXA1	Hs.163484	-	-

ES 2 300 176 B1

Para estas determinaciones, el material microdisecionado correspondió únicamente a células epiteliales puras, tanto a partir de tumores como a partir de tejido prostático normal.

5 Este primer conjunto cuidadosamente seleccionado de 45 genes proporcionó una alta capacidad de discriminación entre muestras normales y tumorales. La selección de estos genes se realizó en función de tres criterios: (1) la capacidad de cada gen de discriminar muestras normales de tumorales en el análisis de expresión sobre microarrays Affymetrix HGF (valores de la Tabla 6), es decir, aquellos genes con valores de *p* más significativos; (2) el interés biológico de los mismos, tomando datos funcionales y de expresión previamente descritos en la literatura científica; y (3) en la medida de lo posible, la existencia de anticuerpos comerciales específicos de las correspondientes proteínas, para una posterior validación de la expresión mediante inmunoensayos, incluyendo determinaciones inmunohistoquímicas.

De hecho, este subconjunto de genes incluye correctamente dentro del grupo de muestras tumorales una muestra que se agrupaba incorrectamente en el análisis transcriptómico global mediante FADA. [Figura 2].

15 Más concretamente, para muestras no microdisecionadas se comprobó por este método que, de los 26 genes incluidos en el Chip Diagnóstico 1 que se consideró sobreexpresados en tumores mediante el análisis por microarrays Affymetrix HGF, 13 genes (50%) presentan también niveles más elevados en tumores que en tejido no tumoral en la determinación cuantitativa por RT-PCR en tiempo real. En el caso de los 19 genes que se encontraron infraexpresados en tumores mediante la determinación sobre microarrays, de los 18 genes que fueron detectables, los 18 (95%) se encontraron infraexpresados mediante RT-PCR en tiempo real, en el análisis de muestras no microdisecionadas. Cuando se efectuó la determinación cuantitativa sobre muestras microdisecionadas (es decir, comparando epitelios puros tumorales con epitelios puros normales de los mismos individuos), encontramos que, de los 26 genes seleccionados como sobreexpresados en tumores, solamente 9 (34.6%) también se encontraban sobreexpresados en la mayoría de muestras mediante cuantificación de transcritos por RT-PCR en tiempo real. En esta determinación sobre muestras microdisecionadas, de los 19 genes considerados como infraexpresados en tumores tras los análisis sobre microarrays, 18 fueron evaluables, y de éstos, 15 (83.3%) también se encontraron infraexpresados en la mayoría de muestras microdisecionadas mediante determinación cuantitativa por RT-PCR en tiempo real. Por tanto, de los 45 genes valorables del Chip Diagnóstico 1 (26 sobreexpresados y 19 infraexpresados), 24 (9 sobreexpresados y 15 infraexpresados) han sido validados en sus respectivos perfiles de expresión mediante RT-PCR en tiempo real sobre epitelios puros microdisecionados por láser. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las validaciones con muestras no microdisecionadas y con muestras microdisecionadas, se seleccionaron aquellos genes que fueron validados en ambos análisis, y de esta forma se obtuvo un conjunto de 22 genes (7 sobreexpresados y 15 infraexpresados, ver Tabla 4). Tomando los datos de expresión sobre microarrays Affymetrix HGF correspondientes a estos 22 genes, se comprobó que este pequeño subconjunto de datos de expresión permite una perfecta discriminación entre muestras normales y tumorales, con un alto valor estadístico [Figura 4].

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 4

Lista de los 22 genes que mejor discriminan entre muestras de próstata tumoral y próstata normal

Genes sobreexpresados en próstata tumoral		Genes infraexpresados en próstata tumoral	
Símbolo del gen	Cluster Unigene	Símbolo del gen	Cluster Unigene
TACSTD1	Hs.692	FOXO1A	Hs.370666
ABCC4	Hs.508423	TGFBR3	Hs.482390
MYO6	Hs.149387	CLU	Hs.436657
GJB1	Hs.333303	ROR2	Hs.98255
HPN	Hs.182385	SNAI2	Hs.360174
AMACR	Hs.508343	GSTP1	Hs.523836
APOC1	Hs.110675	BPAG1/DST	Hs.485616
		KRT5	Hs.433845
		CSTA	Hs.518198
		LAMB3	Hs.497636
		EPHA2	Hs.171596
		ETS2	Hs.517296
		CX3CL1	Hs.531668
		GJA1	Hs.74471
		PER2	Hs.58756

Usando criterios aún más estrictos de validación por RT-PCR en tiempo real para la selección de genes sobreexpresados o infraexpresados en tumores, y teniendo en cuenta los compartimentos en los que se había deducido que se expresaba cada gen a partir de sus perfiles de expresión, se pudo identificar un subconjunto aún más restringido de 14 genes (6 sobreexpresados y 8 infraexpresados en tumores, ver Tabla 5). Tomando de nuevo los datos de expresión correspondientes a estos 14 genes obtenidos para todas las muestras de partida sobre microarrays Affymetrix HGF, se comprobó que este reducido conjunto también discrimina con alta significación estadística las muestras tumorales de las muestras de próstata no tumoral [Figura 5].

ES 2 300 176 B1

TABLA 5

Lista de los 14 genes que mejor discriminan entre muestras de próstata tumoral y próstata normal

Genes sobreexpresados en próstata tumoral		Genes infraexpresados en próstata tumoral	
Símbolo del gen	Cluster Unigene	Símbolo del gen	Cluster Unigene
TACSTD1	Hs.692	SNAI2	Hs.360174
ABCC4	Hs.508423	GSTP1	Hs.523836
MYO6	Hs.149387	BPAG1/DST	Hs.485616
HPN	Hs.182385	KRT5	Hs.433845
AMACR	Hs.508343	CSTA	Hs.518198
APOC1	Hs.110675	LAMB3	Hs.497636
		EPHA2	Hs.171596
		CX3CL1	Hs.531668

Por tanto, se considera estos subconjuntos de 45, 22 y 14 genes como una signatura transcripcional validada experimentalmente en este estudio para la discriminación con alto poder estadístico de muestras tumorales y muestras no tumorales de tejido prostático. En la presente invención, se han comprobado también subconjuntos aún más reducidos, de dos genes, capaces de discriminar con alta significación estadística las muestras tumorales de las muestras de próstata no tumoral (Figuras 6 y 7).

Ejemplo 3

Técnica inmunohistoquímica utilizada sobre los microarrays de tejido

Las micromatrices ("microarrays") de tejido fueron construidas usando un instrumento Beecher (Beecher Instruments) y una aguja de 1 mm de diámetro. Se construyeron tres microarrays diferentes, conteniendo zonas seleccionadas de muestras de tejido prostático normal, tumoral y de PIN, previamente incluidas en parafina. Como marcadores de orientación de las muestras dentro de las matrices, se usaron bloques de tejido de pulmón, previamente incluidos en tres tintas de colores diferentes, y colocados en diferentes zonas del microarray. Se realizaron cortes completos de los microarrays y se tiñeron con hematoxilina-eosina para confirmar la calidad. Se utilizaron cortes de dos micrómetros de grosor montados en portaobjetos de vidrio recubiertos de xileno (Dako, Carpintería, Calif., USA) para las tinciones inmunohistoquímicas. Estas se realizaron con el sistema Techmate 500 (Dako), usando para la detección el sistema Envision (Dako). Brevemente, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas con series graduales de alcoholes y agua. Para la detección de MYO6 se realizó una desmascaración de antígeno en una olla a presión con tampón citrato a pH 6 durante 5 min. Para los antígenos EPHA2 y CX3CL1 no se realizó este tratamiento. A continuación se incubaron los microarrays con los anticuerpos primarios durante 30 min (dilución 1/100 para MYO6, anticuerpo monoclonal de ratón, adquirido de Sigma, Missouri, USA; dilución 1/50 para EPHA2, anticuerpo monoclonal de ratón, adquirido de Sigma; y dilución 1/200 para CX3CL1, anticuerpo policlonal de cabra, adquirido de R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) y se lavaron en la solución tamponada ChemMate (Dako). Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 7.5 min en la solución de bloqueo de peroxidasa ChemMate (Dako), y después se incubó durante 30 min con un polímero marcado con peroxidasa. Después de lavar con la solución tamponada ChemMate, los microarrays fueron incubados con la solución del sustrato cromogénico diaminobenzidina, lavados con agua, contratñidos con hematoxilina, deshidratados y montados.

Los resultados fueron analizados por un patólogo. Se evaluaron dos aspectos de las inmunohistoquímicas: por un lado, el porcentaje de tinción epitelial, valorado de 0 a 100%, y por otro, la intensidad de dicha tinción, valorada en nula (0), débil (1), moderada (2) o intensa (3). También se analizó el patrón de expresión de cada una de las proteínas. Se consideró que una muestra presentaba sobreexpresión o infraexpresión de una proteína respecto a otra muestra, cuando la diferencia del porcentaje de tinción epitelial entre las dos muestras era superior al 20% y/o la intensidad era al menos un grado diferente.

ES 2 300 176 B1

TABLA 6

Datos numéricos que corresponden a los niveles de expresión de los genes indicados en la primera columna para las muestras que se indican en la primera fila

	Símbolo del gen	PC17	17N	17T	HeLa	RWPE.1	6T	18S
5								
10	ABCC4	7,01894144	10,4613757	11,6230748	8,37260766	7,50159596	10,8634026	7,09213398
	AMACR	8,68108886	7,96926986	12,8351796	8,39624468	7,34379933	10,2225514	7,5281908
	APOC1	7,98525042	7,80815015	9,06457735	8,1481063	8,24110628	8,46054204	8,10230296
15	BIK	8,72048074	9,26375117	9,64501802	7,62614321	7,90914969	10,4011472	7,55835806
	BNIP2	8,16566105	7,80079673	7,18051408	8,2173358	8,89602213	7,06987928	8,07765999
	BPAG1	10,8672916	7,30166451	6,01919471	5,20003457	8,72091247	6,00368215	5,08879459
20	CAMKK2	9,737646	9,70184651	10,370831	10,0657809	9,73526508	11,1595365	9,76286829
	CDK5	8,568005	7,70409083	8,60235141	9,23623118	8,94813497	8,14872131	7,9070929
	CLU	6,51221674	10,8940133	8,93030445	9,9730063	6,84752844	8,4818287	11,5912177
25	CSTA	11,7195251	8,14146382	6,60991459	5,88939882	10,3088495	6,33161278	5,8571188
	CX3CL1	8,88988776	10,0243526	9,00472634	7,4931274	7,37948345	8,76551159	10,3847154
	DDR2	7,41767027	8,95529175	8,33788988	8,71221281	7,47395843	8,72937805	9,96868172
	EIF3S2	10,7992799	10,561861	10,9027349	10,8741758	11,3019077	10,7176234	10,476417
30	EPHA2	9,70820466	7,49934765	7,16421139	8,11270183	9,75777822	7,38790777	7,47322296
	ETS2	9,47553159	9,77888956	8,42741684	9,18178376	8,92309412	7,68369387	8,3554048
	FOXA1	9,02905242	10,0313732	10,8553978	7,4232805	6,49892159	10,8676969	6,42851047
35	FOXF1	7,0642855	9,85003934	8,75526704	7,00736919	6,94349969	8,58135979	10,8835825
	FOXO1A	8,91078537	9,03902761	8,24237988	7,92187059	8,23887082	8,23140389	9,00659083
	GJA1	11,2901588	11,2772941	9,54483514	5,26350546	7,36129935	9,89041451	11,3069706
40	GJB1	7,64303997	7,69738283	8,01763073	7,87662152	7,67073411	9,38503063	7,5918705
	GSTP1	12,0075611	10,130881	9,04306561	7,89947839	12,2896721	8,76328398	10,3019874
	HOXC6	7,18359621	7,06346651	10,8797062	8,99023293	7,79906711	9,02764744	6,93338044
45	HPN	7,67694465	8,13029835	9,17676877	7,9509903	7,77658452	9,75933907	6,42802676
	ICA1	7,40640467	7,8223028	8,27952589	7,02354553	7,24834786	8,32881152	7,28397149
	KRT5	13,6426559	10,2949882	8,80835698	7,92292386	13,7036552	9,01522843	7,71264456
50	LAMB3	12,0274355	7,00889594	6,61191666	7,35030303	8,8988928	6,50613336	6,06671194
	LASS2	9,92813099	10,5139364	10,8480268	10,5626413	10,4168201	10,8673543	10,6740624
	MYO6	8,88009387	8,08434501	9,99425853	6,03962017	6,67780748	10,2684098	6,92339771
55	NIT2	9,61978598	8,75482274	9,29367533	10,4865837	10,1578698	8,82951705	8,46774918
	NME1	10,8911876	10,0882175	11,0335317	12,907781	11,9095752	10,6540593	8,81423984
	NONO	11,8163895	12,0151783	12,2094843	12,5281615	12,0816142	12,5257706	12,0667089
60	PER2	7,84799328	9,89444514	8,58175271	7,03180711	8,36908903	8,98743391	8,73764612
	PP3111	8,44084113	8,38662752	9,02985592	9,17312402	8,62674245	9,27000731	7,96829081

