

ALGORITMOS Y MÉTODOS PARA EVALUAR DESENLANCES CLÍNICOS TARDÍOS

EN CÁNCER DE PRÓSTATA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/458,474 presentada el 13 de febrero de 2017, la Solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/473,204 presentada el 17 de marzo de 2017 y la solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/578,622, presentada el 30 de octubre de 2017.

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente divulgación se refiere a los usos de un algoritmo de prueba de la Puntuación Genómico de Próstata™ (GPS™) basado en la expresión de múltiples genes para la evaluación de diversos desenlaces clínicos en pacientes con cáncer de próstata, como los riesgos de recidiva clínica (RC), también denominados en el presente documento como metástasis, recidiva bioquímica (RBQ), metástasis distantes (Mets) y muerte por cáncer de próstata (MCP) y, en algunos casos, para determinar opciones de manejo clínico para pacientes con cáncer de próstata de riesgo intermedio y bajo.

INTRODUCCIÓN

[0002] La introducción del examen de antígeno prostático específico (PSA) en 1987 ha conducido al diagnóstico y tratamiento agresivo de muchos casos de cáncer de próstata indolente que nunca habrían sido significativos clínicamente o causado la muerte. La razón de esto es que la historia natural del cáncer de próstata en la mayoría de los casos es indolente e incluso si no se trata, no progresará durante el curso de la vida de un hombre para causar sufrimiento o muerte. Si bien aproximadamente la mitad de los hombres desarrollan cáncer de próstata invasivo durante su vida (según lo detectado por los estudios de autopsia) (B. Halpert et al, Cancer 16: 737-742 (1963); B. Holund, ScandJ Urol Nephrol 14: 29-35 (1980); S. Lundberg et al., Scand J Urol Nephrol 4: 93-97 (1970); M. Yin et al., J

Urol 179: 892-895 (2008)), solamente el 17% será diagnosticado con cáncer de próstata y solamente el 3% morirá como consecuencia del cáncer de próstata. Datos de cáncer y figuras: Atlanta, GA: Sociedad estadounidense del cáncer (2010); JE Damber et al., Lancet 371: 1710-1721 (2008).

[0003] Sin embargo, en la actualidad, un alto porcentaje de hombres que son diagnosticados con cáncer de próstata, incluso cáncer de próstata de riesgo bajo, son tratados por prostatectomía radical inmediata (RP) o radioterapia definitiva. MR Cooperberg y otros, J Clin Oncol 28: 1117-1123 (2010); MR Cooperberg y otros, J Clin Oncol 23: 8146-8151 (2005). La cirugía y la radioterapia reducen el riesgo de recidiva y muerte por cáncer de próstata (AV D'Amico et al., Jama 280: 969-974 (1998); M Han y otros, Urol Clin North Am 28: 555-565 (2001); WU Shipley et al., Jama 281: 1598-1604 (1999); AJ Stephenson et al., J Clin Oncol 27: 4300-4305 (2009)), sin embargo, las estimaciones del número de hombres que deben tratarse para prevenir una muerte por cáncer de próstata varían de 12 a 100. A Bill-Axelson y col., J. Natl Cancer Inst 100: 1144-1154 (2008); J Hugosson et al., Lancet Oncol 11: 725-732 (2010); LH Klotz et al., Can J Urol 13 Suppl 1: 48-55 (2006); S Loeb y otros, J Clin Oncol 29: 464-467 (2011); FH Schroder et al., N Engl J Med 360: 1320-1328 (2009). Este tratamiento excesivo del cáncer de próstata implica un costo de dinero y toxicidad. Por ejemplo, la mayoría de los hombres que se someten a una prostatectomía radical sufren de incontinencia e impotencia como resultado del procedimiento (MS Litwin et al., Cancer 109: 2239-2247 (2007); MG Sanda et al., N Engl J Med 358: 1250 -1261 (2008), y hasta un 25% de los hombres lamentan su elección de tratamiento para el cáncer de próstata. FR Schroeck et al., Eur Urol 54: 785-793 (2008).

[0004] Una de las razones para el tratamiento excesivo del cáncer de próstata es la falta de herramientas de pronóstico adecuadas para diferenciar a los hombres que necesitan una terapia definitiva inmediata de aquellos que son candidatos apropiados para aplazar la terapia inmediata y someterse a una vigilancia activa. Por ejemplo, de los hombres que parecen tener una enfermedad de riesgo bajo de acuerdo con los resultados de la estadificación clínica, el PSA previo al tratamiento y la puntuación de Gleason de la biopsia, y que han sido manejados con vigilancia activa en protocolos, el 30-40%

experimentan progresión de la enfermedad (diagnosticada al aumentar el PSA, una puntuación de Gleason mayor en la repetición de la biopsia o la progresión clínica) durante los primeros años de seguimiento, y algunos de ellos pueden haber perdido la oportunidad de recibir terapia curativa. HB Carter et al., J Urol 178: 2359-2364 y la discusión 2364-2355 (2007); MA Dall'Era et al., Cancer 112: 2664-2670 (2008); L Klotz y otros, J Clin Oncol 28: 126-131 (2010). Además, de los hombres que parecen ser candidatos para vigilancia activa, pero que de todos modos se someten a una prostatectomía inmediata, en la cirugía se observa que el 30-40% tiene una enfermedad de mayor riesgo que la esperada, definido como riesgo alto (puntuación de Gleason de 3+4 o superior) o enfermedad no confinada al órgano (extensión extracapsular (ECE) o compromiso de la vesícula seminal (SVI)). SL et al., J Urol 181: 1628-1633 y discusión 1633-1624 (2009); CR Griffin et al. J Urol 178: 860-863 (2007); PW Mufarrij et al., J Urol 181: 607-608 (2009).

[0005] Las estimaciones del riesgo de recidiva y las decisiones de tratamiento en el cáncer de próstata actualmente se basan principalmente en los niveles de PSA y/o la clasificación clínica del tumor y su estadio. Aunque se ha demostrado que el estadio clínico del tumor tiene una asociación significativa con el resultado, lo suficiente como para incluirlo en los informes de patología, la declaración consensuada del Colegio Americano de Patólogos señaló que existen variaciones en el enfoque de la adquisición, interpretación, informe y análisis de esta información. C. Compton, et al., Arch Pathol Lab Med 124: 979-992 (2000). Como consecuencia, los métodos de estadificación patológica existentes han sido criticados por carecer de reproducibilidad y, por lo tanto, pueden proporcionar estimaciones imprecisas del riesgo individual del paciente.

[0006] Para proporcionar información adicional que ayude a determinar la probabilidad de los resultados clínicos, se han realizado estudios para buscar marcadores de expresión génica que puedan predecir la probabilidad de recidiva clínica y se han desarrollado y comercializado algoritmos que evalúan, por ejemplo, los niveles de expresión de múltiples genes. E. Klein et al., Eur Urol 66: 550-560 (2014); J. Cullen, et al., Eur Urol 68: 123-131 (2015); la Publicación de Patente Internacional No. WO 2013/116144, cada una de las cuales es incorporada en el presente documento como referencia. La presente divulgación

se refiere a métodos para usar un ensayo que mide los niveles de expresión de al menos 12 genes diferentes de varios subconjuntos de genes, por ejemplo, como un medio para determinar, para pacientes ubicados en un grupo de riesgo muy bajo, bajo, intermedio, o alto basándose en otros parámetros, sus riesgos relativos para ciertos eventos a largo plazo, tales como recidiva clínica (RC), recidiva bioquímica (RBQ), metástasis distantes (Mets) y muerte por cáncer de próstata (MCP). En algunas modalidades, el resultado de la Puntuación Genómico de Próstata (GPS) de un paciente, combinado con sus características clínicas y patológicas, lo ubica en una categoría de riesgo diferente a la de su grupo de riesgo clínico original. En algunas modalidades, esto refina e individualiza aún más el riesgo estimado de un paciente para enfermedad agresiva y permite mejores planes de tratamiento para los pacientes.

