



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 430**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)	C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)	C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)	C12N 15/57 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)	C40B 30/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06790654 .5**

96 Fecha de presentación : **08.09.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1934367**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54

Título: **Método molecular para el diagnóstico de cáncer de próstata.**

30

Prioridad: **14.09.2005 US 716507 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.03.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.03.2011

73

Titular/es:
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
1200 Montreal Road
Ottawa, ON K1A 0R6, CA**

72

Inventor/es: **Belacel, Nabil;
Cuperlovic-Culf, Miroslava y
Ouellette, Rodney**

74

Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 355 430 T3

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

DESCRIPCIÓN

MÉTODO MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PRÓSTATA**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para determinar si las células prostáticas son cancerosas.

5 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es un cáncer principal en los hombres con 20.100 nuevos casos esperados en Canadá en 2004 (Canadian Cancer Statistics, 2004). Una cantidad incluso mayor de pacientes, después de una lectura PSA (antígeno específico de próstata) positiva experimentan una biopsia invasiva pero se diagnostican con cáncer. Desafortunadamente, los procedimientos de biopsia invasiva requieren una larga hospitalización con muchos posibles efectos secundarios. La razón de usar el procedimiento de biopsia más invasivo, en oposición a la biopsia con aguja gruesa menos invasiva es que el procedimiento de convencional sobre muestras de biopsia con aguja gruesa no ha demostrado ser tan precisa como una biopsia más invasiva y por lo tanto se descartó como modalidad de diagnóstico en varios países. Aunque las biopsias más invasivas pueden proporcionar un diagnóstico más preciso, son extremadamente traumáticas para el paciente. Además, dichos procedimientos puede provocar potencialmente discapacidades a largo plazo y constituyen un coste significativo al sistema sanitario.

Las técnicas de diagnóstico actuales para detectar el cáncer de próstata se basan en el nivel de PSA en el suero. El diagnóstico final diagnosis se determina por una comprobación patológica de células cancerosas en las muestras biopsia.

20 Sin embargo, estas técnicas actuales no son perfectas. El nivel de PSA en el suero puede estar afectado por factores diferentes al cáncer, incluyendo otras patologías y la edad. Además, propiedades específicas de la proteína PSA en suero hacen que las mediciones precisas de concentración sean muy difíciles. Como resultado, el ensayo de PSA tiene un gran porcentaje de lecturas de falsos positivos así como de falsos negativos. Por lo tanto, las muestras de biopsia son esenciales para un diagnóstico más preciso. Desafortunadamente, como se ha indicado anteriormente, el método de biopsia preferido, la biopsia con aguja gruesa, a menudo es imprecisa debido al tamaño de muestra muy pequeño. Sin embargo, el ensayo genético sobre muestras de biopsia con aguja gruesa permitirá un diagnóstico preciso sin la necesidad de métodos más invasivos.

30 Por lo tanto, existe una necesidad de un método de diagnóstico más preciso que no requiera una biopsia invasiva para detectar o diagnosticar el cáncer de próstata. De forma ideal, dicho método debe ser usable incluso con un tamaño de muestra muy pequeño y puede combinarse con otros métodos de diagnóstico basados en patología.

El documento US2004/0029151 describe un método para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente, que comprende analizar en una muestra de ensayo tejido prostático el nivel de expresión de al menos dos genes sobre-expresados en cáncer de próstata y al menos dos genes sub-expresados en cáncer de próstata.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un método para determinar si las células prostáticas son cancerosas. Se proporciona un panel de 8 genes marcadores específicos. La sobre-expresión de algunos de estos genes marcadores en comparación con su expresión en tejido prostático normal y la sub-expresión del resto de estos genes marcadores son indicativas de tejido prostático canceroso. Usando estos 8 genes marcadores como herramienta de diagnóstico, pueden usarse muestras tisulares más pequeñas, tales como las obtenidas por biopsias con aguja gruesa.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si las células prostáticas son cancerosas, comprendiendo el método:

45 a) determinar, en una muestra de células prostáticas, si todos los genes de un primer panel se sobre-expresan y si todos los genes de un segundo panel se sub-expresan en dichas células prostáticas en comparación con la expresión de dichos genes en células prostáticas normales;

b) determinar que dichas células prostáticas son cancerosas en base a si dichos genes se sobre-expresan o sub-expresan en dichas células prostáticas.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de un primer panel de genes marcadores y un segundo panel de genes marcadores para identificar tejido prostático canceroso, siendo una sobre-expresión o sub-expresión de dichos paneles de genes marcadores en tejido prostático en comparación con la expresión en tejido prostático normal indicativa de tejido prostático canceroso.

Breve descripción de los dibujos

Se obtendrá una mejor comprensión de la invención por consideración de la siguiente descripción detallada, con referencia a los siguientes dibujos en los que:

55 la Figura 1 es un diagrama de expresión para los 8 genes que es el objeto de la presente invención;

la Figura 2 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen GSTM obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

la Figura 3 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen LTPB4 obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

la Figura 4 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen DF (adipsina) obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

5 la Figura 5 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen NELL2 obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

la Figura 6 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen XBP1 obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

10 la Figura 7 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen ITSN1 obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático;

la Figura 8 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen FOLH1 obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático; y

la Figura 9 es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen de la Hepsina obtenidos en varios experimentos sobre tejido prostático.

15 **Descripción Detallada**

La presente invención se refiere al uso de un panel de 8 genes marcadores específicos para diagnosticar o detectar tejido prostático canceroso. El panel de 8 genes marcadores se enumera en la siguiente Tabla 1. Los experimentos han demostrado que este panel de genes marcadores da una elevada precisión en el diagnóstico de cáncer de próstata debido a los niveles de expresión de los genes marcadores en tejido canceroso en relación a sus niveles de expresión en tejido normal.

20

El panel de 8 genes marcadores se da en la Tabla 1. Los genes marcadores se determinaron usando un método desarrollado por los inventores a partir del conjunto de datos de expresión de genes de tejidos prostáticos (normal y canceroso) obtenidos y descritos por Singh, D. et al. (Singh, D. et al. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behaviour. *Cancer Cell* 1:203 (2002)).