Continuación

ES 2 300 176 B1

PRDX4	10,315142	10,7094529	11,2458939	12,090736	10,445978	11,0929883	10,0920133
PYCR1	8,19237492	8,25290876	9,25640319	9,79569033	8,82448729	9,07383443	7,68839803
ROR2	6,14361889	6,27470443	6,0394316	6,58708198	5,7583719	6,24186092	6,66175193
SIM2	7,80827202	7,82038456	8,7305589	7,80799199	8,57755541	10,1050121	6,84667269
SNAI2	11,2678841	8,66396438	7,11405551	7,9600653	11,0353323	7,02373053	11,1503284
SND1	10,6173702	10,4907323	10,9569735	11,1427315	11,0964041	11,4362721	10,329777
SYNGR2	11,4162047	11,6941476	12,1766787	10,9151129	8,31027438	11,9141037	10,4248928
TACSTD1	7,46799526	10,0009621	10,8087613	5,989988	7,01683131	11,4197111	6,26163501
TGFBR3	6,2685964	8,35927604	7,03093241	7,66104789	6,57384193	6,86915073	10,2204548
TP73L	11,8613758	8,79341279	7,81792381	6,93485108	10,3875912	7,60044072	6,69592993
ZNF278	7,26124898	7,80704616	8,19354373	7,56542099	8,01614261	9,16707999	8,21306791
ZNF85	7,38699349	7,39620968	7,60984772	7,40574541	7,54405141	7,73752119	7,50789492

20

Símbolo del gen	18T	7N	7T	8T	1S	19T	9N
ABCC4	11,2271232	10,1963771	11,2746849	11,6944641	6,76257618	12,5994078	10,6776932
AMACR	12,1012097	7,98499564	8,38263711	11,2314667	8,07566602	12,2739694	8,10377527
APOC1	8,69754985	7,99587538	8,62266379	8,35568323	8,72869293	8,74838729	8,06936237
BIK	9,7003375	9,63258805	9,92888094	10,0777295	7,40838687	10,9448489	9,61936506
BNIP2	6,89861956	7,58226247	7,22528551	7,17294322	7,74667599	6,6702639	7,25782981
BPAG1	5,15851378	7,96957079	6,24850255	5,19641455	5,05811969	5,01998749	7,17262223
CAMKK2	11,5588663	9,87339804	11,0697585	11,1124115	9,8876309	11,5419852	10,6559128
CDK5	8,4242262	7,99945359	8,14608123	7,94815471	8,22560766	8,67233447	7,9192629
CLU	8,79369781	10,3280124	9,29143062	9,63955038	11,1643832	9,33597842	9,96149275
CSTA	5,77281025	7,95157917	7,25880051	6,09337536	6,34432573	7,24725807	8,49120307
CX3CL1	8,44186449	10,676204	8,63995295	9,08023699	9,15927735	8,44309163	9,86868202
DDR2	8,16745773	9,06621868	8,41740413	8,0789186	10,2486776	8,13530894	8,91851077
EIF3S2	10,9105817	10,3865965	10,6113503	10,5929438	10,3249773	11,0126954	10,2311564
EPHA2	7,17678801	7,89459938	7,15214688	7,33594481	7,44620259	7,14911012	7,56923343
ETS2	6,58405245	9,81248202	8,01769991	8,04258678	7,99424304	7,76639891	8,56305734
FOXA1	10,8011387	10,3592769	10,8530129	10,8797191	6,4191556	10,9823286	10,6645469
FOXF1	8,03302684	9,9046605	8,96329955	8,55239174	10,4449179	8,15703385	9,74120529
FOXO1A	8,54879356	8,68419304	8,59613866	8,26334093	8,95850628	7,81527162	8,51103171
GJA1	8,54551182	11,1134211	10,0046213	9,72701997	11,1550828	9,25171382	10,9683059
GJB1	9,46969306	7,66786411	8,71718679	9,61532346	7,36786826	10,2194731	8,4244208
GSTP1	8,36261156	9,86084926	9,53076751	8,5587529	10,4467656	8,54149475	9,79901801
HOXC6	11,339035	7,27473392	9,34627449	10,7670458	7,19492311	10,3374135	7,24618075

Continuación

65

ES 2 300 176 B1

	HPN	10,6561446	7,3060213	10,4190497	10,9288653	7,13195771	10,2213461	8,84860895
	ICA1	8,25441438	7,63473075	8,15142808	8,29386454	7,399157	8,68291907	7,76154604
5	KRT5	7,65361029	10,996713	9,95219888	7,87476248	7,69837501	7,44972423	10,9700824
	LAMB3	6,24370552	7,34218968	7,00141211	6,24640714	6,27950191	6,30696054	7,12132677
	LASS2	11,2221976	10,6505211	10,8624308	11,0606051	10,4854995	10,9970835	10,6469129
10	MYO6	10,2624067	8,13317622	9,90336178	9,41819058	6,44314341	9,08177328	7,80745759
	NIT2	9,34291532	8,67741234	9,15596053	9,43805857	8,52542787	9,82304069	8,6660776
	NME1	10,0531402	9,5086149	10,5082895	10,3384312	9,64226277	10,6409689	9,64410232
15	NONO	12,1516229	11,9984819	12,1125889	12,2838717	12,1986165	12,2481884	11,9934848
	PER2	7,47895612	9,99241721	9,09280918	8,02478892	8,93942007	7,96185138	8,78048182
	PP3111	9,06774789	8,53884704	9,59167222	9,35656156	8,21257069	9,41421356	9,02282236
20	PRDX4	11,8467771	10,4503516	11,3533176	11,5130603	9,84736148	11,645151	10,7094521
	PYCR1	9,65592092	8,12356225	9,01217629	9,04589705	8,4375687	9,56051736	8,50885394
	ROR2	5,81120902	6,4418307	6,09783631	6,17662552	7,04921286	5,82903204	7,01585067
	SIM2	9,59602723	7,26551652	8,99252974	9,50626016	7,51297683	9,84470392	8,06004373
25	SNAI2	7,62802062	9,63303817	7,95774174	7,83829665	11,3259327	7,50489613	8,50108358
	SND1	11,4321273	10,5236746	11,1628238	11,3997514	10,6089806	11,1611431	10,9241905
	SYNGR2	12,2782432	11,5294606	11,9930355	12,3009771	9,84340774	12,6146706	11,8216618
30	TACSTD1	11,4203004	10,1107088	10,885747	11,3747192	6,5805044	11,3564186	9,59057446
	TGFBR3	7,55120446	8,02542909	7,53921394	7,24467127	8,0425394	7,28185016	7,91328107
	TP73L	7,01981993	9,47834975	8,84440292	6,62033628	6,81020202	6,49145679	9,48596872
35	ZNF278	8,40430883	7,8764079	8,13858036	8,46504808	8,0258282	8,6522079	8,06108653
	ZNF85	7,5170014	7,3222536	7,69830094	7,610817	7,55815322	7,58933786	7,3856278
40	Símbolo del gen	9T	20T	10T	PC23	2S	12N	12T
	ABCC4	11,9172056	11,8666953	11,8305509	7,00074367	7,73711574	10,7213306	11,8803074
45	AMACR	11,9137503	12,3148691	12,686271	8,19611317	7,80365344	7,9547764	12,6317357
	APOC1	9,25696795	8,46908778	8,74221031	8,24086463	9,09325789	8,21965406	8,17480668
	BIK	10,3816475	10,2355408	10,4208791	8,77225842	8,1790476	9,84535521	10,2826195
50	BNIP2	7,0962776	7,03616692	6,90589636	7,85213858	7,52775825	7,45985555	6,90690277
	BPAG1	5,09828283	6,04496312	5,7789774	10,0520177	5,21978918	8,16139572	5,53123132
	CAMKK2	11,0854414	10,716776	11,0647166	9,58164524	9,83063525	9,86036006	11,3006859
	CDK5	8,18534228	8,30003247	8,33478769	8,26339132	8,1439549	7,74196732	8,21793045
55	CLU	7,91627628	9,14652294	8,65753757	6,65237257	11,8860275	10,854299	8,32138017
	CSTA	6,49862846	6,90773272	5,89922147	11,0523625	6,24277999	8,33648741	6,27402215
	CX3CL1	7,99163394	8,88640628	8,15991859	8,56298653	8,66255417	10,5781947	8,61855428
60	DDR2	8,06360361	8,03792758	8,47150703	7,48635132	10,5650926	9,28002014	8,10022071