RESUMEN

[0007] La presente divulgación, en algunas modalidades, incluye métodos para predecir la probabilidad de resultados clínicos adversos en un paciente con cáncer de próstata, como RBQ, Mets y MCP, que comprende: (a) medir, en una muestra biológica que contiene células cancerosas obtenidas del paciente, los niveles de transcritos de ARN de los siguientes genes: BGN, COL1A1, COL1A1, SFRP4, FLNC, GSN, TPM2, GSTM2, FAM13C, KLK2, AZGP1, SRD5A2 y TPX2; (b) normalizar los niveles de los transcritos de ARN de los genes para obtener niveles de expresión génica normalizados; (c) calcular una puntuación cuantitativa (QS) para el paciente, como un resultado de GPS como se describe en este documento; (d) asignar el paciente a un grupo de puntuación cuantitativa, caracterizado por (i) el paciente es asignado a un grupo de puntuación inferior si el QS del paciente es $< o \geq$ a un umbral de 38, 39, 40, 41, o 42; y (ii) el paciente es asignado a un grupo de puntuación alta si el QS del paciente es $> o \geq$ a un umbral de 38, 39, 40, 41 o 42; y opcionalmente (e) predecir el riesgo de un resultado clínico adverso para el paciente, como RC, RBQ, Mets y MCP, según el grupo de puntuación del paciente, en donde un grupo de puntuación más bajo indica un riesgo menor de resultado clínico adverso que un grupo de puntuación alta. En algunas modalidades, en la parte (d), el paciente es asignado a un grupo de puntuación más bajo si el QS del paciente es o bien $< o \leq 40$; y (ii) el paciente es asignado a un grupo

de puntuación alta si el QS del paciente es o bien $>$ o ≥ 40 . En algunas modalidades, en la parte (d), el paciente es asignado a un grupo de puntuación inferior si el QS del paciente es ≤ 40 ; y (ii) el paciente es asignado a un grupo de puntuación alta si el QS del paciente es > 40 . En algunas modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es o bien $<$ o $\leq$ a un umbral adicional de 18, 19, 20, 21, o 22 y es asignado a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es o bien $>$ o $\geq$ a un umbral de 18, 19, 20, 21 o 22 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación alta. En algunas modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es o bien $<$ o ≤ 20 y es asignado a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es o bien $>$ o ≥ 20 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación más alta. En algunas modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es ≤ 20 y es asignado a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es > 20 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación más alta. Por lo tanto, en algunas modalidades, los pacientes se ubican en los siguientes tres grupos: $QS < 20$, $QS < 20$ pero < 40 , y $QS > 40$. En cualquiera de las modalidades, el QS puede ser un GPS como se describe en este documento.

[0008] En algunas modalidades de los métodos anteriores, el paciente es un paciente de riesgo muy bajo o bajo, riesgo intermedio o riesgo alto. En algunas de tales modalidades, el paciente es un paciente de riesgo muy bajo o bajo, riesgo intermedio o riesgo alto de acuerdo con una de las clasificaciones de la AUA/EAU o NCCN o ambas clasificaciones. En algunas modalidades, el método pretende, además, proporcionar un informe que proporciona la puntuación cuantitativa y el grupo de puntuación del paciente. En algunas modalidades, los niveles de los transcritos de ARN se normalizan frente a al menos un gen de referencia elegido de GUS, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra fresca, congelada o fija, preservada en parafina. En algunas modalidades, los niveles de los transcritos de ARN se determinan utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-

PCR). En algunas modalidades, el método comprende además determinar el tratamiento para el paciente basándose en el grupo de puntuación cuantitativa del paciente. En algunas modalidades, el resultado clínico adverso es uno o más de recidiva clínica (RC), recidiva bioquímica (RBQ), metástasis distantes (Mets) o muerte por cáncer de próstata (MCP).

[0009] La presente divulgación también abarca métodos para asignar un riesgo relativo de resultados clínicos adversos a un paciente con cáncer de próstata de riesgo bajo o intermedio, que comprende: (a) medir, en una muestra biológica que contiene células cancerosas obtenidas del paciente, los niveles de transcritos de ARN de los siguientes genes: BGN, COL1A1, SFRP4, FLNC, GSN, TPM2, GSTM2, FAM13C, KLK2, AZGP1, SRD5A2 y TPX2; (b) normalizar los niveles de transcritos de ARN de los genes para obtener niveles de expresión génica normalizados; (c) calcular una puntuación cuantitativa (QS) para el paciente, como un resultado de GPS como se describe en este documento; y (d) asignar el paciente a un grupo de puntuación cuantitativa, en donde (i) el paciente es asignado a un grupo de puntuación inferior si el QS del paciente es o bien $<$ o $\leq$ de un umbral de 38, 39, 40, 41 o 42; y (ii) el paciente es asignado a un grupo de puntuación alta si el QS del paciente es o bien $>$ o $\geq$ a un umbral de 38, 39, 40, 41 o 42. En algunas modalidades, en la parte (d), el paciente es asignado a un grupo de puntuación más bajo si el QS del paciente es o bien $<$ o $\leq$ 40; y (ii) el paciente es asignado a un grupo de puntuación alta si el QS del paciente es o bien $>$ o $\geq$ 40. En algunas modalidades, en la parte (d), el paciente es asignado a un grupo de puntuación inferior si el QS del paciente es $\leq$ 40; y (ii) el paciente es asignado a un grupo de puntuación alta si el QS del paciente es $>$ 40. En algunas modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es o bien $<$ o $\leq$ de un umbral adicional de 18, 19, 20, 21, o 22 y es asignado a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es o bien $>$ o $\geq$ a un umbral de 18, 19, 20, 21 o 22 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación alta. En algunas modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es o bien $<$ o $\leq$ 20 y es asignado a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es o bien $>$ o $\geq$ 20 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación más alta. En algunas

modalidades, para un paciente en el grupo de puntuación más baja de la parte (d)(i), el paciente es asignado a un grupo de puntuación baja si el QS del paciente es ≤ 20 y se asigna a un grupo de puntuación intermedia si el QS del paciente es > 20 y si el paciente no se encuentra dentro del grupo de puntuación más alta. En algunas modalidades, el QS es un GPS como se describe en este documento.

[00010] En algunas modalidades, el paciente, es un paciente de riesgo intermedio. En algunas de tales modalidades, el paciente es un paciente de riesgo intermedio de acuerdo con una de las clasificaciones de la AUA/EAU o NCCN o ambas clasificaciones. En algunas modalidades, el método pretende, además proporcionar un informe que proporciona la puntuación cuantitativa y el grupo de puntuación del paciente. En algunas modalidades, los niveles de los transcritos de ARN se normalizan frente a al menos un gen de referencia elegido de GUS, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra fresca, congelada o fija, preservada en parafina. En algunas modalidades, los niveles de los transcritos de ARN se determinan utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR). En algunas modalidades, el método comprende además determinar el tratamiento para el paciente basándose en el grupo de puntuación cuantitativa del paciente. En algunas modalidades, el paciente es un paciente de riesgo intermedio y, si el paciente está en el grupo de puntuación más alta, el método pretende, además refinar la estimación del riesgo para el paciente de manera similar a un paciente de riesgo alto, y opcionalmente, si el paciente está en el grupo de puntuación más baja, el método comprende mantener la clasificación del paciente como paciente de riesgo intermedio. En algunas modalidades, el método comprende, además, si el paciente está en el grupo de puntuación alta, tratar al paciente con terapia multimodal o con una terapia estándar para un paciente de riesgo alto. En algunas de tales modalidades, la terapia multimodal comprende (a) administración de al menos un agente de terapia hormonal y/o (b) administración de al menos un agente de inmunoterapia y/o (c) administración de al menos un agente de quimioterapia y/o (d) cirugía y/o (e) radiación, es decir, cualquier combinación de (a)-(e). En algunas modalidades, si el paciente está en el grupo de puntuación baja, el método comprende, además, de tratar o manejar al paciente con vigilancia activa.