25 **Tabla 1** - Panel de ocho genes que se ha descubierto que dan elevada precisión en el diagnóstico de cáncer de próstata y su nivel de expresión en tejido canceroso en relación a tejido normal.

Número de Acceso a GenBank	Nombre del Gen	Símbolo	ID UniGene	Sobre- o Sub-expresado en tejido canceroso con relación a tejido normal
M96233	Glutación S-transferasa M4	GSTM4	Hs.348387	Sub-expresado
Y13622	Proteína de unión 4 al factor de crecimiento transformante beta latente	LTBP4	Hs.85087	Sub-expresado
M84526	Componente D del complemento (adipsina)	DF	Hs.155597	Sub-expresado
D83018	Nel-tipo 2	NELL2	Hs.79389	Sub-expresado
Z93930	Proteína 1 de unión a la caja X	XBP1	Hs.149923	Sobre-expresado
AF064243	Intersectina 1 (proteína de dominio SH3)	ITSN1	Hs.66392	Sub-expresado
M99487	Folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de próstata) 1	FOLH1	Hs.1915	Sobre-expresado
X07732	Hepsina (serín proteasa transmembrana 1)	HPN	Hs.823	Sobre-expresado

30 Los genes enumerados anteriormente se obtuvieron usando un experimento génico de microserie, proporcionándose el diagrama de expresión génica como la Figura 1 para los 8 genes. Para este diagrama de expresión, las muestras son tejidos normales y tumorales.

35 Las Figuras 2-9 son diagramas de recuadros de la expresión comparativa de los genes marcadores específicos en tejido prostático normal, tejido canceroso, y otros tipos de tejido prostático. El ensayo se hizo usando los datos de microserie de próstata disponibles en la base de datos Oncomine (véase Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, y Chinnaiyan AM. ONCOMINE: A Cancer Microarray Database and Data-Mining Platform. *Neoplasia* (2004); y Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N., Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, y Chinnaiyan AM, Large-Scale Meta-Analysis of Cancer Microarray Data identifies Common Transcriptional Profiles of Neoplastic Transformation and Progression, *PNAS* (2004)).

El conjunto de datos usado para los experimentos que produjo los niveles de expresión mostrados en los diagramas de recuadros de las Fig. 2-9 incluía expresiones génicas medidas usando tecnología Affymetrix sobre 52 muestras de tumor de próstata y 50 muestras de próstata no tumorales. El pre-procesamiento incluía el reajuste del umbral (suelo 50, techo 16.000), el filtrado (máx./mín. menos de 5; máx.-mín. menos de 50); transformación logarítmica y normalización (a una media de cero y una varianza de 1). El pre-procesamiento produjo la serie que comprende 6034 genes y 102 experimentos. Los experimentos de microserie se realizaron sobre muestras de tumor de próstata y tejido prostático adyacentes que no contiene células tumorales (seleccionadas por un patólogo en base a la morfología celular, mencionadas como "normales") recogido de pacientes que experimentaron prostatectomía radical en el Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts. Cada una de estas muestras la revisó un patólogo para determinar su Valor Gleason (GS) así como el nivel sérico de PSA. Como se ha indicado anteriormente, los experimentos de microserie se realizaron usando series GeneChip (Affymetrix Inc.). El ARN total extraído de cada muestra se marcó con el colorante de fluorescencia y se hibridó al portaobjetos en un formato de una muestra por portaobjetos. Los niveles de expresión génica se obtuvieron midiendo las intensidades de fluorescencia para cada diana (mancha). El pre-procesamiento de datos se realizó usando el protocolo convencional para series GeneChip (véase Welsh JB., Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res.* 61: 5974 (2001)). Los datos para cada experimento después se graduaron (normalizaron) para que tuvieran una media global de cero y una desviación típica de un haciendo que los datos de diferentes experimentos fueran comparables.

Con referencia a la Figura 2, se presenta un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen GSTM4 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos incluidos y los tejidos usados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	6,366
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,067
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,0823
A4[4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,8647
A5 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	0,1103

Como puede observarse a partir de la Fig. 2 junto con la Tabla 2 anterior, el gen GSTM4 se sub-expresa en tejido prostático canceroso cuando se compara con su expresión en tejido prostático normal (véase el experimento A1 en la Fig. 2). También puede observarse que, en comparación con la expresión de este gen en tejido prostático normal, el tejido prostático canceroso tiene una expresión inferior (véase C1 en los experimentos A2-A4). Por tanto, para tejido prostático canceroso, el gen GSTM4 se sub-expresa cuando se compara con su expresión en tejido prostático normal.

Con referencia a la Fig. 3, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen LTPB4 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos incluidos y los tejidos usados se resumen en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0872
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0069
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,1896
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,7115
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,1142
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	1,2e-5
A7[7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,158
A8 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	0,0404
A9 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	1,459
A10 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,7855

A11 [9]	No PSA recurrencia a los 3 años	PSA Recurrencia a los 3 años	0,6524
A12 [9]	Próstata no Tumoral	Cáncer de Próstata	3,7e-5
A13 [9]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,3183
A14 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	6,4e-6
A15 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,6032

5 Los resultados ilustrados en la Fig. 3 muestran que el gen LTPB4 se sub-expresa en tejido prostático canceroso cuando se compara con su expresión en tejido prostático normal. Los resultados de los experimentos A1, A5, A7, A9, A12, y A14 muestran que, en comparación con su expresión en tejido prostático normal, el gen LTPB4 se sub-expresa en tejido prostático canceroso. Para tejido canceroso de próstata, el gen LTPB4, por lo tanto, se sub-expresa cuando se compara con su expresión en tejido prostático normal.

10 Con referencia a la Fig. 4, es un diagrama de recuadros de los niveles de expresión del gen DF (adipsina) obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y el tejido prostático incluido en los experimentos se resumen en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,4053
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,7189
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,044
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,7859
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0006
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,013
A7 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0642
A8 [11]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,6993
A9 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0893
A10 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0031
A11 [9]	No PSA recurrencia a los 3 años	PSA Recurrencia a los 3 años	0,0518
A12 [9]	Próstata no Tumoral	Cáncer de Próstata	6,4e-10
A13 [9]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,2172
A14 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,118
A15 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,9273

15 Los resultados de la Fig. 4 muestran que el gen DF (adipsina) se sub-expresa en tejido prostático canceroso en comparación con su expresión en tejido prostático normal. Como puede observarse a partir de los resultados de los experimentos A1, A5, A7-A9, A12, y A14, el gen DF (adipsina) tiene niveles de expresión muy inferiores en tejido prostático canceroso que en tejido prostático normal.