Continuación

ES 2 300 176 B1

	EIF3S2	10,8210251	10,9882272	11,0577539	10,7062572	10,2233131	10,2738356	11,1034097
	EPHA2	7,21012339	7,06902863	7,29855649	9,86704223	7,33431497	8,01389782	7,26052422
5	ETS2	7,39836695	7,67103368	7,45179102	8,92145676	8,42658776	9,77172875	7,64306615
	FOXA1	11,8216618	10,7574154	10,778755	8,3575482	7,90333524	10,1801846	10,9857394
	FOXF1	8,0014319	8,43369605	8,23295854	6,9259667	10,8964535	9,44419125	8,0822311
10	FOXO1A	8,43249743	7,97606323	8,24438446	8,29401042	8,60797096	8,64648558	8,2992001
	GJA1	7,62007523	9,69771636	9,58136618	10,8074789	10,9017509	11,1092323	9,07115329
	GJB1	8,1704462	9,79766466	10,1438614	7,53366868	7,91726826	7,40596851	10,2352758
15	GSTP1	8,27026785	9,22504244	8,87428302	12,1954488	10,3820169	10,3329038	8,58331838
	HOXC6	10,1430958	9,59059802	10,1496822	7,32780121	6,82549442	7,30894113	9,34228709
	HPN	10,6062198	10,1904939	10,6235615	7,36632189	7,09007426	8,30883909	11,0701075
20	ICA1	7,64300295	8,48218665	8,77857582	7,61796929	7,55625552	7,74647255	8,7778574
	KRT5	7,56688726	9,90191796	9,0722628	14,0633331	8,58576209	10,8761262	8,85417384
	LAMB3	6,23981376	6,65204117	6,73403046	11,8603044	6,41607574	7,76250751	6,67757932
25	LASS2	11,0625167	11,0266773	10,9537084	10,1227796	10,5322732	10,8868142	11,1010842
	MYO6	9,02253898	8,48102562	10,1881512	8,11527081	6,41650094	8,52772725	10,8986622
	NIT2	9,91469278	9,23855062	9,37249237	9,34113599	8,35078053	8,33930438	9,50783613
	NME1	10,5829942	10,8343772	11,006816	11,0178073	9,50191563	9,49069094	11,2762249
30	NONO	12,0228516	12,3080217	12,5132073	11,898023	12,1410995	11,9104189	12,4407576
	PER2	7,23254734	8,64635518	8,58677335	7,80934006	8,97395062	9,47096163	8,65469168
	PP3111	9,2413702	9,66725561	9,45465288	9,0435806	8,96214303	8,47818909	10,4966201
35	PRDX4	11,4998198	11,636186	11,4769312	10,6760176	9,64941822	10,0816307	11,2610282
	PYCR1	9,30310099	9,61332877	9,42395928	8,65802373	8,50150214	7,81547857	10,0492023
	ROR2	6,01020411	6,08957047	5,97318364	6,15034361	7,0043655	7,2274926	6,08277438
40	SIM2	9,22250128	9,75804661	9,56257978	8,18699921	7,41762197	7,6488079	10,0277817
	SNAI2	6,38581045	7,37204318	7,17204849	11,1402032	11,620286	8,18863116	7,03459772
	SND1	11,4811266	11,2599	11,2294704	10,577137	10,4735652	10,4302397	11,2681063
45	SYNGR2	12,3733994	12,3232535	12,3456541	11,3345889	9,71075107	11,479208	12,8233699
	TACSTD1	10,7356762	11,7266979	11,8309216	7,59472761	6,2337136	10,1461824	11,6233819
	TGFBR3	6,75824972	7,11710537	6,87298173	6,38526808	8,39942967	7,99807616	6,78688093
50	TP73L	6,68778861	8,0879124	7,91161675	11,352239	6,88907193	9,19017183	7,40700292
	ZNF278	8,18649067	8,43322063	8,89554478	7,69469089	8,01165956	7,99509545	8,93017065
	ZNF85	7,58805419	7,57040324	7,64225531	7,55798388	7,21574937	7,4252656	7,53454756

55

60

65

ES 2 300 176 B1

Símbolo del gen	13N	13T	14N	14T	11T	15T	16T
5 ABCC4	9,87284943	10,7023005	10,4511337	11,8936811	12,0107951	11,8271787	11,819038
AMACR	7,23394577	10,9916346	7,10466664	11,6194729	10,2516113	12,2001907	12,3721041
APOC1	8,10633034	8,62785184	8,10948805	8,72052704	8,74113469	8,7104815	8,45999773
10 BIK	9,36912096	9,90651551	9,46838994	10,1726757	10,7442765	10,0776735	10,6479084
BNIP2	7,65293558	7,1300569	7,96998676	7,25981586	6,95776104	6,96775088	6,88542751
BPAG1	8,94788313	7,00538757	10,0929067	5,39972453	5,86105537	6,16669793	5,25432662
15 CAMKK2	10,2352501	10,4407544	10,0805183	10,8321742	10,6537179	10,5318784	11,389258
CDK5	7,88525167	8,04634018	7,50770634	8,03387344	8,433982	8,33204895	8,80647145
CLU	10,0989244	8,73538286	10,9139483	10,5259445	8,40080486	8,6119414	7,58396723
15 CSTA	7,61595445	6,98755382	8,71605343	7,03633463	6,60909254	6,51969414	6,50639928
20 CX3CL1	9,92042383	8,89307138	10,7285592	8,89535509	8,43764378	9,2409657	8,15206923
DDR2	8,26986333	8,05580274	9,07930741	8,99650756	7,9552987	8,05775815	7,55224167
EIF3S2	10,4962482	10,940806	10,3916035	10,6831212	11,0231656	10,9835197	11,0540775
25 EPHA2	8,28777408	7,62973479	8,34062081	7,21294732	7,17000907	7,38265068	7,08239453
ETS2	10,137787	8,91562764	9,97872769	8,85796935	7,19962252	8,63750489	8,00813095
FOXA1	10,1193691	10,665893	9,9001488	10,8102308	10,9534422	10,6973363	11,5363974
30 FOXF1	10,4228639	8,78810962	9,52827881	10,2866597	8,06866022	8,64469714	7,49981135
FOXO1A	9,09845272	8,38652775	9,41526303	8,81821241	8,39295341	8,30528633	7,62815549
GJA1	10,9948259	10,3121276	11,5834059	10,4540912	9,4185747	9,70841654	8,91124804
35 GJB1	8,35342714	9,55748737	7,39028241	8,88234825	10,2712517	9,40653092	10,0348341
GSTP1	9,90950043	9,04257025	10,3100795	10,0777898	9,00409974	8,98497999	8,60633725
HOXC6	7,23847465	9,99165798	6,97968714	9,0004868	10,5918901	7,36678855	10,8817903
40 HPN	8,32513868	9,7180687	7,35776409	10,0169966	10,5980528	10,2320083	11,0611131
ICA1	7,75237235	8,27457596	8,02554991	8,06257195	8,49418617	8,39530267	8,47294637
KRT5	10,9508705	9,76644376	12,1629672	7,44473053	9,64157957	9,46641915	8,45819028
45 LAMB3	7,38026052	6,59574533	9,06273995	6,39364642	6,59601678	6,55864806	6,63258024
LASS2	10,7164064	10,8330488	10,4867107	11,1811361	11,095375	10,9263813	10,7735895
MYO6	7,53960908	9,72015889	8,07733834	8,70022299	10,6315373	9,17690886	8,03484288
50 NIT2	8,31073282	8,88759289	8,19132807	8,87114075	9,89397532	9,18315645	9,74235571
NME1	9,94852791	10,5155577	10,5564837	10,2727076	10,5542469	10,3195047	11,3315375
NONO	12,055439	12,2627147	11,7064367	11,9732265	12,5242129	12,2909779	12,4518149
55 PER2	10,0941933	8,76292852	10,3200602	8,87004769	8,38657379	8,74722305	8,09258734
PP3111	8,63022636	9,14033715	8,72580833	9,29615413	9,40440095	9,70281354	9,83199096
PRDX4	10,4308487	11,3358816	10,0641533	10,6523311	11,3983874	11,1376659	11,8621885
60 PYCR1	8,39293341	9,19236757	7,96330584	9,2152436	9,12708041	9,32463429	9,55066892

continuación

ES 2 300 176 B1

	ROR2	6,90060538	6,13096573	6,50870306	6,18072898	5,88782188	6,24507223	5,84650771
	SIM2	8,27627143	8,64331076	7,92024044	8,62597651	9,90131372	9,47502981	10,8614305
5	SNAI2	9,08242588	7,8449708	8,76110432	7,82298177	7,15025613	6,89855193	6,07213975
	SND1	10,7021338	10,6168193	10,850709	10,7493318	11,4544134	11,2395792	11,4547764
	SYNGR2	11,6317612	11,9190577	11,2983082	12,1101888	12,043799	12,279038	12,7500744
10	TACSTD1	10,0066892	11,5231648	10,3110571	11,277493	11,8558022	11,2057988	11,5306351
	TGFBR3	8,63782836	7,77760712	7,67851529	8,08520398	7,13647148	7,27343835	6,87345209
	TP73L	9,01973146	7,89492281	9,72592518	6,60008695	7,81793676	7,93842225	7,38255717
15	ZNF278	7,79027079	8,33786475	7,19809893	7,91250759	8,85698728	8,59516602	8,46917838
	ZNF85	7,2808244	7,70416086	7,07571111	7,73406311	7,64220123	7,82936227	7,66607631
20	Símbolo del gen	21N	21T	3T	4T	22T	5T	PoolN
	ABCC4	10,7987406	11,3728689	11,5757011	12,0648794	11,2786267	11,9156492	10,3454557
25	AMACR	8,69577257	11,99929	11,0447135	10,1108062	12,8839261	11,5908069	7,98152182
	APOC1	8,52264152	8,97659989	8,9263806	8,50670267	8,85075098	8,72836793	8,16064021
	BIK	9,77191275	10,3833188	10,197079	11,1866636	9,99644752	10,5948164	9,52731013
30	BNIP2	7,23818697	7,13906841	7,23818697	7,01612877	7,00613392	6,98368469	7,37653792
	BPAG1	7,2381955	5,8171571	6,45538392	5,23069383	5,92832715	5,90277552	8,01945315
	CAMKK2	10,7747453	11,2779526	10,886789	11,08344	10,59382	11,305732	10,0967028
35	CDK5	7,95270947	8,46120132	8,25484113	8,4811559	8,12246741	8,54523175	7,81283032
	CLU	9,35268604	8,51217761	8,37356534	7,48221854	8,57705227	8,9700039	10,5958875
	CSTA	7,9531818	6,84973913	6,7888125	5,73748113	6,8515908	7,00949205	8,4014576
40	CX3CL1	9,02463229	8,55932974	9,20807982	7,76909535	8,57102024	9,12691829	10,0929465
	DDR2	8,74803007	8,41740413	8,42036901	7,99142192	8,57332702	8,29318467	8,96671113
	EIF3S2	10,5401121	11,1064603	10,7196193	10,8775701	10,4832358	10,9083898	10,3394479
45	EPHA2	7,68132884	7,28836732	7,43604758	7,25549484	7,35055576	7,33056725	7,75125282
	ETS2	8,69471469	7,53562961	8,73896304	6,59356647	7,65836985	8,761367	9,00524251
	FOXA1	10,7093697	10,7503471	10,7138659	11,2053323	10,7143607	10,7517395	10,3477084
50	FOXF1	9,21318089	8,32823723	8,61439456	6,80094862	8,20420908	8,04615239	9,96185792
	FOXO1A	8,59994547	8,55377222	8,42533384	8,23321695	8,23364541	8,16604594	8,65463795
	GJA1	10,9466858	9,89211284	10,0047312	6,31306283	9,82556202	9,93968212	11,1323778
55	GJB1	8,48612454	9,11576612	9,04990338	9,00338667	8,57846816	9,35583043	8,05627572
	GSTP1	9,84513277	9,11867146	9,04897591	10,3268912	9,03178533	9,00149776	10,2176458
	HOXC6	7,1017041	10,8908235	8,49521171	8,40720678	11,1104435	9,77780259	7,36191248
60	HPN	8,31609284	9,64575	9,81476603	10,2938254	9,30031929	9,4467024	8,09737091
	ICA1	8,08266807	8,5863091	8,17044223	8,49784086	7,97177787	8,61104083	7,83970432
	KRT5	10,9449876	9,08366066	9,75663217	8,14317321	9,57025743	9,49768678	11,236332