[00011] La presente descripción también abarca métodos para tratar a un paciente con cáncer de próstata de riesgo intermedio determinado por tener una puntuación cuantitativa según los métodos anteriores en el grupo de puntuación alta, que comprende administrar una terapia multimodal al paciente. En algunas modalidades, la terapia multimodal comprende (a) la administración de al menos un agente de terapia hormonal y/o (b) la administración de al menos un agente de inmunoterapia, y/o (c) la administración de al menos un agente de quimioterapia y/o (d) cirugía, y/o (e) radiación, y/o (f) cualquier combinación de (a)-(e).

DESCRIPCIONES DE LOS DIBUJOS

[00012] La **Fig. 1A** proporciona un gráfico que muestra la proporción de sujetos con cáncer de próstata que permanecieron libres de metástasis durante un período de 20 años dentro de cada uno de los cuatro grupos de riesgo (muy bajo, bajo, intermedio y alto) según la NCCN (Pautas Nacionales de Práctica Clínica en Oncología)). Un total de 259 sujetos fueron analizados. **La Fig. 1B** muestra la proporción de sujetos en los cuatro grupos que no experimentaron muerte por cáncer de próstata (MCP) durante el mismo período de 20 años.

[00013] La **Fig. 2A** muestra la distribución de los 259 sujetos con cáncer de próstata en los grupos de riesgo según la NCCN y proporciona el número de sujetos en cada uno de los grupos de riesgo muy bajo + bajo, riesgo intermedio y riesgo alto, y muestra el rango y la mediana del Puntaje Genómico de Próstata (GPS) para cada uno de los grupos. La **Fig. 2B** muestra la distribución de las puntuaciones de los grupos de andrógenos en cada uno de los grupos de riesgo de la NCCN.

[00014] La **Fig. 3** muestra el riesgo a 10 años de metástasis contra el GPS en los grupos de riesgo muy bajo + bajo, intermedio y alto según la NCCN.

[00015] La **Fig. 4** muestra el riesgo a 10 años de muerte contra GPS en los grupos de riesgo muy bajo + bajo, intermedio y altos según la NCCN.

[00016] La **Fig. 5** muestra los índices de riesgo estandarizados para el GPS y las puntuaciones de estroma subyacente, organización celular, andrógenos y proliferación asociados con la predicción de metástasis (Mets; panel izquierdo) y muerte por cáncer de próstata (MCP, panel derecho).

DEFINICIONES

[00017] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton et al., Diccionario de Microbiología y Biología Molecular 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994), y March, Reacciones de Química Orgánica Avanzada, Mecanismos y Estructura 4a ed., John Wiley & Sons (Nueva York), NY 1992), proporciona a un experto en la materia una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

[00018] Un experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían ser usados en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos en este documento. Para los fines de la invención, los siguientes términos se definen a continuación.

[00019] Los términos "tumor" y "lesión" como se usan en este documento, se refieren a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los expertos en la materia se darán cuenta que una muestra de tejido tumoral puede comprender múltiples elementos biológicos, como una o más células cancerosas, células parciales o fragmentadas, tumores en diversos estadios, tejido circundante de apariencia histológicamente normal y/o macro o micro-tejido disecado.

[00020] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer en la presente divulgación incluyen cáncer del tracto urogenital, como el cáncer de próstata.

[00021] Como se usa en el presente documento, el término "cáncer de próstata" se usa en el sentido más amplio y se refiere a todos los estadios y todas las formas de cáncer que surgen del tejido de la glándula prostática.

[00022] La estadificación del cáncer ayuda al médico a evaluar hasta qué punto ha progresado la enfermedad y a planificar un tratamiento para el paciente. La estadificación puede realizarse clínicamente (estadificación clínica) mediante examen físico, análisis de sangre o respuesta a la radioterapia y/o patológicamente (estadificación patológica) basado en cirugía, tal como la prostatectomía radical. Según el sistema de estadificación de tumores, nódulos, metástasis (TNM) del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC), Manual de estadificación del cáncer de la AJCC (7ª ed., 2010), los distintos estadios del cáncer de próstata se definen de la siguiente manera: Tumor: T1: tumor clínicamente no aparente, no palpable o visible mediante imágenes, T1a: hallazgo incidental histológico del tumor en 5% o menos de tejido resecado, T1b: hallazgo incidental histológico del tumor en más del 5% de tejido resecado, T1c: tumor identificado por biopsia con aguja; T2: tumor confinado dentro de la próstata, T2a: el tumor afecta a la mitad de un lóbulo o menos, T2b: el tumor afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no a ambos lóbulos, T2c: el tumor afecta a ambos lóbulos; T3: el tumor se extiende a través de la cápsula prostática, T3a: extensión extracapsular (unilateral o bilateral), T3b: el tumor invade la(s) vesícula(s) seminal (es); T4: el tumor está fijo o invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales (cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores o pared pélvica). En general, un estadio T clínico (cT) es T1 o T2 y el estadio T patológico T (pT) es T2 o superior. Nódulo: NO: no hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales; N1: metástasis en ganglios linfáticos regionales. Metástasis: MO: sin metástasis a distancia; M1: metástasis a distancia presente.

[00023] El sistema de puntuación de Gleason se usa para ayudar a evaluar el pronóstico de los hombres con cáncer de próstata. En conjunto con otros parámetros, se incorpora a una estrategia de estadificación del cáncer de próstata, que predice el pronóstico y ayuda a guiar la terapia. Se otorga una "puntuación" o "grado" de Gleason al cáncer de próstata según su apariencia microscópica. Los tumores con un puntuación de Gleason baja

generalmente crecen lo suficientemente lento como para que no representen una amenaza significativa para los pacientes en sus vidas. Estos pacientes pueden ser monitoreados mediante "espera vigilante" o "vigilancia activa" a lo largo del tiempo. Los cánceres con una puntuación de Gleason más alta pueden ser más agresivos y tener un peor pronóstico, y estos pacientes generalmente se tratan con cirugía (p. ej., prostatectomía radical) y, en algunos casos, otras terapias (p. ej., radiación, hormonas, ultrasonido, quimioterapia). Las puntuaciones de Gleason (o sumas) comprenden los grados de los dos patrones de tumores más comunes. Estos patrones se conocen como patrones de Gleason del 1 al 5, siendo el patrón 1 el más bien diferenciado. La mayoría tienen una mezcla de patrones. Para obtener una puntuación o calificación de Gleason, el patrón dominante se agrega al segundo patrón más frecuente para obtener un número entre 2 y 10. Los grados de Gleason son los siguientes: GGG1 (GS ≤ 6), GGG2 (GS $3 + 4 = 7$), GGG3 (GS $4 + 3 = 7$), GGG4 (GS $4 + 4 = 8$, GS $3 + 5 = 8$, GS $5 + 5 = 8$) y GGG5 (GS 9 o 10).

[00024] Agrupaciones por estadios: Estadio I: T1a N0 M0 G1; Estadio II: (T1a N0 M0 G2-4) o (T1b, c, T1, T2, N0 M0 cualquier G); Estadio III: T3 N0 M0 cualquier G; Estadio IV: (T4 N0 M0 cualquier G) o (Cualquier T N1 M0 cualquier G) o (Cualquier T Cualquier N M1 Cualquier G).