20 Con referencia a la Figura 5, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión para el gen NELL2 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y los tipos de tejido prostático usados en los experimentos se resumen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5:

Experimento	C1	C2	Valor P
-------------	----	----	---------

A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0039
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0339
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,3201
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,3781
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0041
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0018
A7 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,9941
A8 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	4,10E-06
A9 [11]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,3558
A10 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0008
A11 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,832
A12 [9]	No PSA recurrencia a los 3 años	PSA Recurrencia a los 3 años	0,0291
A13 [9]	Próstata no Tumoral	Cáncer de Próstata	1,20E-12
A14 [9]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,8026
A15 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,1714
A16 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,6622

5 Los resultados de la Fig. 5 ilustran que el gen NELL2 se sub-expresa en tejido prostático canceroso cuando se compara con su expresión en tejido prostático no canceroso. Los resultados de los experimentos A1, A5, A7, A9, A10, A13, y A14 muestran que el gen NELL2 tiene un nivel de expresión inferior en tejido prostático canceroso que en tejido prostático normal.

Con referencia a la Figura 6, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión para el gen XBP1 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y los tipos de tejido prostático usados se resumen en la siguiente Tabla 6.

10 **Tabla 6:**

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0042
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	1,00E-04
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,0456
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,0581
A5 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,5674
A6 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	0,8723
A7 [11]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,8965
A8 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,428
A9 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0697

La Figura 6 muestra que el gen XBP1 se sobre-expresa en tejido prostático canceroso en oposición a tejido prostático normal. Los experimentos A1, A4, A5, A7 y A8 ilustran que el gen XBP1 tiene un nivel de expresión inferior en tejido prostático normal que en tejido prostático canceroso.

15 Con referencia a la Figura 7, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión para el gen

ITSN1 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y los diversos tejidos usados se resumen en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0024
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0106
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,2204
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,6537
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,304S
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0051
A7 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,2124
A8 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	0,0021
A9 [9]	No PSA recurrencia a los 3 años	PSA Recurrencia a los 3 años	0,6691
A10 [9]	Próstata no Tumoral	Cáncer de Próstata	3,50E-10
A11 [9]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,2232
A12 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0003
A13 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,586

5 La Figura 7 ilustra que el gen ITSN1 tiene un nivel de expresión inferior en tejido prostático canceroso cuando se compara con su expresión en tejido prostático normal. Como puede observarse a partir de los resultados de los experimentos A1, A5, A7, A10, y A12, el tejido prostático canceroso tiene niveles de expresión inferiores de ITSN1 cuando se compara con tejido prostático no canceroso.

10 Con referencia a la Figura 8, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión para el gen FOLH1 obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y los tejidos usados se resumen en la siguiente Tabla 8.

Tabla 8:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0011
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,07
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,3748

A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,0801
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0047
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,2598
A7 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0059
A8 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	0,0152
A9 [11]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,3939
A10 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,8983
A11 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0123
A12 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0039
A13 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,2576

La Figura 8 ilustra que el gen FOLH1 se sobre-expresa en tejido prostático canceroso en comparación con tejido prostático normal. Los resultados de los experimentos A1, A5, A7, A9, A10, y A12 muestran que el gen FOLH1 tiene un mayor nivel de expresión en tejido prostático canceroso que en tejido prostático normal.

5 Con referencia a la Figura 9, se ilustra un diagrama de recuadros de los niveles de expresión para el gen Hepsina obtenidos de varios experimentos diferentes sobre tejidos prostáticos. Cada recuadro incluye valores para experimentos replicados. Los experimentos y los diferentes tipos de tejido prostático usados se resumen en la siguiente Tabla 9.

Tabla 9:

Experimento	C1	C2	Valor P
A1 [4]	BPH y Próstata Normal	Cáncer de Próstata	1,60E-08
A2 [4]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,3311
A3 [4]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8	0,8772
A4 [4]	Cáncer de Próstata: No PSA recurr. a los 2 años	Cáncer de Próstata: PSA recurr.	0,5244
A5 [6]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0205
A6 [6]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0351
A7 [7]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0017
A8 [5]	Hiperplasia Prostática Benigna	Cáncer de Próstata	1,80E-07
A9 [8]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	0,0484
A10 [8]	Cáncer de Próstata	Cáncer Metastásico de Próstata	0,0662
A11 [9]	No PSA recurrencia a los 3 años	PSA Recurrencia a los 3 años	0,866
A12 [9]	Próstata no Tumoral	Cáncer de Próstata	6,10E-25
A13 [9]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,2081
A14 [10]	Próstata Normal	Cáncer de Próstata	2,10E-08
A15 [10]	Cáncer de Próstata: Gleason 6	Cáncer de Próstata: Gleason 8,9	0,7475

10

A partir de la Fig. 9, puede observarse que el gen Hepsina se sobre-expresa en tejido prostático canceroso en oposición a tejido prostático normal. Los resultados de los experimentos A1, A5, A7, A8, A9, A12, y A14 muestran que la Hepsina tiene un mayor nivel de expresión en tejido prostático canceroso que en tejido prostático normal.

5 La concordancia cualitativa entre las diferencias en la expresión en tejidos prostáticos cancerosos y normales para los ocho genes investigados aquí es buena en conjunto con la mayoría de los genes que muestran diferencia significativa entre tejido canceroso y normal así como entre tumores benignos y malignos en la mayoría de los experimentos. Los resultados mostrados aquí demuestran que un subconjunto de 8 genes es un panel de diagnóstico apropiado independientemente de las condiciones experimentales. Al mismo tiempo, en algunos casos, especialmente para el gen LTPB4, hay cambios en la expresión relativa en tejido prostático canceroso frente a tejido normal dependiendo del experimento. Dichas variaciones muestran que es preferible considerar el resultado global para el panel completo y que los diagnósticos basados solamente en un gen pueden ser poco fiables.