Continuación

65

ES 2 300 176 B1

	LAMB3	7,5548769	6,71572298	6,75502602	6,63929214	6,9458567	6,73719738	7,72972549
	LASS2	10,7349071	11,0806776	10,7263753	10,8542195	10,8732259	10,9581809	10,4390986
5	MYO6	8,07722331	10,3375571	9,15013634	9,88691913	9,86050889	8,78526937	7,73393447
	NIT2	8,30010875	9,19644646	8,57290557	9,58081927	8,62370167	9,02821281	8,47501495
	NME1	10,017011	10,543603	10,2393309	11,1049441	10,4691113	10,7463599	9,90349677
10	NONO	12,1318017	12,5090225	12,2283024	12,3650511	12,2359642	12,1606526	11,9220344
	PER2	9,42182334	8,76605844	8,95087367	8,35302696	8,38888943	9,02323837	9,34269673
	PP3111	9,1081155	9,30457173	9,2177844	9,46601388	9,01106612	9,37842758	8,60821857
15	PRDX4	10,7020948	10,914888	11,1667704	11,2168946	10,9077281	11,465411	10,5237508
	PYCR1	8,83464147	9,14088089	9,05983097	10,054324	9,24170896	9,529762	8,5357301
	ROR2	6,31673771	6,09553418	6,18072898	6,03787627	6,19022785	5,81955849	6,50487963
	SIM2	8,50815671	10,0231992	9,87971696	8,57728725	8,37394598	9,50571774	7,8807152
20	SNAI2	9,52076395	7,41224256	7,53950566	6,15634517	7,72468052	6,64439486	9,51616646
	SND1	11,0489804	11,0917374	11,150879	11,7032092	10,9957737	11,0958036	10,7184297
	SYNGR2	12,0176656	12,2420085	12,0624561	12,5872779	12,0864775	12,2906617	11,5631324
25	TACSTD1	10,7426884	11,3855844	11,315745	11,1602475	10,9368481	10,8953779	10,1764533
	TGFBR3	7,11821992	6,8769741	6,72381038	6,67171728	6,82802005	7,32632724	8,88514945
	TP73L	9,6250737	8,22036617	8,41237385	7,18759024	8,3260262	7,60799673	9,30445875
30	ZNF278	8,22884119	8,70860977	8,45462287	9,11172891	8,35058651	8,31310439	7,76028418
	ZNF85	7,53391479	7,57548749	7,56171777	7,5835714	7,54405141	7,6510772	7,28360868

35 Referencias

1. **Brawley OW, et al. (1998).** The epidemiology of prostate cancer part I: descriptive epidemiology. *Semin. Urol. Oncol.* 16, 187-192.
2. **Simard J, et al. (2002).** Perspective: Prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology* 143, 2029-2040.
3. **DeMarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI (2003).** Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361, 955-964.
4. **Rubin MA, et al. (2004).** Quantitative determination of expression of the prostate cancer protein α -methylacyl-CoA racemase using automated quantitative analysis (AQUA). *Am. J. Pathol.* 163, 831-840.
5. **van't Veer LJ, et al. (2002).** Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536.
6. **van de Vijver MJ, et al. (2002).** A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347, 1999-2009.
7. **Lapointe J, et al. (2004).** Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 811-816.
8. **Rhodes DR, et al. (2002).** Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res.* 62, 4427-4433.
9. **Sancho E, et al. (1998).** Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in *in vitro* differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol. Cell. Biol.* 18, 576-589.
10. **Benedit P, et al. (2001).** PTOV1, a novel protein overexpressed in prostate cancer containing a new class of protein homology blocks. *Oncogene* 20, 1455-1464.
- 65 11. **Santamaria A, et al. (2003).** PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle. *Am. J. Pathol.* 162, 897-905.

ES 2 300 176 B1

12. **Santamaria A, et al. (2005)**. PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of Flotillin-1, a major protein of lipid rafts. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1900-1911.
13. **Lozano JJ, et al. (2005)**. Dual activation of pathways regulated by steroid receptors and peptide growth factors in primary prostate cancer revealed by Factor Analysis of microarray data. *BMC Genomics* 6, 109.
14. **Irizarry, R. A., et al. (2003)**. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 249-264.
15. **Bolstad, B. M., et al. (2003)**. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-193.
16. **Tukey, J. W. (1977)**. Exploratory data analysis. Addison-Wesley.
17. **Storey, J. D. and Tibshirani, R. (2003)**. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9440-9445.
18. **Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995)**. Controlling the False Discovery Rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 57, 289-300.
19. **Magee JA, et al. (2001)**. Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 5692-5696.
20. **Welsh JB, et al. (2001)**. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 61, 5974-5978.
21. **Dhanasekaran SM, et al. (2001)**. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.
22. **Klezovitch O, et al. (2004)**. Hepsin promotes prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Cell* 6, 185-195.
23. **Jiang Z, et al. (2001)**. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1397-1404.
24. **Rubin MA, et al. (2002)**. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 287, 1662-1670.
25. **Luo J, et al. (2002)**. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res.* 62, 2220-2226.
26. **Beach R, et al. (2002)**. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 1588-1596.
27. **Evans AJ (2003)**. Alpha-methylacyl CoA racemase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J. Clin. Pathol.* 56, 892-897.
28. **Jiang Z, Woda BA (2004)**. Diagnostic utility of alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) on prostate needle biopsy. *Adv. Anat. Pathol.* 11, 316-321.
29. **DeYoung MP, et al. (2003)**. Identification of Down's syndrome critical locus gene SIM2-s as a drug therapy target for solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4760-4765.
30. **Ratan RR (2003)**. Mining genome databases for therapeutic gold: SIM2 is a novel target for treatment of solid tumors. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 508-510.
31. **Aleman MJ, et al. (2005)**. Inhibition of Single Minded 2 gene expression mediates tumor-selective apoptosis and differentiation in human colon cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12765-12670.
32. **Bijl J, et al. (1996)**. Expression of HOXC4, HOXC5, and HOXC6 in human lymphoid cell lines, leukemias, and benign and malignant lymphoid tissue. *Blood* 87, 1737-1745.
33. **Alami Y, et al. (1999)**. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 738-745.
34. **Waltregny D, et al. (2002)**. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate* 50, 162-169.

35. **Miller GJ, et al. (2003)**. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. *Cáncer Res.* 63, 5879-5888.
36. **Ramachandran S, et al. (2005)**. Loss of HOXC6 expression induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* 24, 188-198.
37. **Lee WH, et al. (1994)**. 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.
38. **Lin X, et al. (2001)**. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. *Am. J. Pathol.* 159, 1815-1826.
39. **Yang A, et al. (2002)**. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet.* 18, 90-95.
40. **Signoretti S, et al. (2000)**. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am. J. Pathol.* 157, 1769-1775.
41. **Yoshida H, et al. (2004)**. Lessons from border cell migration in the Drosophila ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8144-8149.
42. **Varambally S, et al. (2005)**. Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cáncer Cell* 8, 393-406.
43. **Andres AC, et al. (1994)**. Expression of two novel eph-related receptor protein tyrosine kinases in mammary gland development and carcinogenesis. *Oncogene* 9, 1461-1467.
44. **Nemoto T, et al. (1997)**. Overexpression of protein tyrosine kinases in human esophageal cancer. *Pathobiology* 65, 195-203.
45. **Walker-Daniels J, et al. (1999)**. Overexpression of the EphA2 tyrosine kinase in prostate cancer. *Prostate* 41, 275-280.
46. **Ogawa K, et al. (2000)**. The ephrin-A1 ligand and its receptor, EphA2, are expressed during tumor neovascularization. *Oncogene* 19, 6043-6052.
47. **Zelinski DP, et al. (2001)**. EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells. *Cáncer Res.* 61, 2301-2306.
48. **Straume O, Akslen LA (2002)**. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression. *Am. J. Pathol.* 160, 1009-1019.
49. **Miyazaki T, et al. (2003)**. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cáncer* 103, 657-663.
50. **Kinch MS, et al. (2003)**. Predictive value of the EphA2 receptor tyrosine kinase in lung cancer recurrence and survival. *Clin. Cáncer Res.* 9, 613-618.
51. **Zeng G, et al. (2003)**. High-level expression of EphA2 receptor tyrosine kinase in prostatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* 163, 2271-2276.
52. **Koffman KT, et al. (2003)**. Differential EphA2 epitope display on normal versus malignant cells. *Cáncer Res.* 63, 7907-7912.
53. **Saito T, et al. (2004)**. Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. *Oncol. Rep.* 11, 605-611.
54. **Duxbury MS, et al. (2004)**. EphA2: a determinant of malignant cellular behavior and a potential therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 23, 1448-1456.
55. **Fox BP, Kandpal RP (2004)**. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 882-892.
56. **Wu D, et al. (2004)**. Prognostic value of EphA2 and EphrinA-1 in squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 94, 312-319.

ES 2 300 176 B1

57. **Thaker** PH, *et al.* (2004). EphA2 expression is associated with aggressive features in ovarian carcinoma. *Clin. Cáncer Res.* 10, 5145-5150.

58. **Nakamura** R, *et al.* (2005). EPHA2/EFNA1 expression in human gastric cáncer. *Cáncer Sci.* 96, 42-47.

59. **Herrem** CJ, *et al.* (2005). Expression of EphA2 is prognostic of disease-free interval and overall survival in surgically treated patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cáncer Res.* 11, 226-231.

60. **Hajra** KM, *et al.* (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cáncer. *Cáncer Res.* 62, 1613-1618.

61. **Uchikado** Y, *et al.* (2005). Slug expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cáncer Res.* 11, 1174-1180.

62. **Elloul** S, *et al.* (2005). Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cáncer* 103, 1631-1643.

63. **Martin** TA, *et al.* (2005). Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cáncer. *Ann. Surg. Oncol.* 12, 488-496.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata, que comprende el análisis, *in vitro*, en una muestra problema del nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados del grupo que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, FOXA1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFB3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2, FOXF1, MYO6 y ABCC4, donde la capacidad discriminadora entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminadora de los mismos genes por separado.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, donde los genes se seleccionan del grupo que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFB3, CLU, ROR2, ETS2, MYO6 y ABCC4, y donde la capacidad discriminadora entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminadora de los mismos genes por separado.
- 15 3. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde los genes se seleccionan del grupo que consiste en: TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, MYO6 y ABCC4, y donde la capacidad discriminadora entre muestras tumorales y no tumorales cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes de dicho grupo es mayor que la capacidad discriminadora de los mismos genes por separado.
- 20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos uno de los genes seleccionados del grupo es el gen MYO6.
- 25 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos uno de los genes seleccionados del grupo es el gen ABCC4.
- 30 6. Método según la reivindicación 4, donde el análisis del nivel de expresión del gen MYO6 se combina con el análisis del nivel de expresión de al menos un gen del grupo que consiste en: ABCC4, AMACR, BIK, BNIP2, CDK5, CSTA, DST, EIF3S2, EPHA2, ETS2, GJB1, HPN, NIT2, PYCR1, ROR2, TACSTD1 y TP73L.
- 35 7. Método según la reivindicación 5, donde el análisis del nivel de expresión del gen ABCC4 se combina con el análisis del nivel de expresión de al menos un gen del grupo que consiste en: CSTA, GJB1, GSTP1, HOXC6, HPN, LAMB3, MYO6, PRDX4 y TP73L.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el análisis del nivel de expresión de dichos genes se realiza determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción.
- 45 9. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se realiza mediante una amplificación por PCR, RT-PCR, RT-LCR, SDA o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos.
- 50 10. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo por chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo.
- 55 11. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo por chips de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.
12. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje.
13. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo mediante geles de electroforesis.
14. Método según la reivindicación 13, donde el análisis se lleva a cabo mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica.
15. Método según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.
- 60 16. Método, según la reivindicación 8, donde el análisis se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen mediante la utilización de nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.
- 65 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el análisis del nivel de expresión de dichos genes se realiza determinando el nivel de proteína codificada por el gen o fragmentos de la misma.