[00025] El término "aumento de grado" como se usa en este documento se refiere a un aumento en el grado de Gleason determinado a partir de la biopsia hasta el grado de Gleason determinado a partir de la prostatectomía radical (PR). Por ejemplo, el aumento del grado incluye un cambio en el grado de Gleason de $3 + 3$ o $3 + 4$ en la biopsia a $3 + 4$ o mayor en RP. Un "aumento de grado significativo" o "aumento de grado 2" como se usa en este documento, se refiere a un cambio en el grado de Gleason de $3 + 3$ o $3 + 4$ determinado a partir de la biopsia a $4 + 3$ o mayor, o compromiso de la vesícula seminal (SVI), o extensión extracapsular (ECE) como se determina a partir de RP.

[00026] El término "grado alto", como se usa en este documento, se refiere a la puntuación de Gleason de $\geq 3 + 4$ o $\geq 4 + 3$ en RP. El término "grado bajo", como se usa en este documento, se refiere a una puntuación de Gleason de $3 + 3$ en RP. En una

realización particular, la enfermedad de " grado alto " se refiere a la puntuación de Gleason de al menos el patrón mayor 4, el patrón menor 5 o el patrón terciario 5.

[00027] El término "aumento de estadio" como se usa en el presente documento se refiere a un aumento en el estadio del tumor a partir de la biopsia a estadio de tumor en RP. Por ejemplo, el aumento de estadio es un cambio en el estadio del tumor de estadio clínico T1 o estadio T2 en la biopsia a estadio patológico T3 en la PR.

[00028] El término "enfermedad no confinada al órgano", como se usa en el presente documento, se refiere a tener una enfermedad en estadio patológico T3 en RP. El término "órgano confinado" como se usa en este documento se refiere al estadio patológico pT2 en RP. El término "enfermedad de grado alto o no confinada al órgano" se refiere a cáncer de próstata con una puntuación de Gleason de al menos el patrón principal 4, el patrón menor 5, o el patrón terciario 5, o el estadio patológico T3.

[00029] El término "patología adversa" o "AP", como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad de grado alto como se define anteriormente, o enfermedad no confinada al órgano como se define anteriormente. En una modalidad particular, "patología adversa" se refiere a cáncer de próstata con una puntuación de Gleason de $\geq 3 + 4$ o $\geq 4 + 3$ o GS $\geq 4 + 3$ y/o estadio patológico T3.

[00030] Los pacientes con cáncer de próstata se pueden ubicar en "grupos de riesgo" o "clasificaciones de riesgo" particulares según ciertos sistemas de clasificación de riesgo reconocidos proporcionados por la Asociación Americana de Urología (AUA) o las Pautas Nacionales de Práctica Clínica en Oncología (NCCN) o por el Sistema de Puntuación de Evaluación de Riesgo de Cáncer de Próstata de la UCSF (CAPRA). Así, en general, el término "clasificación de riesgo" o "grupo de riesgo" significa una agrupación de sujetos basada en un conjunto de factores pronósticos como el nivel de PSA, la puntuación de Gleason y el estadio clínico, y similares, que se han clasificado con un nivel similar de riesgo de resultados clínicos negativos, como bajo, medio o alto.

[00031] Por ejemplo, según las pautas de la AUA para 2007, un paciente de "riesgo bajo" es uno que tiene un nivel de antígeno prostático (PSA) de 10 ng/mL o menos, una

puntuación de Gleason de 6 o menos y un estadio clínico de T1c o T2a. Un paciente de "riesgo alto" según la AUA tiene un PSA de > 20 ng/mL, o una puntuación de Gleason de 8-10, o un estadio clínico T2c. Un paciente de "riesgo intermedio" según la AUA tiene un PSA de > 10 ng/mL a 20 ng/mL, o una puntuación de Gleason de 7, o un estadio clínico T2b, pero no cumple ninguna de las condiciones de "riesgo alto". Según las pautas de la NCCN para el cáncer de próstata (Versión 2.2017), un paciente de "riesgo muy bajo" tiene un estadio T1c, una puntuación de Gleason menor o igual a 6, un PSA de menos de 10 ng/mL, una densidad de PSA de menos de 0,15 ng/mL/g, y menos de 3 núcleos de biopsia de próstata que son positivos, con menos de o igual a 50% de cáncer en cada núcleo. Un paciente de riesgo bajo según la NCCN tiene un estadio clínico de T1-T2a, una puntuación de Gleason menor o igual a 6 y un PSA de menos de 10 ng/mL. Un paciente con "riesgo alto" según la NCCN tiene un estadio clínico de T3a, o una puntuación de Gleason de 8-10, o PSA de > 20 ng/mL. Un paciente de "riesgo intermedio" según NCCN tiene un grado clínico de T2b-T2c, o una puntuación de Gleason de 7, o PSA de 10-20 ng/mL. La puntuación CAPRA se calcula a partir de la edad en el momento del diagnóstico, el PSA en el momento del diagnóstico, la puntuación de Gleason de la biopsia, el estadio clínico y el porcentaje de núcleos de biopsia comprometidos con el cáncer, y se asigna una puntuación a cada variable para obtener la puntuación resultante. Un puntaje de CAPRA de 0-2 indica un riesgo bajo, un puntaje de 3-5 indica un riesgo intermedio, y un puntaje de 6-10 indica un riesgo alto. La referencia a, por ejemplo, un paciente de "riesgo intermedio" en este documento sin proporcionar el sistema de puntuación utilizado (por ejemplo, AUA, NCCN o CAPRA) significa un paciente que se encuentra dentro del grupo de riesgo intermedio de al menos uno de esos sistemas. De manera similar, la referencia a un paciente de "riesgo bajo" sin hacer referencia a un sistema en particular significa un paciente que se encuentra dentro del grupo de riesgo bajo o muy bajo de al menos uno de esos sistemas. La referencia a un paciente de "riesgo alto" sin hacer referencia a un sistema en particular significa un paciente que se encuentra dentro del grupo de riesgo alto de al menos uno de esos sistemas.

[00032] Una "terapia estándar", como se usa en este documento, como una terapia estándar para un paciente de riesgo alto o un paciente de riesgo bajo, se refiere a uno o

más tipos de terapias recomendadas por organismos como la AUA o NCCN para tales pacientes.

[00033] Tal como se usa en el presente documento, los términos "vigilancia activa" y "espera vigilante" comprenden el monitoreo cercano de la condición de un paciente sin administrar ningún tratamiento hasta que los síntomas aparezcan o cambien. El término "espera vigilante" abarca el abandono del tratamiento definitivo del tumor primario de próstata y la provisión de un tratamiento paliativo solamente para la progresión local o metastásica, si esta se produce, como la resección transuretral de la próstata, el tratamiento de la obstrucción del tracto urinario, la terapia hormonal y radioterapia para la paliación de lesiones metastásicas. El término "vigilancia activa" significa un programa de monitoreo clínico regular para el paciente que no incluye tratamiento quirúrgico, radiológico o farmacológico inicial, con el objetivo de monitorear al paciente para detectar cualquier cambio posterior que sugiera la necesidad de un tratamiento definitivo, como radiación quirúrgica y/o tratamiento farmacológico. La vigilancia activa abarca, por ejemplo, pruebas periódicas de PSA, biopsias y otras pruebas periódicas diseñadas para evaluar el estadio del tumor y el riesgo de progresión del tumor.

[00034] Como se usa en el presente documento, el término "cirugía" se aplica a los métodos quirúrgicos realizados para la extirpación de tejido canceroso, incluida la linfadenectomía pélvica, la prostatectomía radical (PR), la resección transuretral de la próstata (RTUP), la escisión, la disección y la biopsia/extirpación del tumor. El tejido tumoral o las secciones utilizadas para el análisis de la expresión génica pueden haberse obtenido a partir de cualquiera de estos métodos.