10 Debe apreciarse que el análisis de expresión puede realizarse usando cualquier método para medir la expresión génica. Pueden usarse métodos tales como microseries, mini-chips de paneles de diagnóstico, PCR, PCR a tiempo real, y otros métodos similares. Asimismo, también pueden usarse métodos para medir la expresión proteica.

15 Como se ha indicado anteriormente, las células prostáticas cancerosas pueden obtenerse de un paciente usando biopsia con aguja o incluso de células prostáticas cancerosas presentes en el torrente sanguíneo. También pueden obtenerse células prostáticas normales o no cancerosas frente a las cuales pueden compararse las células cancerosas del paciente o de otros pacientes. Los experimentos han demostrado que el diagnóstico puede ser posible a partir de solamente una pequeña cantidad de células cancerosas.

20 Una persona que comprenda esta invención puede ahora concebir estructuras y realizaciones alternativas o variaciones de lo anterior, todo lo cual se pretende que esté dentro del alcance de la invención definida en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si las células prostáticas son cancerosas, comprendiendo el método:
- 5 a) determinar, en una muestra de células prostáticas, si todos los genes de un primer panel se sobre-expresan en dichas células prostáticas en comparación con la expresión de dichos genes de dicho primer panel en células prostáticas normales,
- b) determinar si todos los genes de un segundo panel se sub-expresan en dichas células prostáticas en comparación con la expresión de dichos genes de dicho segundo panel en células prostáticas normales,
- c) determinar que dichas células prostáticas son cancerosas cuando
- 10 i) todos los genes de dicho primer panel se sobre-expresan en dichas células prostáticas en comparación con la expresión de dichos genes de dicho primer panel en células prostáticas normales, y
- ii) todos los genes de dicho segundo panel se sub-expresan en dichas células prostáticas en comparación con la expresión de dichos genes de dicho segundo panel en células prostáticas normales,
- caracterizado porque:
- dicho primer panel consta de:
- 15 Hepsina (serín proteasa transmembrana 1);
- proteína de unión 1 a la caja X;
 - folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de próstata) 1;
- y dicho segundo panel consta de:
- 20 Glutación S-transferasa M4;
- Intersectina 1 (proteína de dominio SH3);
 - Nel-tipo 2;
 - componente D del complemento (adipsina); y
 - proteína de unión 4 al factor de crecimiento transformante beta latente.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de dichas células prostáticas proviene de una biopsia con aguja gruesa.
3. Uso de un primer panel de genes marcadores y un segundo panel de genes marcadores para identificar tejido prostático canceroso, una combinación tanto de:
- 30 i) la sobre-expresión de todos los genes de dicho primer panel de genes marcadores en tejido prostático en comparación con la expresión de todos los genes de dicho primer panel de genes marcadores en tejido prostático normal, como de
- ii) la sub-expresión de todos los genes de dicho segundo panel de genes marcadores en tejido prostático en comparación con la expresión de todos los genes de dicho segundo panel de genes marcadores en tejido prostático normal que es indicativo de tejido prostático canceroso,
- caracterizado porque:
- 35 dicho primer panel de genes marcadores consta de:
- Hepsina (serín proteasa transmembrana 1);
- proteína de unión 1 a la caja X;
 - folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de próstata) 1;
- y dicho segundo panel de genes marcadores consta de:
- 40 Glutación S-transferasa M4;
- Intersectina 1 (proteína de dominio SH3);
 - Nel-tipo 2;
 - componente D del complemento (adipsina); y
 - proteína de unión 4 al factor de crecimiento transformante beta latente.