ES 2 300 176 B1

18. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante incubación con un anticuerpo específico.

19. Método según la reivindicación 18, donde el análisis se lleva a cabo mediante Western blot.

20. Método según la reivindicación 18, donde el análisis se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica.

21. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante geles de electroforesis.

22. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante chips de proteína.

23. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante ELISA o cualquier otro método enzimático.

24. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

25. Método según la reivindicación 17, donde el análisis se lleva a cabo mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen mediante la utilización de nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

26. Kit para el diagnóstico molecular de cáncer de próstata que comprende los reactivos y aditivos apropiados para detectar la variación en los niveles de expresión del gen o genes de acuerdo con el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la sobreexpresión de los genes MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR o APOC1 o la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3 o EPHA2 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la sobreexpresión de los genes MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1 o GJB1 o la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2 o ETS2 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

29. Método según la reivindicación 1, donde la sobreexpresión de los genes MYO6, ABCC4, TACSTD1, HPN, AMACR, APOC1, GJB1, PP3111, CAMKK2, ZNF85, SND1, NONO, ICA1, PYCR1, ZNF278, BIK, HOXC6, CDK5, LASS2, NME1, PRDX4, SYNGR2, SIM2, EIF3S2, NIT2, o FOXA1 o la infraexpresión de los genes CX3CL1, SNAI2, GSTP1, DST, KRT5, CSTA, LAMB3, EPHA2, GJA1, PER2, FOXO1A, TGFBR3, CLU, ROR2, ETS2, TP73L, DDR2, BNIP2 o FOXF1 se utiliza como diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico de la progresión del cáncer de próstata o de una condición pre-maligna del mismo o como pronóstico del riesgo de recurrencia de dicha enfermedad.

30. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la capacidad discriminatoria cuando se determinan conjuntamente los niveles de expresión de dos o más genes es un 1%, preferentemente un 10%, más preferentemente un 25%, aún más preferentemente un 50% mayor que la capacidad discriminatoria de al menos uno de los genes por separado.