[00035] Tal como se usa en el presente documento, los términos "muestra biológica que contiene células cancerosas" o "muestra biológica que contiene células tumorales" se refieren de manera intercambiable a una muestra que comprende material tumoral obtenido de un paciente con cáncer. El término abarca muestras de tejido tumoral, por ejemplo, tejido obtenido mediante prostatectomía radical y tejido obtenido mediante biopsia, como, por ejemplo, una biopsia de núcleo o una biopsia con aguja fina. La muestra biológica puede ser fresca, congelada o una muestra de tejido fijada con cera, como una muestra de tejido

fijada con formalina y con parafina. Una muestra biológica también abarca fluidos corporales que contienen células cancerosas, como sangre, plasma, suero, orina y similares. Además, el término "muestra biológica que contiene células cancerosas" abarca una muestra que comprende células tumorales obtenidas de sitios distintos al tumor primario, por ejemplo, células tumorales circulantes. El término también abarca células que son la progenie de las células tumorales del paciente, p. ej. muestras de cultivo celular derivadas de células tumorales primarias o células tumorales circulantes. El término abarca además muestras que pueden comprender proteínas o material de ácido nucleico desprendido de células tumorales *in vivo*, por ejemplo, médula ósea, sangre, plasma, suero y similares. El término también abarca muestras que han sido enriquecidas para células tumorales o manipuladas de otra manera después de su obtención y muestras que comprenden polinucleótidos y/o polipéptidos que se obtienen del material tumoral de un paciente.

[00036] El término "pronóstico" se usa en el presente documento para referirse a la probabilidad de que un paciente con cáncer tenga una progresión o muerte atribuible al cáncer, incluida la recidiva, la diseminación metastásica y la resistencia farmacológica, de una enfermedad neoplásica como el cáncer de próstata. Por ejemplo, un "buen pronóstico" incluiría la supervivencia a largo plazo sin recidiva y un "mal pronóstico" incluiría la recidiva del cáncer.

[00037] El término "recidiva" se usa en el presente documento para referirse a la recidiva local o distante (es decir, metástasis a distancia) del cáncer y abarca tanto la "recidiva clínica" como la "recidiva bioquímica".

[00038] El término "recidiva clínica" o "RC" se refiere a una recidiva como la recidiva local o la metástasis a distancia detectada, por ejemplo, en una biopsia de seguimiento u otro procedimiento clínico.

[00039] El término "recidiva bioquímica" o "RBQ" se refiere a la recidiva detectada sobre la base de un cambio en un marcador bioquímico como el PSA. En algunas modalidades, un nivel de PSA postquirúrgico inicial de > 0,2 ng/mL seguido por un nivel de PSA confirmatorio de > 0,2 ng/mL en una prueba posterior indica RBQ.

[00040] El término "muerte por cáncer de próstata" o "MCP" se refiere a la muerte de un paciente atribuido al cáncer de próstata, incluida la recidiva de un cáncer de próstata identificado anteriormente en el paciente.

[00041] El término "metástasis distantes" o "Mets" se refiere a la recidiva de cáncer en un sitio distante del tumor de próstata original, como en el hueso o en uno o más ganglios linfáticos distantes o en otro órgano o tejido no prostático.

[00042] El término "intervalo libre de recidiva clínica (cRFI)" se usa en el presente documento como el tiempo desde la cirugía hasta la primera recidiva clínica o la muerte debido a la recidiva clínica del cáncer de próstata. Si el seguimiento finalizó sin que se produjera una recidiva clínica, u otros cánceres primarios o la muerte ocurriera antes de la recidiva clínica, el tiempo hasta la cRFI se considera censurado; cuando esto ocurre, la única información conocida es que, hasta el momento de la censura, no se ha producido recidiva clínica en este tema. Las recidivas bioquímicas se ignoran para los efectos del cálculo de cRFI.

[00043] El término "intervalo libre de recidiva bioquímica (bRFI)" se usa en el presente documento para indicar el tiempo desde la cirugía hasta la primera recidiva bioquímica del cáncer de próstata. Si la recidiva clínica ocurrió antes de la recidiva bioquímica, el seguimiento finalizó sin la aparición de bRFI, u otros cánceres primarios o la muerte antes de la recidiva bioquímica, el tiempo hasta la recidiva bioquímica se considera censurado al presentarse uno de estos.

[00044] En la práctica, el cálculo de las medidas de tiempo hasta el evento enumeradas anteriormente puede variar de un estudio a otro según la definición de los eventos que se considerarán censurados.

[00045] Como se usa en el presente documento, el término "nivel de expresión" o "nivel" de un gen se refiere al nivel de expresión de un transcrito de ARN del gen o de su producto de traducción polipeptídico. Como se usa en este documento, el término "nivel normalizado" o "nivel de expresión normalizado" de un gen en este documento se refiere al nivel de expresión de un transcrito de ARN del gen o de su producto de traducción polipeptídico

después de la normalización frente al nivel de expresión de uno o más genes referenciados en este documento.

[00046] El término "producto génico" o "producto de expresión" se usa en el presente documento para referirse a los productos de transcripción (transcritos) de ARN (ácido ribonucleico) del gen, incluido el ARNm, y los productos de traducción de polipéptidos de dichos transcritos de ARN. Un producto génico puede ser, por ejemplo, un ARN no empalmado, un ARNm, una variante de empalme de ARNm, un microARN, un ARN fragmentado, un polipéptido, un polipéptido modificado post-traduccionalmente, un polipéptido variante de empalme, etc.

[00047] El término "transcritos de ARN" como se usa en el presente documento, se refiere a los productos de transcripción de ARN de un gen, que incluyen, por ejemplo, ARNm, un ARN no empalmado, una variante de empalme de ARNm, un microARN y un ARN fragmentado.

[00048] A menos que se indique lo contrario, cada nombre de gen utilizado en este documento corresponde al Símbolo Oficial asignado al gen y proporcionado por Entrez Gene (URL: [www \(punto\) ncbi \(punto\) nlm \(punto\) gov \(barra\) sitios \(barra\) entrez](http://www.ncbi.nlm.gov/sites/entrez)) a partir de la fecha de presentación de esta solicitud.

[00049] El término "microarreglo" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, por ejemplo, oligonucleótido o sondas polinucleotídicas, sobre un sustrato.

[00050] El término "polinucleótido" generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxiribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Así, por ejemplo, los polinucleótidos como se definen en este documento incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que incluye regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que incluye regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, típicamente, bicatenarias o incluyen regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, el término "polinucleótido" como se usa en el

presente documento se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las hebras en tales regiones pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir todas una o más de las moléculas, pero más típicamente involucran solo una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente los ADNc. El término incluye los ADN (incluidos los ADNc) y los ARN que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o ARN con esqueletos modificados para la estabilidad o por otras razones, son "polinucleótidos" como se pretende con el término en este documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, como la inosina, o bases modificadas, como las bases tritadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" como se define en el presente documento. En general, el término "polinucleótido" abarca todas las formas químicas, enzimáticas y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluidas las células simples y complejas.

[00051] El término "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido relativamente corto, que incluye, sin limitación, desoxirribonucleótidos monocatenarios, ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, híbridos de ARNr y ADN bicatenarios. Los oligonucleótidos, como sondas de oligonucleótidos de ADN de cadena simple, a menudo se sintetizan mediante métodos químicos, por ejemplo, utilizando sintetizadores de oligonucleótidos automáticos que están disponibles comercialmente. Sin embargo, los oligonucleótidos pueden prepararse mediante una variedad de otros métodos, que incluyen técnicas mediadas por ADN recombinante in vitro y por expresión de ADN en células y organismos.

[00052] El término "Ct", como se usa en el presente documento, se refiere al ciclo umbral, el número de ciclo en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en el que la fluorescencia generada dentro de una reacción excede el umbral definido, es decir, el punto durante la reacción en el cual un número suficiente de los amplicones se han acumulado para alcanzar con el umbral definido.

[00053] El término "Cp" como se usa en este documento se refiere al "punto de cruce". El valor de Cp se calcula determinando las segundas derivadas de todas las curvas de amplificación de la qPCR y su valor máximo. El valor de Cp representa el ciclo en el que el aumento de la fluorescencia es mayor y donde comienza la fase logarítmica de una PCR.