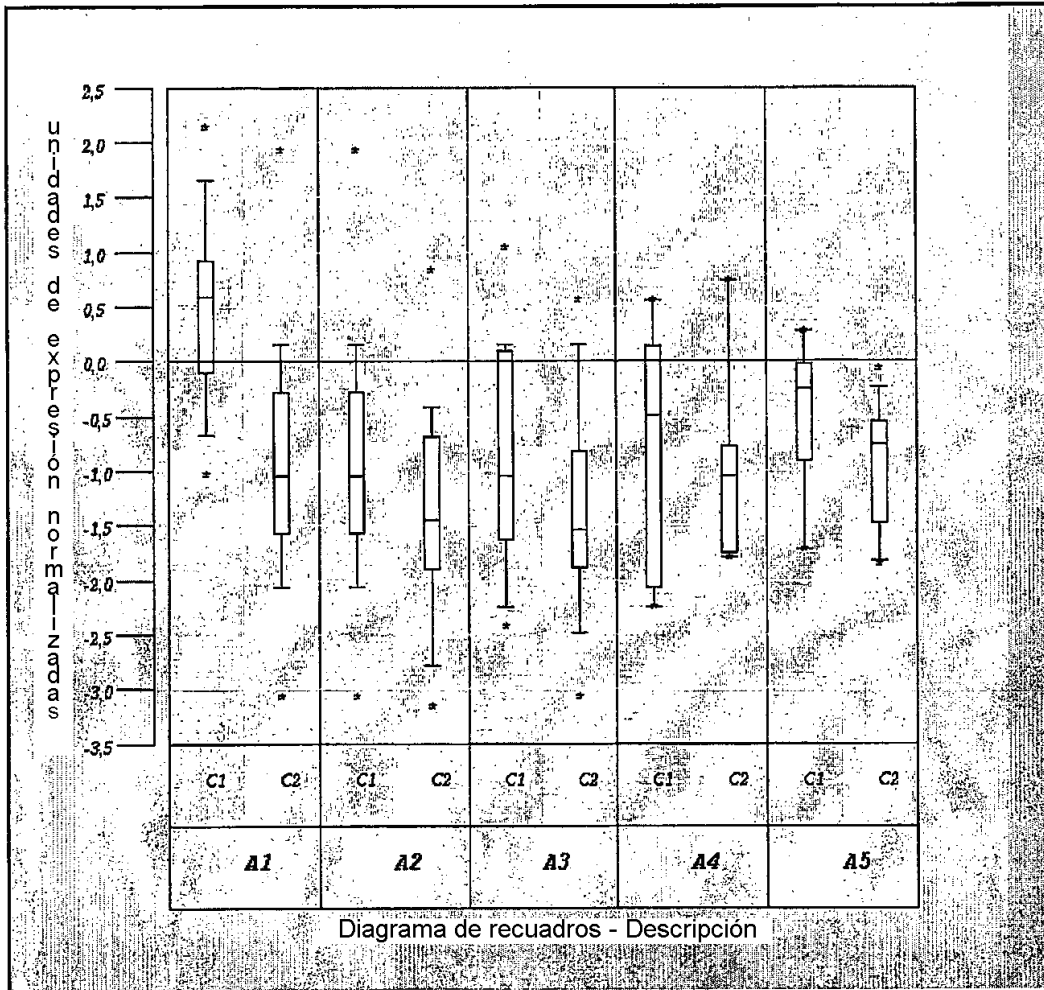


Figura 2

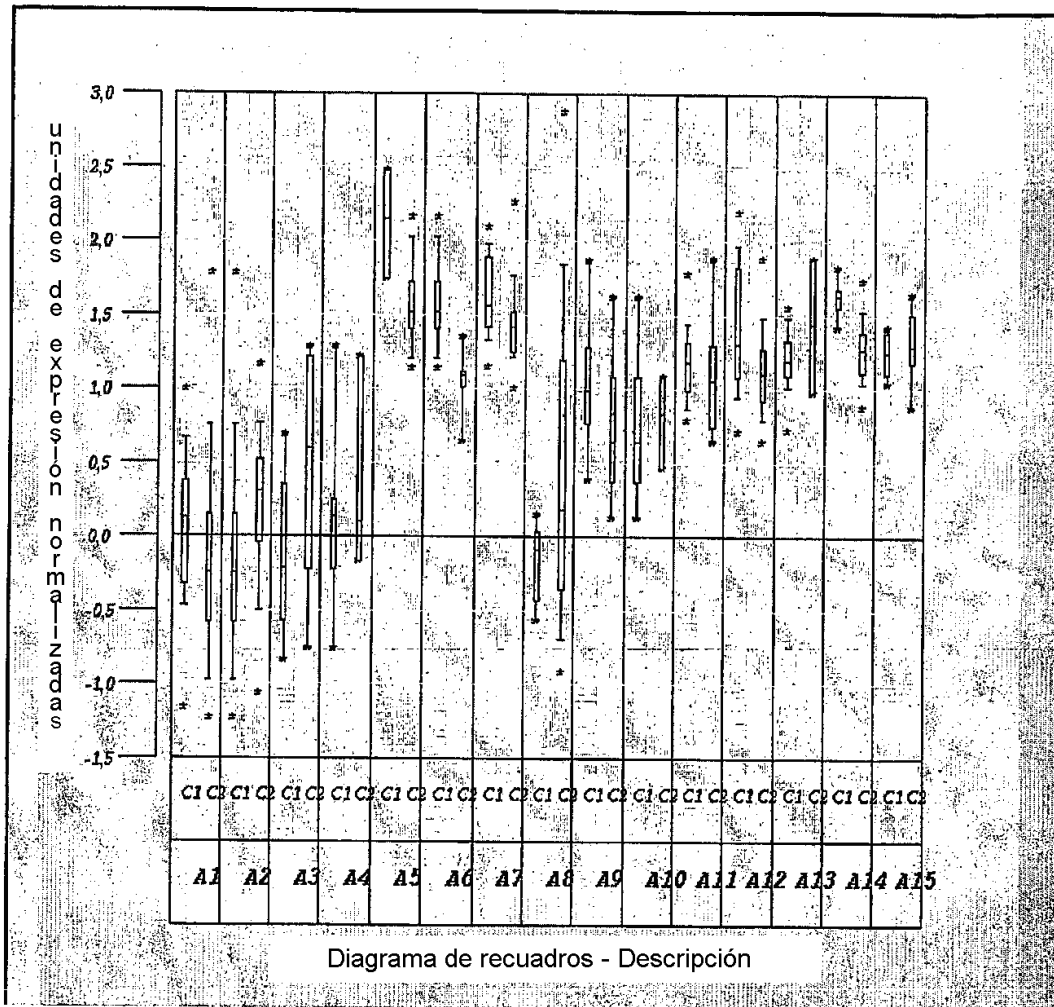


Figura 3