Figura 1

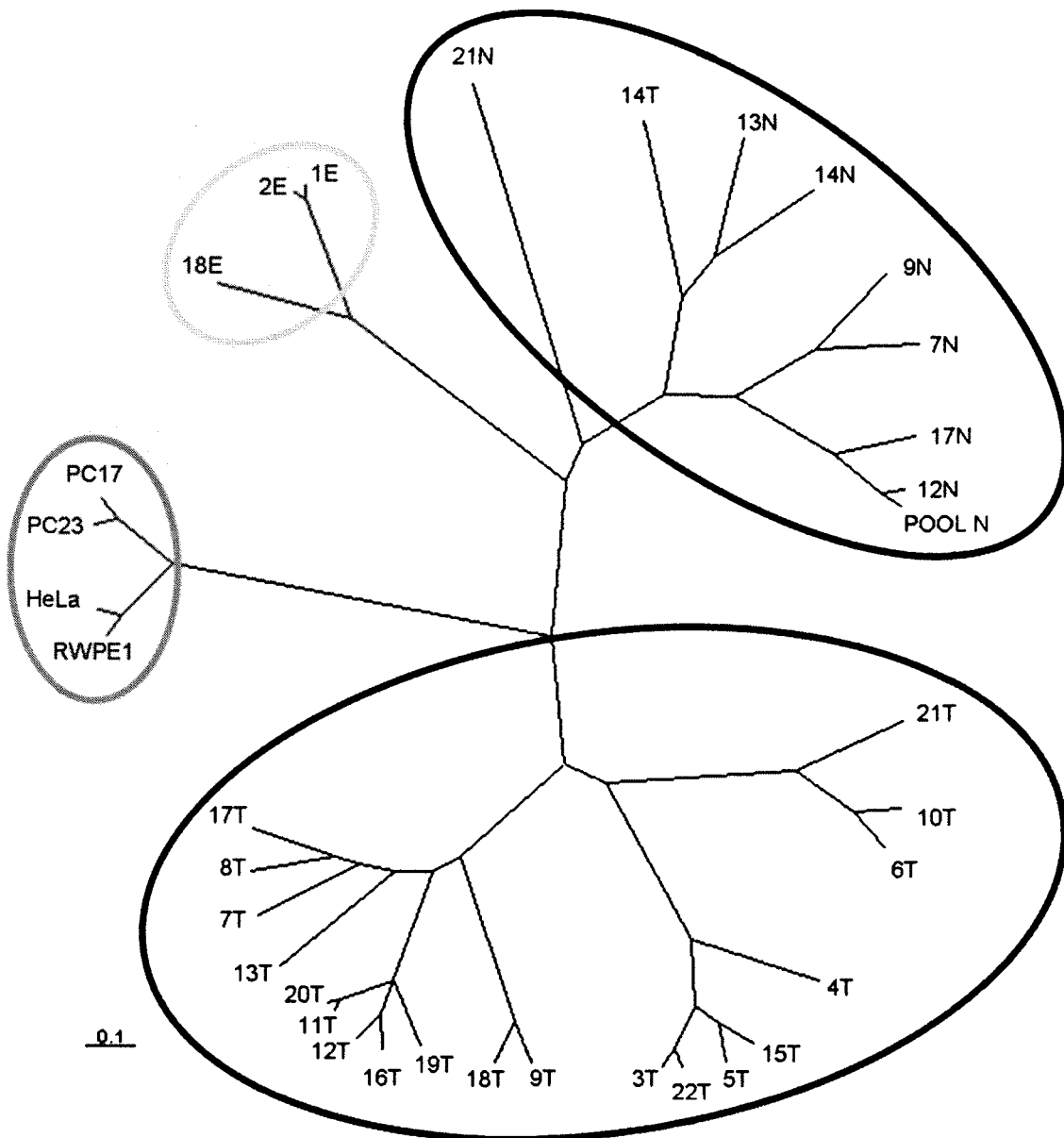


Figura 2

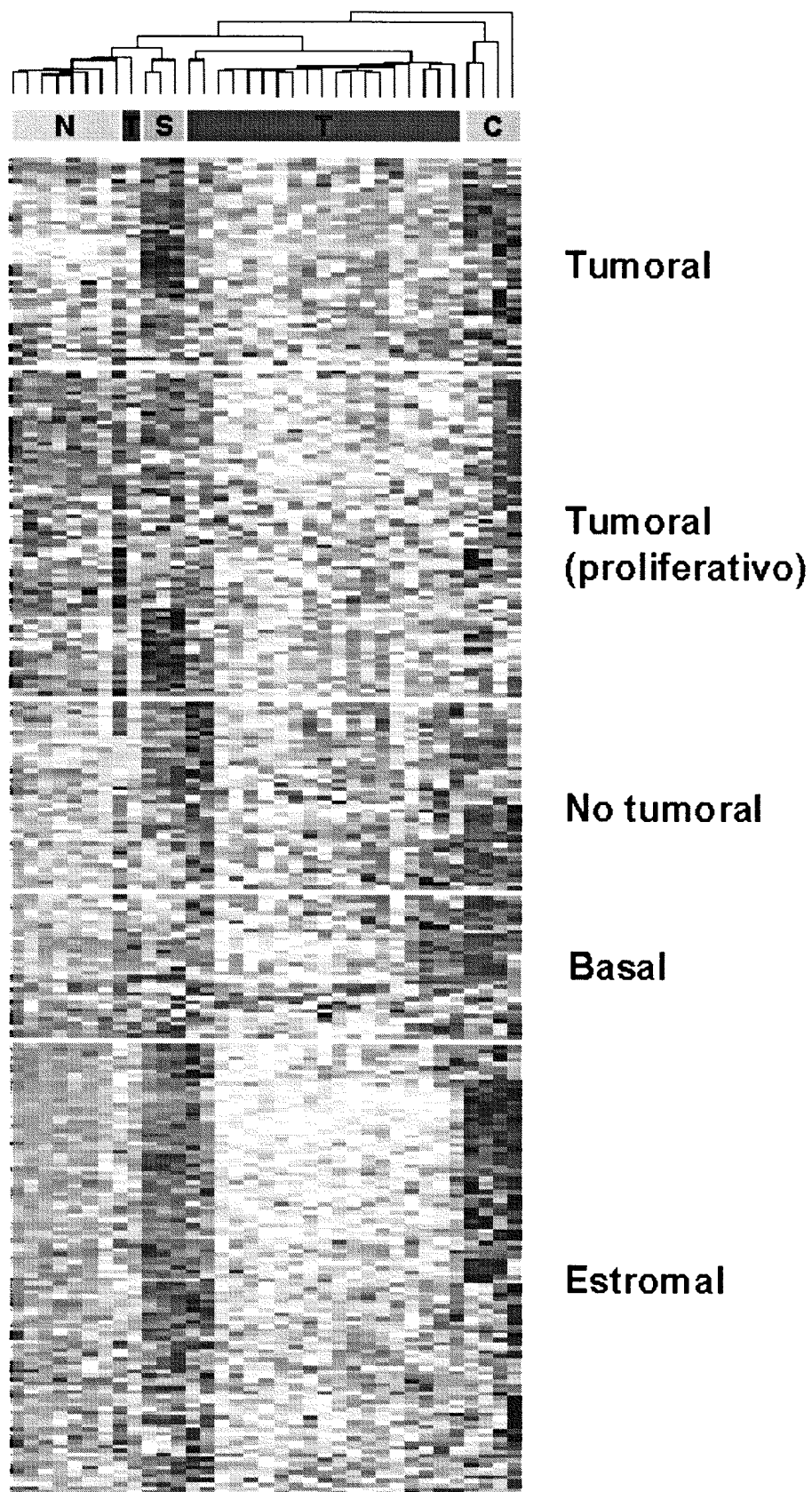


Figura 3

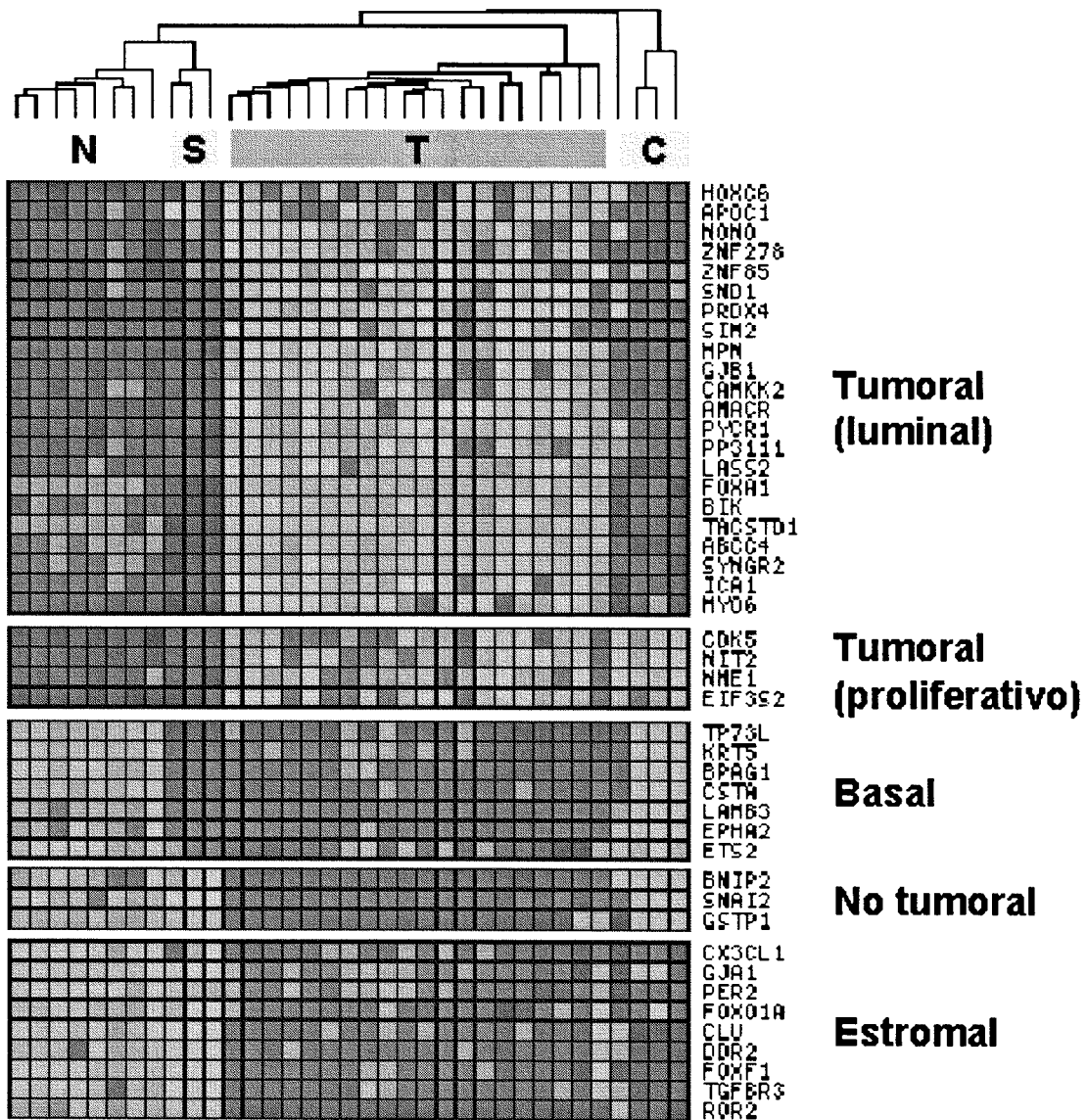


Figura 4

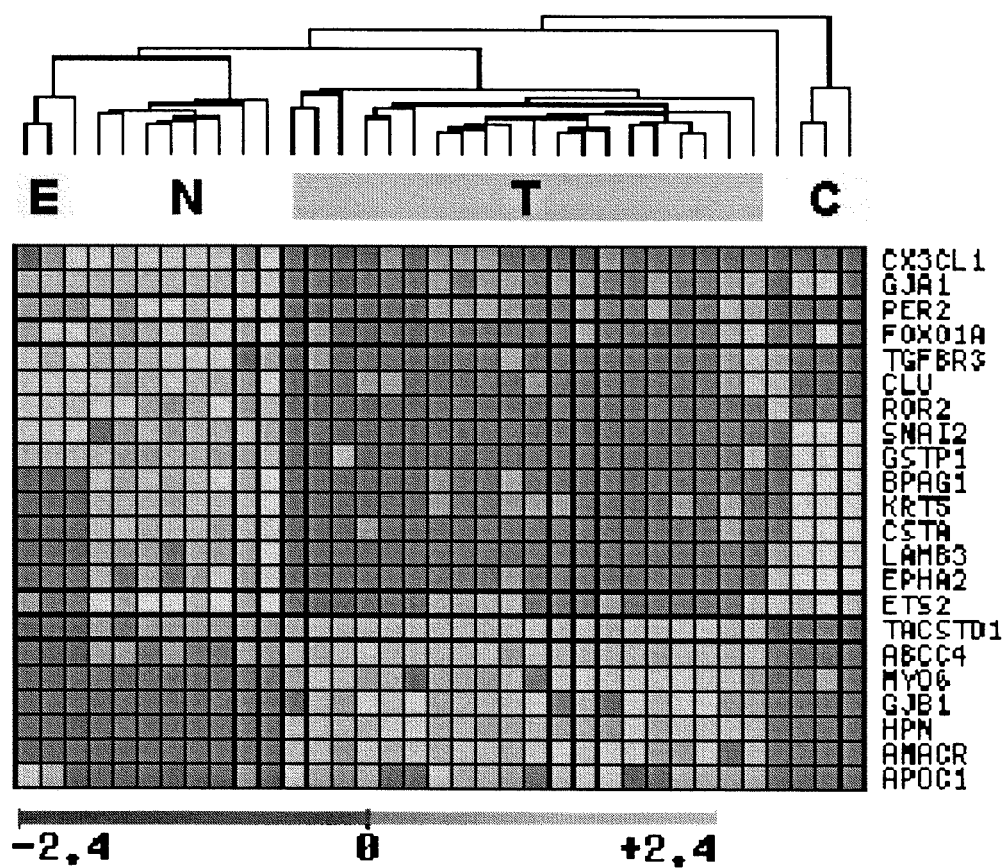


Figura 5

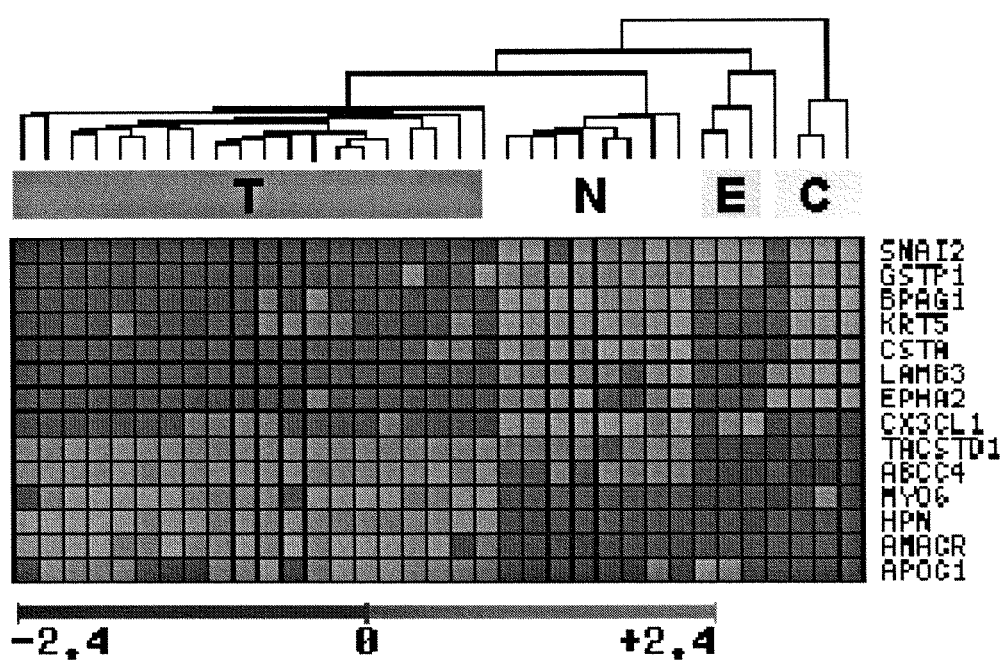


Figura 6

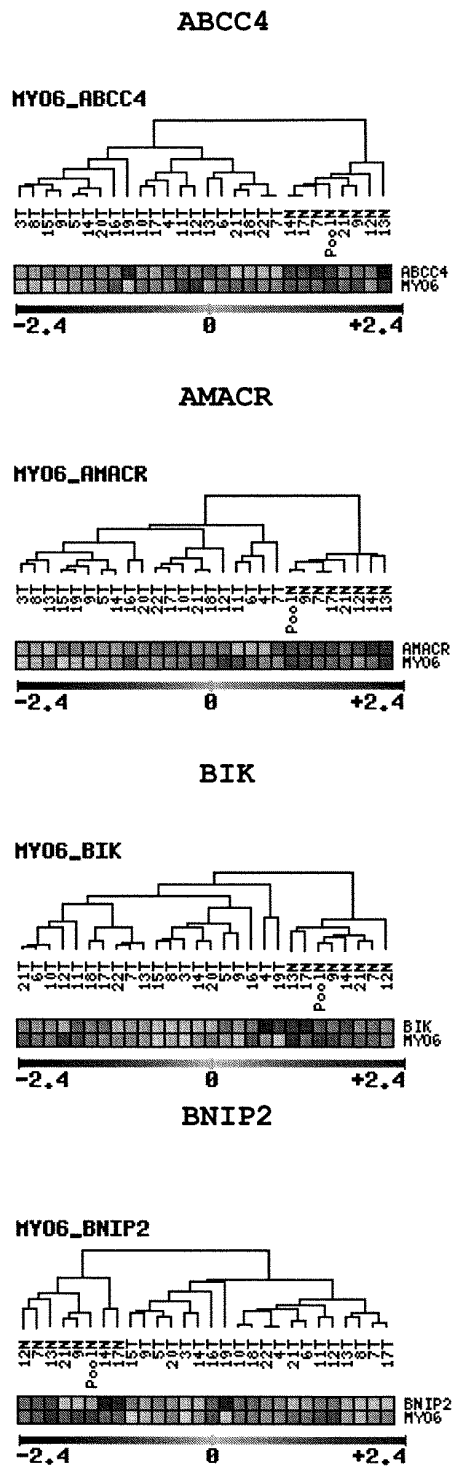
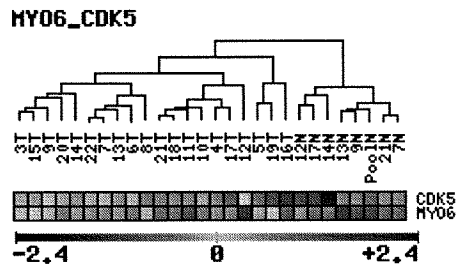
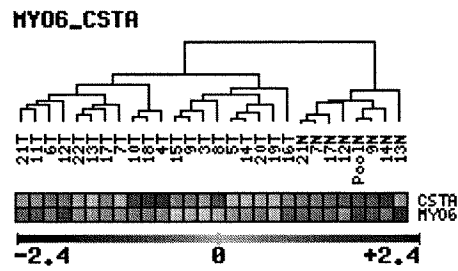