[00054] El término "umbral" se refiere a un procedimiento utilizado para explicar las relaciones no lineales entre las mediciones de la expresión génica y la respuesta clínica, así como para reducir aún más la variación en las puntuaciones de los pacientes reportados. Cuando se aplica un umbral, todas las mediciones por debajo o por encima de un valor de umbral se establecen en ese valor de umbral. Una relación no lineal entre la expresión génica y el resultado podría examinarse utilizando suavizadores o splines cúbicos para modelar la expresión génica en el intervalo libre de recidiva utilizando la regresión de Cox PH o en el estado de patología adversa utilizando la regresión logística. D. Cox, Revista de la "Royal Statistical Society, Serie B 34: 187-220 (1972). La variación en las puntuaciones de pacientes informadas se podría examinar como una función de la variabilidad en la expresión génica en el límite de cuantificación y/o detección de un gen en particular.

[00055] Como se usa en el presente documento, el término "amplicón" se refiere a fragmentos de ADN que se han sintetizado utilizando técnicas de amplificación, como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) y las reacciones en cadena de la ligasa.

[00056] La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más altas para un anillado adecuado, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para hibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se entiende que las temperaturas relativas más altas tienden a hacer que las condiciones de reacción sean más rigurosas, mientras que las temperaturas más bajas lo

son menos. Para obtener detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, consulte Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley Interscience Publishers, 1995).

[00057] "Condiciones de rigurosidad" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en este documento, generalmente: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo, cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecil sulfato de sodio al 0,1% a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con 0,1% de albúmina de suero bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con 750 mM de cloruro de sodio, 75 mM de citrato de sodio a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y formamida al 50%, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

[00058] Las "condiciones moderadamente rigurosas" se pueden identificar como se describe por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de soluciones de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37 °C en una solución que comprende: 20% formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato de sodio (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml ADN desnaturizado de esperma de salmón sonicado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a unos 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para adaptarse a factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[00059] Los términos "empalme" y "empalme de ARN" se usan indistintamente y se refieren al procesamiento de ARN que elimina los intrones y se une a los exones para

producir ARNm maduro con una secuencia de codificación continua que se mueve hacia el citoplasma de una célula eucariota.

[00060] Los términos "correlacionados" y "asociados" se usan de manera intercambiable en este documento para referirse a la asociación, ya sea entre dos entidades medidas o calculadas o alternativamente entre una entidad medida o calculada (por ejemplo, puntuación de Gleason, nivel de PSA, resultado de GPS) y un evento (por ejemplo, RC, MCP).

[00061] Un "cartucho" se refiere a una estructura física que contiene reactivos para procesar una muestra, como reactivos para detectar niveles de transcritos de ARN de una muestra. En algunas modalidades, las reacciones como el termociclado y el tratamiento de la muestra, como la extracción de ARN, pueden tener lugar dentro de un cartucho. Un "pozo" comprendido dentro de un cartucho puede ser una cámara, una indentación, una superficie específica u otro tipo de área específica que pueda contener reactivos particulares, como cebadores y/o sondas, para realizar PCR u otras reacciones químicas.

[00062] Un "sistema basado en computadora" se refiere a un sistema de hardware, software y medio de almacenamiento de datos utilizado para analizar información. El hardware mínimo de un sistema basado en computadora del paciente comprende una unidad central de procesamiento (CPU) y hardware para la entrada de datos, la salida de datos (por ejemplo, pantalla), y almacenamiento de datos. Un experto en la materia puede apreciar fácilmente que cualquier sistema informático actualmente disponible y/o sus componentes son adecuados para su uso en relación con los métodos de la presente divulgación. El medio de almacenamiento de datos puede comprender cualquier fabricación que comprenda una grabación de la presente información como se describe anteriormente, o un dispositivo de acceso a la memoria que pueda acceder a dicha fabricación.

[00063] "Registrar" datos, programación u otra información en un medio legible por computadora se refiere a un proceso para almacenar información, utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Se puede elegir cualquier estructura de almacenamiento de datos conveniente, en función de los medios utilizados para acceder a

la información almacenada. Se puede usar una variedad de programas y formatos de procesadores de datos para el almacenamiento, por ejemplo, procesador de texto, archivo de texto, formato de base de datos, etc.

[00064] Un "procesador" o "medios informáticos" hace referencia a cualquier combinación de hardware y/o software que realizará las funciones requeridas. Por ejemplo, un procesador adecuado puede ser un microprocesador digital programable, tal como el disponible en forma de controlador electrónico, mainframe, servidor o computadora personal (de escritorio o portátil). Cuando el procesador es programable, la programación adecuada puede comunicarse desde una ubicación remota al procesador, o guardarse previamente en un producto de programa informático (como un medio de almacenamiento legible por computadora portátil o fijo, ya sea basado en dispositivos magnéticos, ópticos o de estado sólido). Por ejemplo, un medio magnético o disco óptico puede llevar la programación, y puede ser leído por un lector adecuado que se comunica con cada procesador en su estación correspondiente.

MÉTODOS BASADOS EN ALGORITMO, EL ALGORITMO GPS, Y LOS SUBSETS DE GENES

[00065] La presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico molecular basado en algoritmos para determinar los riesgos relativos de resultados clínicos particulares para un paciente con cáncer de próstata y para asignar a los pacientes a grupos de tratamiento particulares según la puntuación obtenida en el ensayo.

[00066] En algunas modalidades, esta divulgación se refiere a métodos para obtener una puntuación cuantitativa basada en el nivel de expresión de cada uno de los siguientes genes: BGN, COL1A1, SFRP4, FLNC, GSN, GSTM2, TPM2, TPX2, AZGP1, FAM13C, KLK2 y SRD5A2, y uno o más genes de referencia. En algunas modalidades, la puntuación cuantitativa se escala en un rango de 0 a 100 para obtener un Puntaje Global de Próstata (GPS). En algunas modalidades, el puntaje cuantitativo se usa para predecir el riesgo relativo de un desenlace clínico para un paciente como RC, RBQ, Mets y MCP. En algunas

modalidades, el desenlace clínico se considera como de un período de tiempo particular, como 3 años, 5 años o 10 años.

[00067] En algunas modalidades, los métodos incluyen determinar si el GPS del paciente está por encima o por debajo de un valor de umbral particular que sugiera niveles particulares de riesgo de resultados clínicos adversos o de diversos desenlaces clínicos como RC, RBQ, Mets y MCP. En algunas modalidades, el valor umbral es de 18 a 22, como 18, 19, 20, 21 o 22 y en algunas modalidades es de 38 a 42, como 38, 39, 40, 41 o 42 y en algunas modalidades se consideran ambos valores umbral. En algunas modalidades, el valor umbral es 20 y en algunas modalidades es 40 y en algunas modalidades se consideran ambos valores de 20 y 40.

[00068] Como se usa en este documento, una "puntuación cuantitativa" generalmente se refiere a un valor numérico calculado aritmética o matemáticamente para ayudar a simplificar, divulgar o informar el análisis de información cuantitativa más compleja, como la correlación de ciertos niveles de expresión de los genes o subconjuntos de genes descritos a la probabilidad de un parámetro de resultado clínico particular para un paciente con cáncer de próstata. Un puntaje cuantitativo puede ser determinado por la aplicación de un algoritmo específico. En algunas modalidades aquí descritas, se puede determinar una puntuación cuantitativa para un subconjunto particular de genes o un grupo de genes (es decir, una "puntuación de grupo de genes"). La formación de grupos, además, puede facilitar la ponderación matemática de la contribución de varios niveles de expresión de genes o subconjuntos de genes a la puntuación cuantitativa. La ponderación de un gen o grupo de genes que representa un proceso fisiológico o una característica de un componente celular puede reflejar la contribución de ese proceso o característica a la patología del cáncer y el resultado clínico, como RC, RBQ, Mets y MCP.