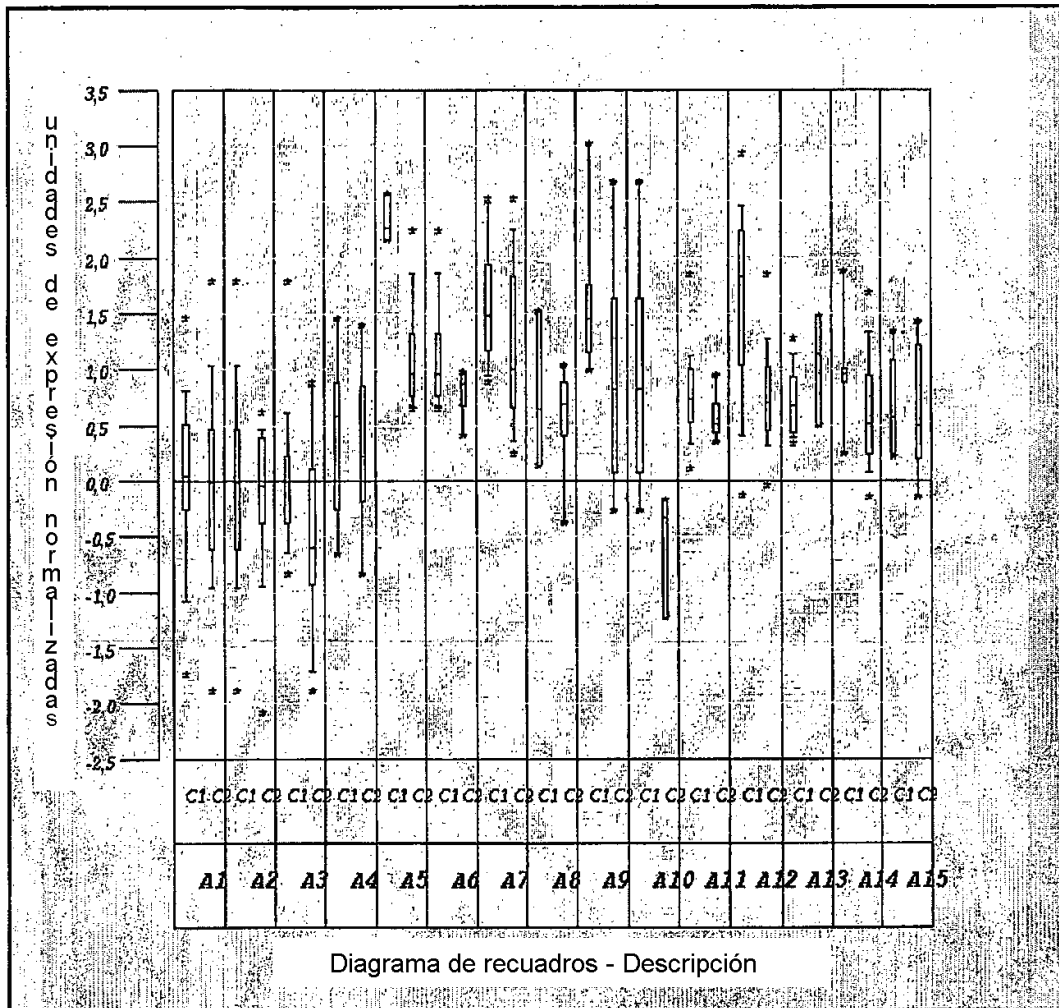


Figura 4

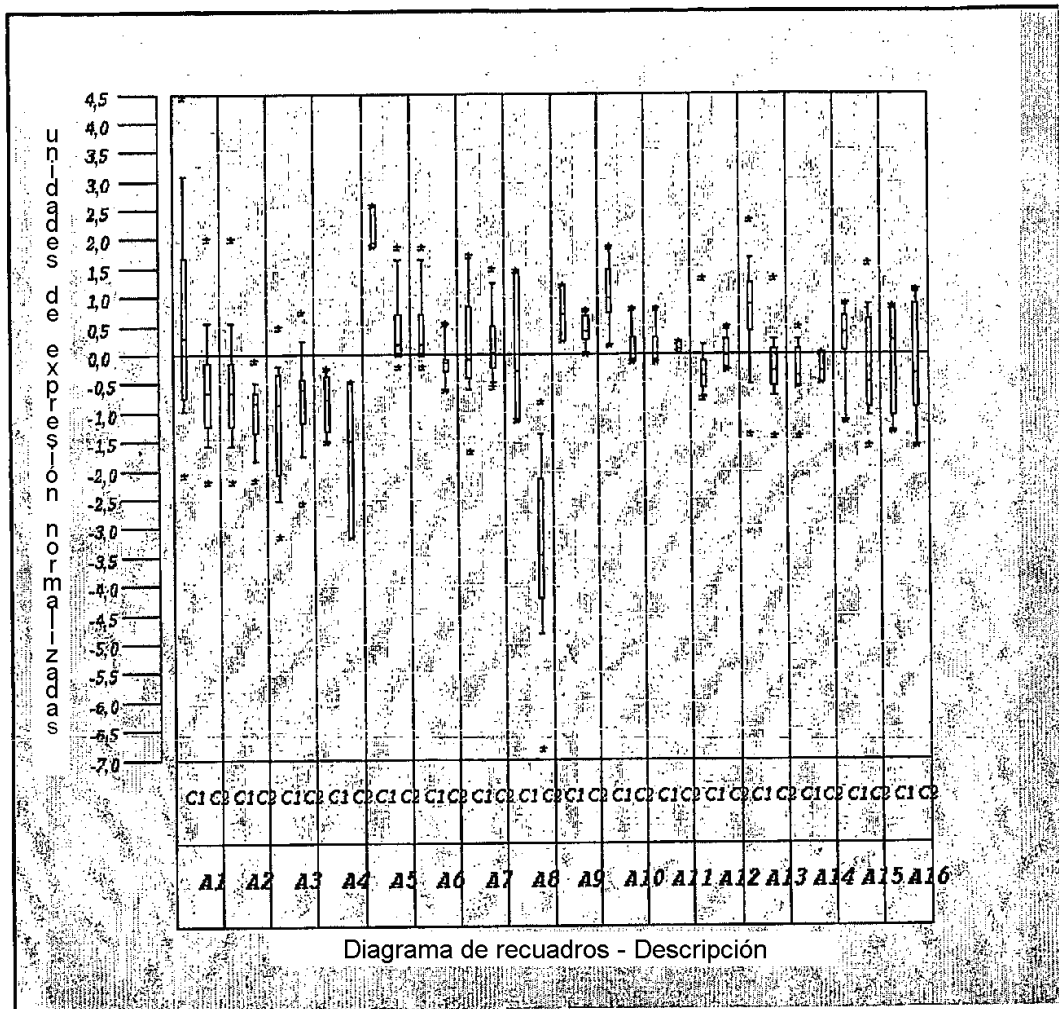


Figura 5