Figura 6 (continuación)

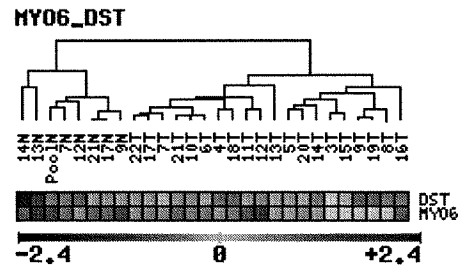
CDK5



CSTA



DST



EIF3S2

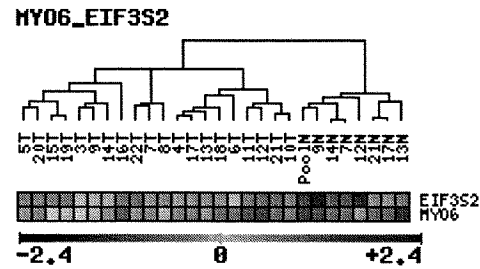
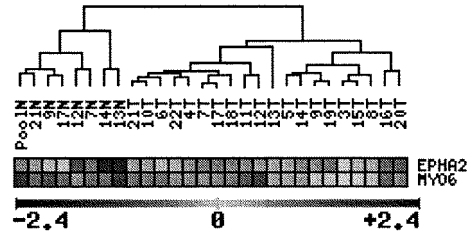


Figura 6 (continuación)

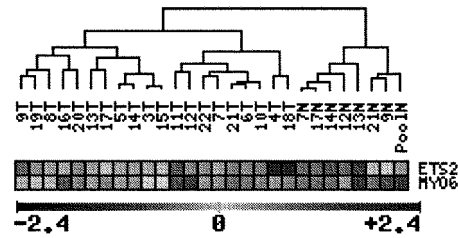
EPHA2

MY06_EPHA2 - [12/21/2005 11:34:26



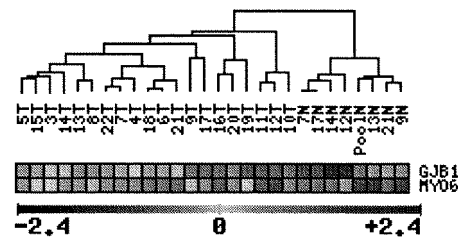
ETS2

MY06_ETS2



GJB1

MY06_GJB1



HPN

MY06_HPNI

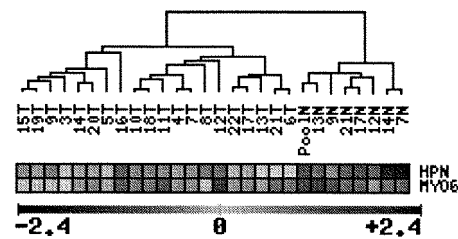
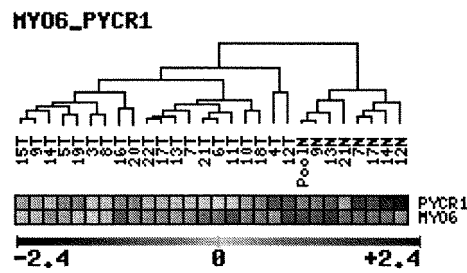
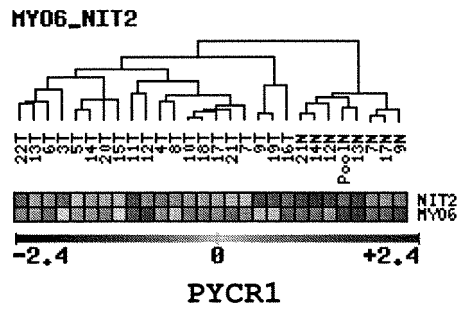
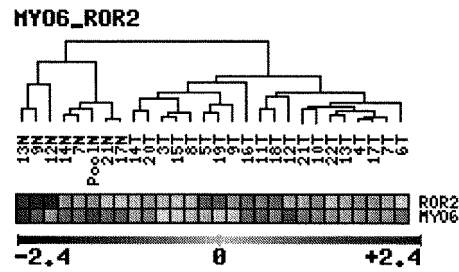


Figura 6 (continuación)

NIT2



ROR2



TACSTD1

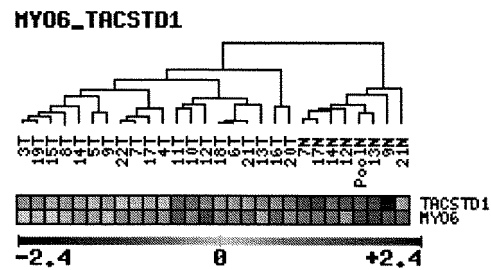


Figura 6 (continuación)

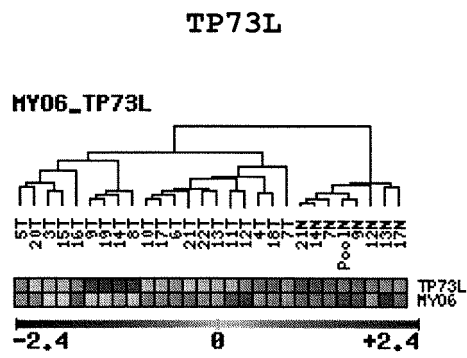


Figura 6 (continuación)

Figura 7

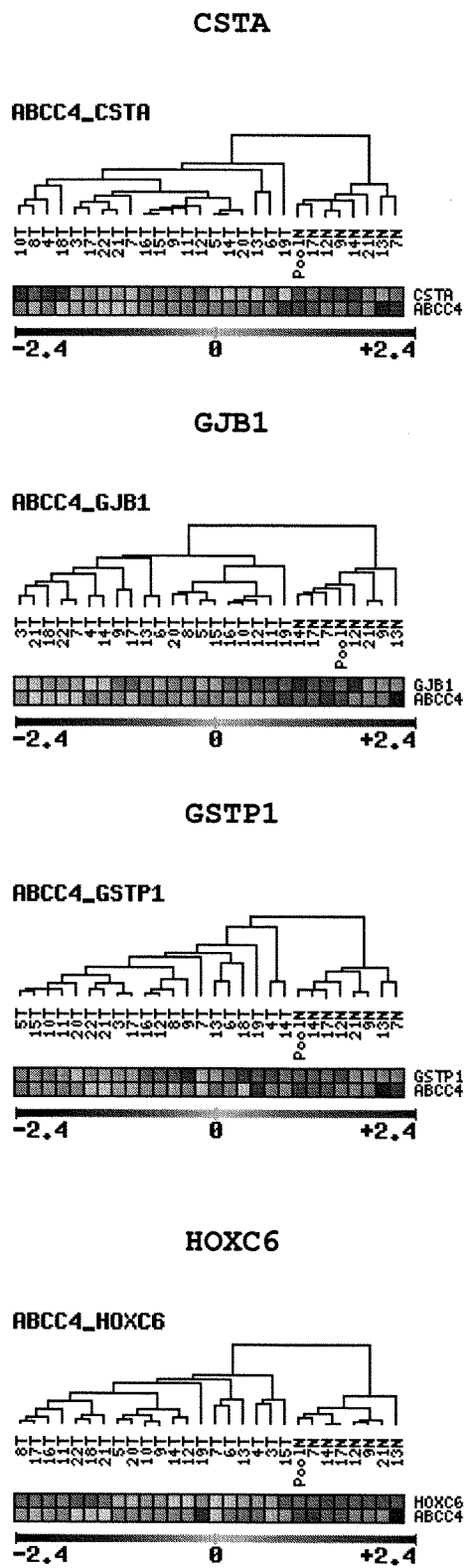


Figura 7
(continuación)

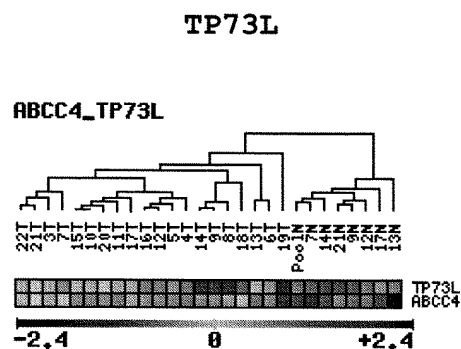
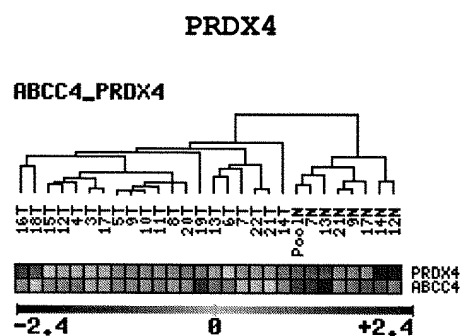
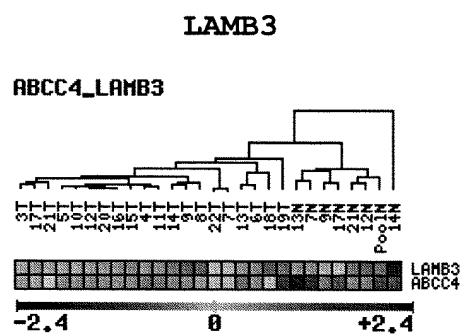
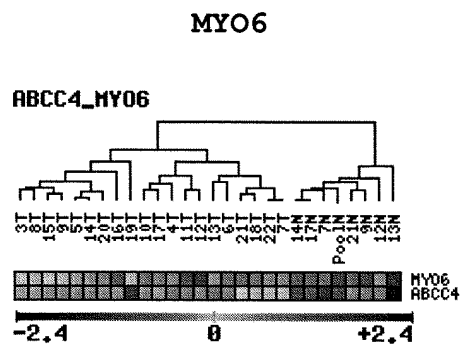
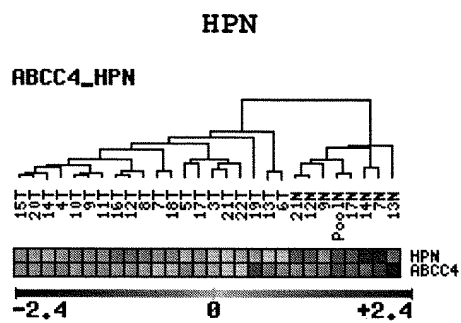


Figura 7
(continuación)