[00069] El GPS se calcula a partir de los datos de nivel de expresión para un conjunto de genes que comprenden cada uno de los siguientes genes: BGN, COL1A1, SFRP4, FLNC, GSN, GSTM2, TPM2, TPX2, AZGP1, FAM13C, KLK2 y SRD5A2, y para por lo menos un gen de referencia, como uno o más de GUS, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1.

[00070] Los genes analizados se pueden colocar en subconjuntos de genes particulares como parte del algoritmo. Los subconjuntos de genes de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, un grupo de genes de respuesta estromal, un grupo de genes de proliferación, un grupo de genes de señalización de andrógenos y un grupo de genes de organización celular. Los grupos de genes de respuesta y proliferación estromal comprenden genes asociados con peores resultados cuando se expresan en exceso, mientras que los grupos de genes de señalización y organización celular de los andrógenos comprenden genes asociados con peores resultados cuando se expresan en exceso.

[00071] El subconjunto de genes al que se hace referencia en el presente documento como "grupo de genes de respuesta estromal" (también llamado "grupo de genes ECM" o "grupo de genes estromales") incluye los genes BGN, COL1A1 y SFRP4. Los genes en este grupo pueden ser sintetizados predominantemente por células estromales y pueden estar involucrados en la respuesta estromal o pueden coexpresarse con los genes del grupo de genes ECM. Las "células estromales" se denominan en este documento a células de tejido conectivo que forman la estructura de soporte de los tejidos biológicos. Las células estromales incluyen fibroblastos, células inmunes, pericitos, células endoteliales y células inflamatorias.

[00072] El "grupo de genes de organización celular" (también llamado "grupo de genes de migración" o "grupo de genes de regulación de la migración" o "grupo de genes del citoesqueleto") incluye el FLNC, GSN, GSTM2, y genes TPM2. Estos genes pueden comprender genes y genes coexpresados que forman parte de una red de microfilamentos dinámicos de actina y proteínas accesorias y que proporcionan apoyo intracelular a las células, generan las fuerzas físicas para el movimiento y la división celular, así como facilitan el transporte intracelular de las vesículas y organelo celular.

[00073] El "grupo de genes andrógenos" (también llamado "grupo de genes PSA" y "grupo de genes de regulación de PSA") incluye los genes AZGP1, FAM13C, KLK2, AR, ERG y SRD5A2. Estos genes pueden incluir genes de serina proteasas que pertenecen a la familia de las calicreínas (por ejemplo, la calicreína 3 [PSA]), y genes que se expresan juntamente con los genes del grupo de genes andrógenos.

[00074] El "grupo de genes de proliferación" (también llamado "grupo de genes del ciclo celular") comprende el gen TPX2. Este grupo de genes incluye genes que pueden estar involucrados con funciones del ciclo celular, como la proliferación celular y el control del ciclo celular, por ejemplo, transición de fase de control/G1 a S, y genes que se expresan juntamente con dichos genes.

[00075] En algunas modalidades, un algoritmo seleccionado de los algoritmos RS0 a RS27 de la Tabla 5B del documento WO 2013/116144 se puede seleccionar y opcionalmente escalar a entre 0 y 100 para obtener una puntuación cuantitativa a partir de la cual evaluar a un paciente, por ejemplo, para determinar el riesgo relativo de un desenlace clínico como RC, RBQ, Mets o MCP. En algunas modalidades, el conjunto de genes comprende al menos un gen de cada uno de los grupos de respuesta estromal, el grupo de organización celular, el grupo de andrógenos y el grupo de proliferación. En algunas modalidades, el algoritmo puede modificarse, por ejemplo, para agregar o eliminar uno o más genes de uno o más de los grupos de genes discutidos anteriormente, o para agregar un grupo de genes adicional. En algunas modalidades, el desenlace clínico se considera como de un período de tiempo particular, como 3 años, 5 años o 10 años.

Cálculo de GPS

[00076] En algunas modalidades, el resultado cuantitativo es el GPS. El resultado de GPS se puede calcular en una escala de 0 a 100, y se puede derivar de las mediciones de expresión génica normalizadas de referencia de la siguiente manera.

[00077] El GPS no sellado (GPSu) se puede calcular como:

$$\text{GPSu} = 0,735 * \text{Puntuación del grupo de Respuesta Estromal} - 0,368 * \text{Puntuación del grupo de organización celular} - 0,352 * \text{Puntuación del grupo de andrógenos} + 0,095 * \text{Puntuación del grupo de proliferación}$$

Donde:

La puntuación del grupo de Respuesta Estromal = $0,527 * \text{BGN} + 0,457 * \text{COL1A1} + 0,156 * \text{SFRP4}$

La puntuación del grupo de organización celular = 0,163 * FLNC + 0,504 * GSN + 0,421 * TPM2 + 0,394 * GSTM2

La puntuación del grupo de andrógenos = 0,634 * FAM13C + 1,079 * KLK2 + 0,642 * AZGP1 + 0,997*Umbral de SRD5A2

El puntaje del grupo de Proliferación = Umbral de TPX2

donde Umbral de SRD5A2 y Umbral de TPX2 se calculan a través de umbralización como sigue:

$$\text{Umbral de SRD5A2} = \begin{cases} 5,5 & \text{si SRD5A2} < 5,5 \\ \text{SRD5A2} & \text{lo contrario} \end{cases}$$

$$\text{Umbral de TPX2} = \begin{cases} 5,0 & \text{si TPX2} < 5,0 \\ \text{TPX2} & \text{lo contrario} \end{cases}$$

[00078] El GPSu se puede escalar para que esté entre 0 y 100 de la siguiente manera:

$$\text{[00079] GPS(escalado)} = \begin{cases} 0 & \text{si } 13,4 \times (\text{GPSu}+10,5) < 0 \\ 13,4 \times (\text{GPSu}+10,5) & \text{si } 0 \leq 13,4 \times (\text{GPSu}+10,5) \leq 100 \\ 100 & \text{si } 13,4 \times (\text{GPSu}+10,5) > 100 \end{cases}$$

[00080] El GPS(escalado) es el valor de GPS.

[00081] Una vez que se obtiene el valor o resultado de GPS para un paciente, la puntuación se puede clasificar en grupos de GPS particulares utilizando puntos de corte o umbrales previamente especificados, tales como puntos de corte en el rango de 18-22, como 18, 19 , 20, 21 o 22 y/o en el rango de 38 a 42, como 38, 39, 40, 41 o 42. Estos puntos de corte se pueden definir en función de los análisis estadísticos de los riesgos de RC, RBQ, Mets y MCP vs. el resultado de GPS, como se describe en los siguientes ejemplos.

[00082] En algunas modalidades, un paciente puede colocarse en dos grupos según un punto de corte en el rango de 18-22, como 18, 19, 20, 21 o 22, donde un grupo se considera debajo del punto de corte si el resultado de GPS es menor o, como alternativa, menor o igual que el punto de corte y el otro grupo se considera por encima del punto de corte si el

resultado de GPS es mayor o mayor que o igual que el punto de corte. Así, por ejemplo, un grupo de GPS bajo podría ser uno con un GPS <20 (o <18, <19, <21, <22, dependiendo de dónde se establece el punto de corte) y un grupo de GPS alto podría ser uno con a GPS ≥ 20 (o ≥ 18 , ≥ 19 , ≥ 21 , ≥ 22 , dependiendo de donde se establece el punto de corte). O, alternativamente, un grupo de GPS bajo podría ser uno con un GPS <20 y un grupo de GPS alto podría ser uno con un GPS > 20 (o ≤ 18 , ≤ 19 , ≤ 21 , ≤ 22 , and > 18 , > 19 , > 21 , > 22 , dependiendo de donde se establece el punto de corte). En algunas modalidades, un punto de corte de 20 define un grupo de GPS bajo y un grupo de GPS más alto, de modo que aquellos con resultado de GPS <20 caen en el grupo de GPS bajo y aquellos con resultado de GPS > 20 caen en el grupo de GPS más alto.