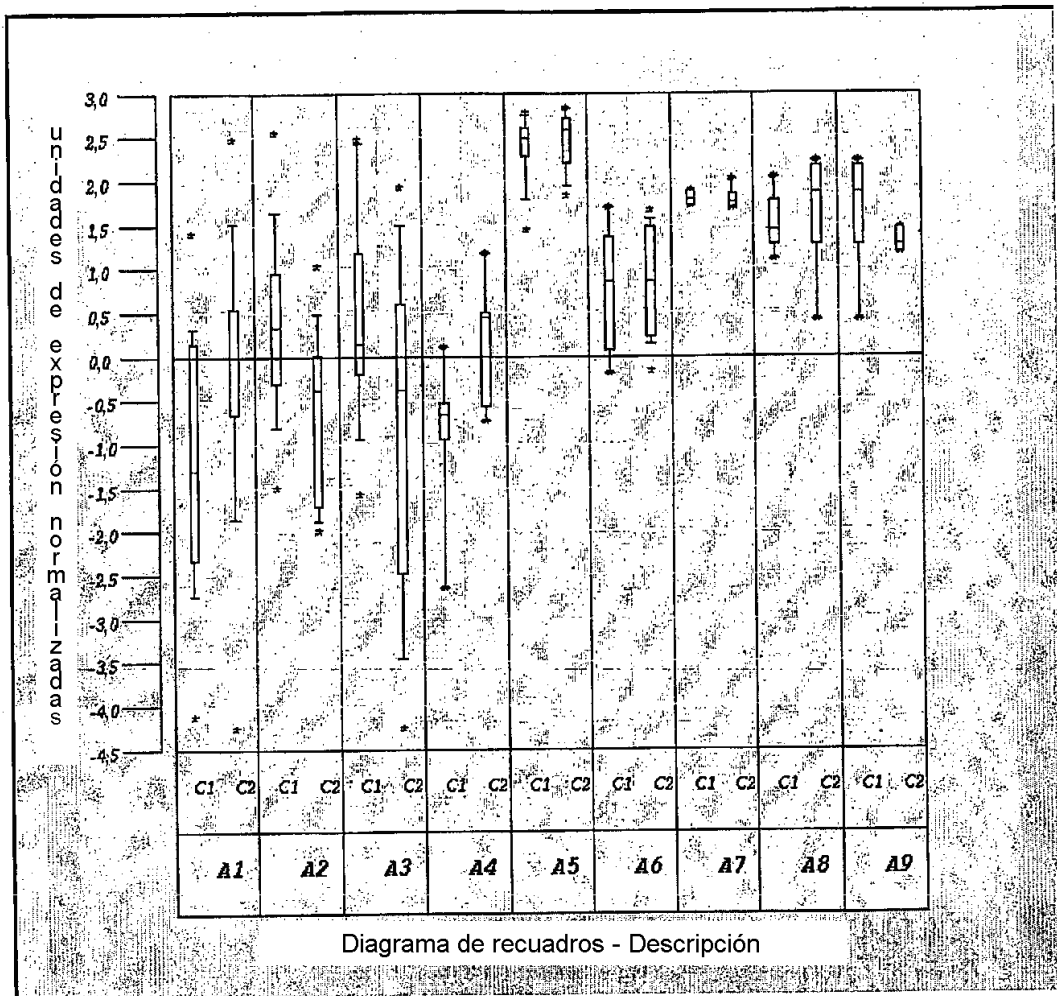


Figura 6

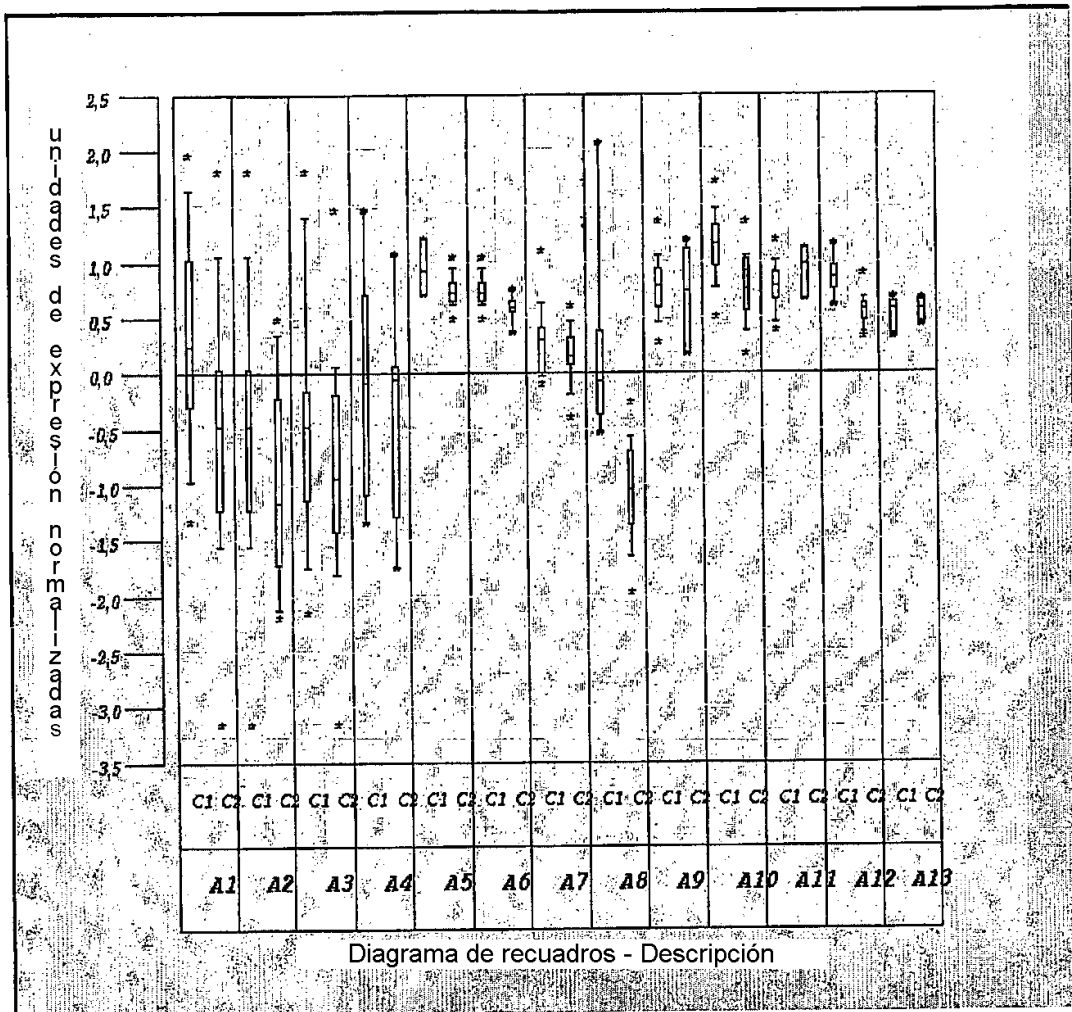


Figura 7