Figura 8

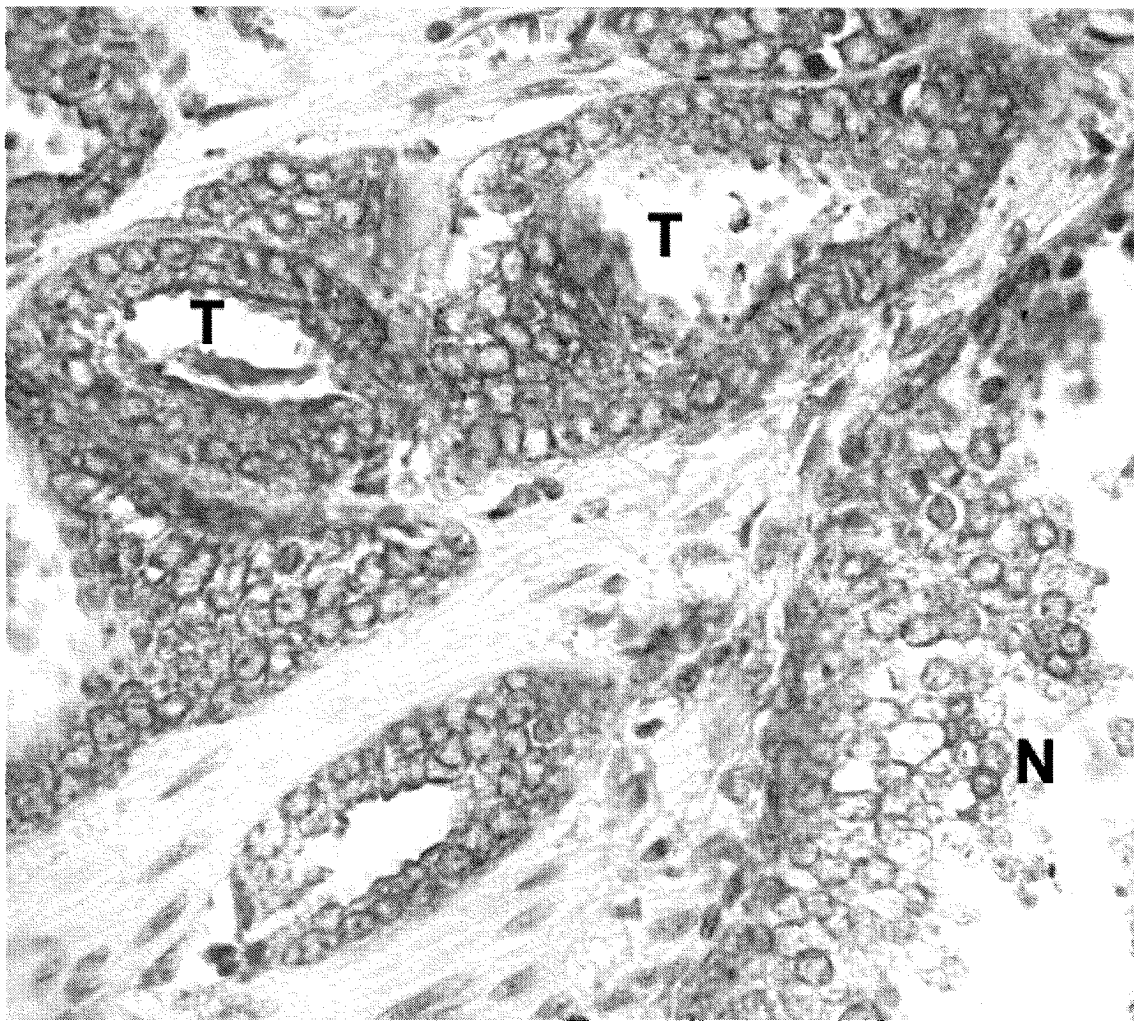


Figura 9

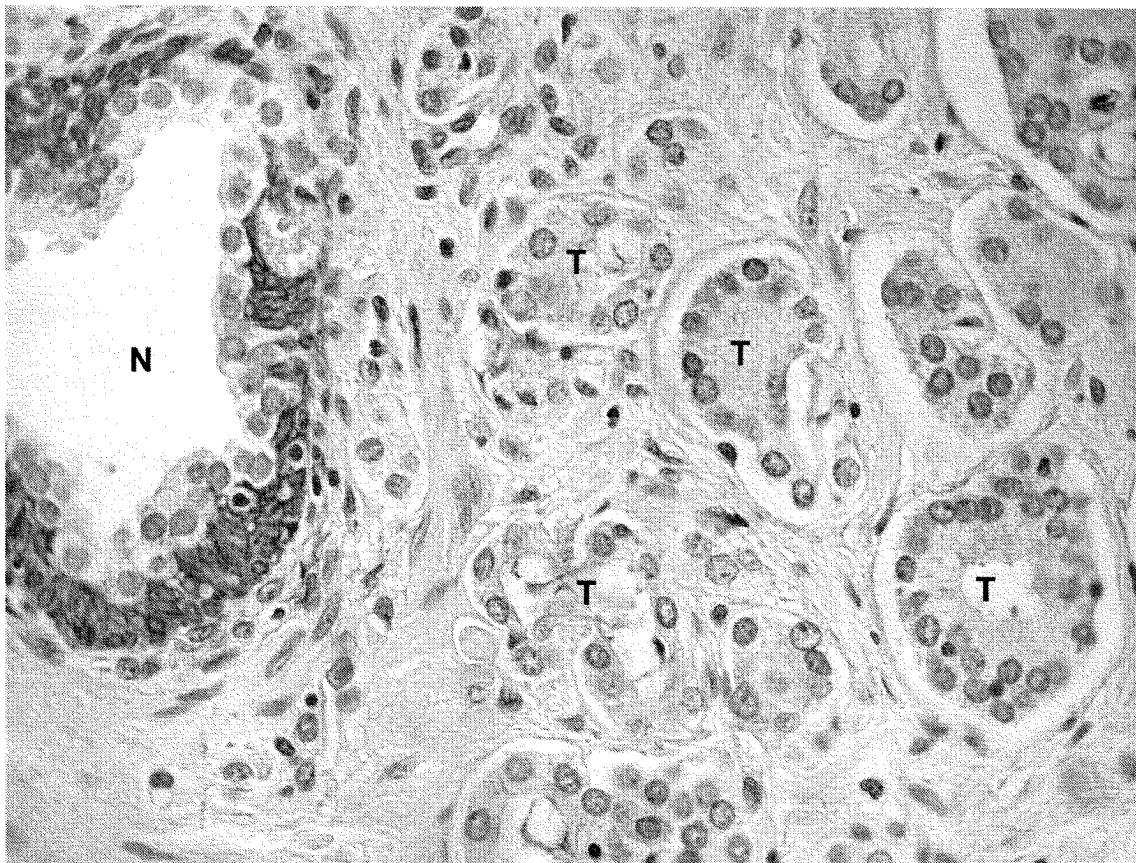
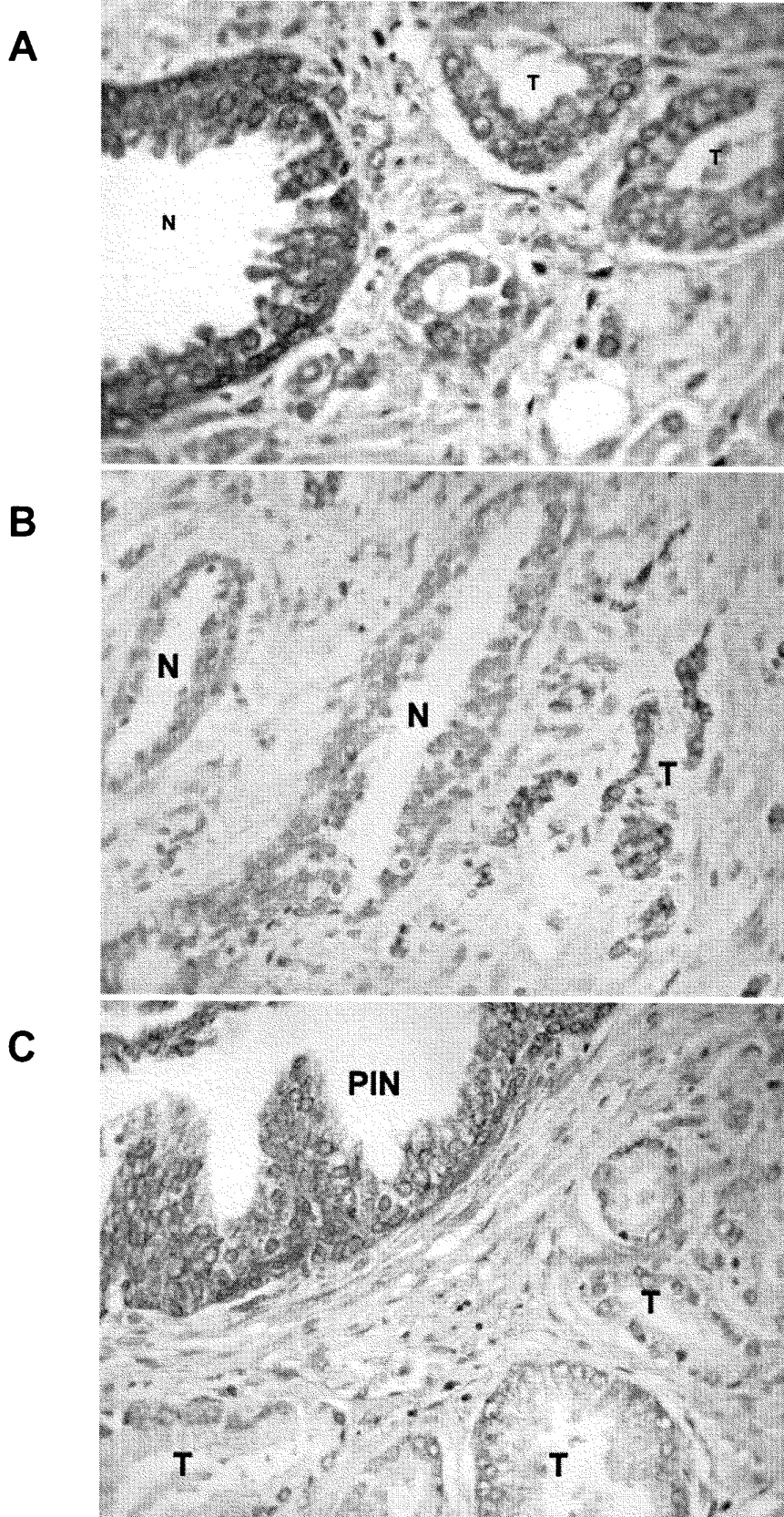


Figura 10





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 176

② Nº de solicitud: 200600348

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RHODES, D.R. et al., "Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer.", <i>CANCER RES.</i> , 2002, Vol. 62, No. 15, páginas 4427-4433. Resultados, Figura 4.	1-4,6, 8-30
X	BISMAR, T.A. et al., "Defining aggressive prostate cancer using a 12-gene model.", <i>NEOPLASIA</i> , 2006 Ene, Vol. 8, No. 1, páginas 59-68. Resultados, Tabla 1.	1-3,6, 8-30
X	VARAMBALLY, S. et al., "Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression.", <i>CANCER CELL</i> , 2005, Vol. 8, No. 5, páginas 393-406. Resultados, Figuras 3 y 4.	1-3,8-30
A	OUDES, A.J. et al., "Application of Affymetrix array and Massively Parallel Signature Sequencing for identification of genes involved in prostate cancer progression.", <i>BMC CANCER</i> , 2005, Vol. 5, página 86. Todo el documento.	1-30
A	RHODES, D.R. et al., "Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression.", <i>PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A.</i> , 2004, Vol. 101, No. 25, páginas 9309-9314. Todo el documento.	1-30
A	LAPOINTE, J. et al., "Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer.", <i>PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A.</i> , 2004, Vol.101, No. 3, páginas 811-816. Todo el documento.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.05.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 300 176

② Nº de solicitud: 200600348

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GLINSKY, G.V. et al., "Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer.", J. CLIN. INVEST., 2004, Vol. 113, No. 6, páginas 913-923. Todo el documento.	1-30
A	US 6171796 B1 (AN et al.) 09.01.2001, todo el documento.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.05.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/3

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)