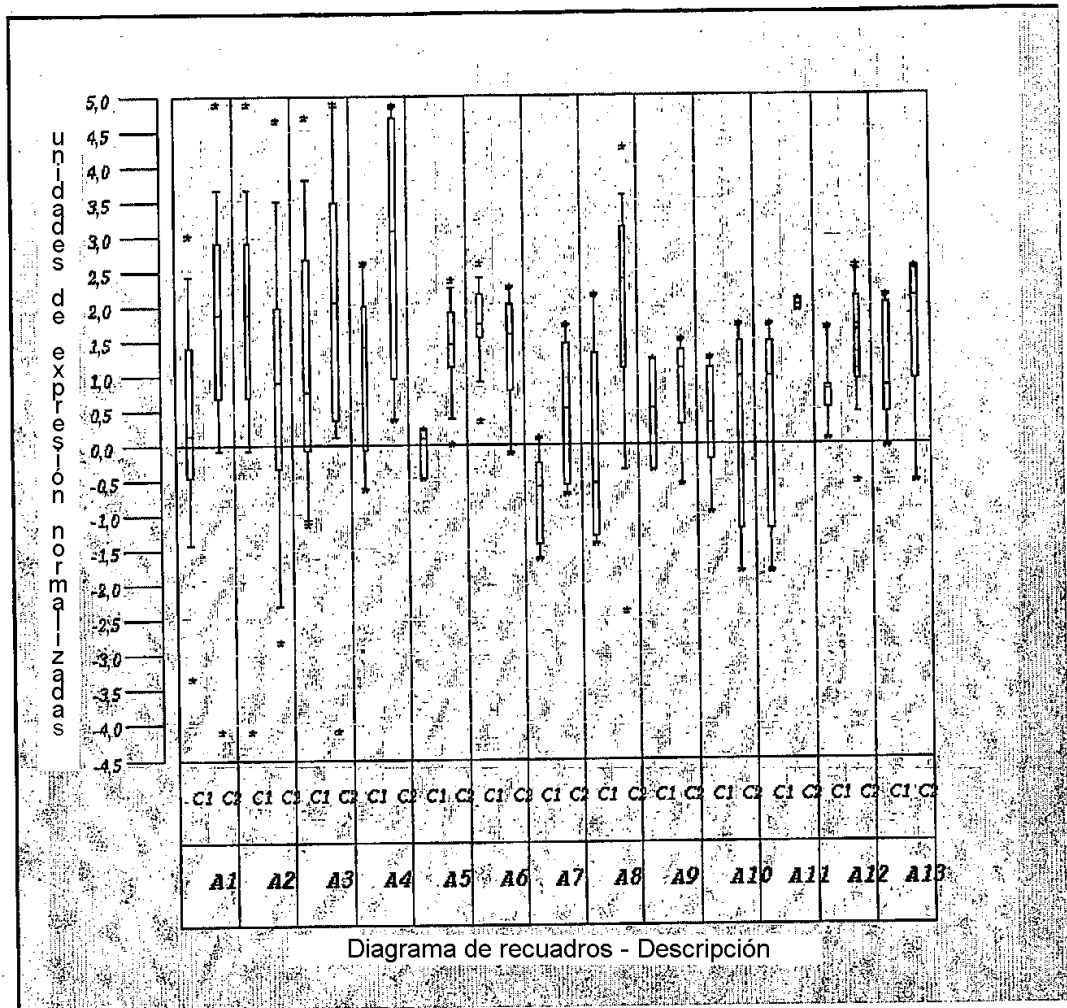


Figura 8

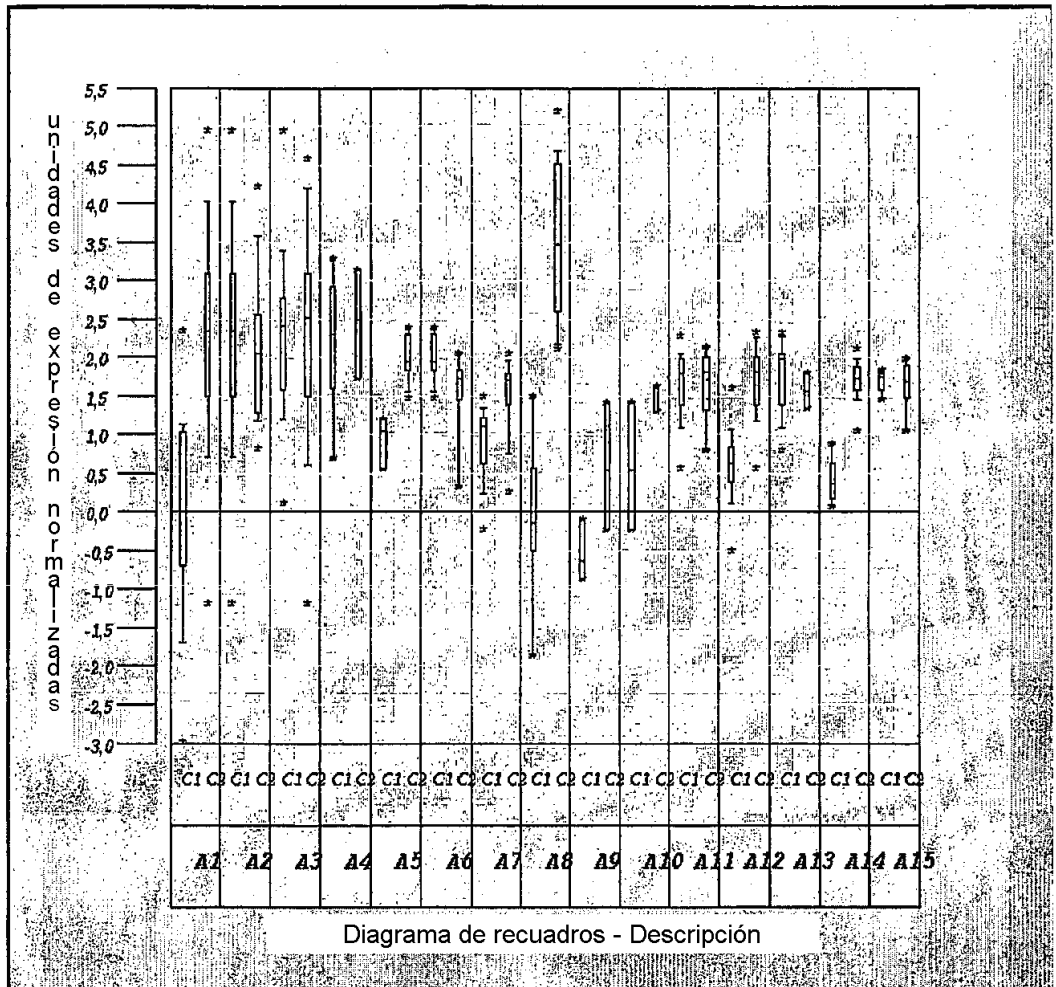


Figura 9