[00083] En algunas modalidades, un punto de corte en el rango de 38-42 se usa para indicar un GPS bajo y un grupo de GPS alto. Así, por ejemplo, un grupo de GPS bajo podría ser uno con un GPS <40 (o <38, <39, <41, <42, dependiendo de dónde se establece el punto de corte) y un grupo de GPS alto podría ser uno con un GPS ≥ 40 (≥ 41 , ≥ 42 , dependiendo de dónde se establece el punto de corte). O, alternativamente, un grupo de GPS bajo podría ser uno con un GPS ≤ 40 y un grupo de GPS alto podría ser uno con un GPS > 40 (o ≤ 41 , ≤ 42 , and > 38 , > 39 , > 41 , > 42 , dependiendo de donde se establece el punto de corte). En algunas modalidades, un punto de corte de 40 define un grupo de GPS bajo y un grupo de GPS más alto, de manera que aquellos con resultado de GPS ≤ 40 se clasifican en el grupo de GPS bajo y aquellos con resultado de GPS > 40 se clasifican en el grupo de GPS más alto.

APLICACIÓN DEL ALGORITMO DE GPS A GRUPOS PARTICULARES DE RIESGO DE CÁNCER DE PRÓSTATA

[00084] El tratamiento para los pacientes con cáncer de próstata puede, en algunos casos, basarse, al menos en parte, en si el paciente ha sido clasificado de acuerdo con uno o más de los estándares de la AUA, NCCN o CAPRA, como riesgo muy bajo, bajo, intermedio o alto para resultados clínicos negativos. Como se señaló anteriormente, estas clasificaciones tienen en cuenta múltiples factores, como el estadio o grado del tumor, los niveles de PSA y la puntuación de Gleason.

[00085] Por ejemplo, los tratamientos disponibles para los pacientes con cáncer de próstata incluyen la cirugía, como la prostatectomía radical (PR), la resección transuretral de la próstata (RTU), la escisión, la disección y la biopsia/extirpación del tumor. La disección de los ganglios linfáticos pélvicos (PLD) también se puede realizar en conjunción con la PR en algunos casos, como cuando existe preocupación con respecto a la prevención de metástasis futuras. En algunos casos, se puede realizar radioterapia (RT), como radioterapia de haz externo (EBRT), braquiterapia primaria u otros tipos de braquiterapia. En algunos casos, un paciente puede ser tratado con medicamentos, como los agentes de privación de andrógenos (terapia de privación de andrógenos o ADT), que generalmente comprenden antagonistas de LHRH. ADT se puede administrar en algunos casos antes, durante y/o después de la RT, por ejemplo. En pacientes de riesgo alto, por ejemplo, la ADT puede administrarse durante un período prolongado, como 1, 2, 3 o más años después de la RT. En algunos casos, también se pueden prescribir agentes de inmunoterapia y quimioterapia, como docetaxel, cabazitaxel o sipuleucel-T. Los pacientes de riesgo menor también pueden ser tratados únicamente mediante la vigilancia activa y pueden, por ejemplo, permanecer en vigilancia activa a menos que haya evidencia de un cambio en su estado tumoral. Los pacientes de edad avanzada o aquellos para quienes la esperanza de vida es corta también pueden tratarse simplemente con una espera vigilante con intervenciones paliativas cuando sea necesario.

[00086] Se pueden elegir diferentes opciones de tratamiento según el nivel de riesgo para el paciente y las recomendaciones asociadas, por ejemplo, mediante las guías de la AUA o NCCN. Por ejemplo, los pacientes de riesgo muy bajo pueden ser tratados mediante vigilancia activa o, si su esperanza de vida es corta, mediante una espera vigilante. Los pacientes de riesgo bajo pueden ser tratados, por ejemplo, mediante vigilancia activa, pero también mediante RP con PLND opcional, en particular si un tumor localizado puede eliminarse por completo, o por RT como EBRT o braquiterapia, o por alguna otra forma de tratamiento de "modalidad única" (es decir, una forma de tratamiento como la cirugía o la radiación en lugar de una combinación de los dos). Los pacientes de riesgo intermedio pueden tratarse, por ejemplo, con RP y PLND opcional, mediante RT con ADT opcional o mediante una combinación de cirugía, radioterapia y tratamiento farmacológico opcional.

Tales pacientes pueden ser tratados por terapia "multimodal" - es decir, combinaciones de diferentes formas de tratamiento como RT y ADT. Los pacientes de riesgo alto pueden ser tratados, por ejemplo, con terapia multimodal como EBRT y tratamiento ADT a largo plazo, como por 1, 2 o 3 años después de la RT, y algunas veces más con quimioterapia si el paciente está lo suficientemente en forma como para manejar el tratamiento. Los pacientes de riesgo alto también pueden ser tratados quirúrgicamente si las condiciones lo justifican.

[00087] Por lo tanto, en algunas modalidades de los presentes métodos, el paciente se ha colocado previamente en un grupo de riesgo muy bajo, bajo, intermedio o alto según los estándares AUA o NCCN o CAPRA. En algunas modalidades, la obtención de un resultado de GPS u otra puntuación cuantitativa a partir de un método descrito en el presente documento puede ser útil para determinar una estrategia de tratamiento apropiada para el paciente.

[00088] Por ejemplo, en algunas modalidades, se obtiene un resultado de GPS para un paciente de riesgo muy bajo o bajo y el método comprende determinar en qué grupo de resultados de GPS se encuentra el paciente, por ejemplo, un grupo bajo o alto que usa un punto de corte entre 18 y 22 o un punto de corte entre 38 y 42, o ambos de esos puntos de corte. En algunas modalidades, se obtiene un resultado de GPS para un paciente de riesgo alto y el método comprende determinar en qué grupo de resultados de GPS se encuentra el paciente, por ejemplo, un grupo bajo o alto que usa un punto de corte entre 18 y 22 o un punto de corte entre 38 y 42, o ambos de esos puntos de corte. En algunas modalidades, un resultado de GPS se obtiene para un paciente de riesgo intermedio y el método comprende determinar en qué grupo de resultados de GPS se encuentra el paciente, por ejemplo, un grupo bajo o alto que usa un punto de corte entre 18 y 22 o un punto de corte entre 38 y 42, o ambos de esos puntos de corte.

[00089] En algunas de las modalidades que involucran a un paciente de riesgo intermedio, la determinación de una puntuación cuantitativa basada en los métodos de este documento se puede usar para clasificar aún más el riesgo relativo del paciente de un resultado clínico negativo. Por ejemplo, en algunas modalidades, un paciente de riesgo intermedio con un resultado de GPS mayor que 38, 39, 40, 41 o 42 o mayor o igual que 38,

39, 40, 41 o 42 indica que el paciente tiene un riesgo relativamente alto de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP en comparación con los pacientes de riesgo intermedio en general. En algunas modalidades, un paciente de riesgo intermedio con un resultado de GPS mayor que 38, 39, 40, 41, o 42 o mayor que o igual a 38, 39, 40, 41 o 42 indica que el paciente tiene un riesgo de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP que es similar al de los pacientes de riesgo alto en general. Por ejemplo, un paciente de riesgo intermedio con un resultado de GPS mayor que 40 o mayor que o igual a 40 puede indicar que el paciente tiene un riesgo de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP que es similar al de pacientes de riesgo alto en su conjunto. En algunas modalidades, esta información puede afectar la forma en que se trata a ese paciente de riesgo intermedio. Por ejemplo, un paciente de este tipo puede ser tratado de acuerdo con las recomendaciones de tratamiento para pacientes de riesgo alto y, por ejemplo, puede recibir un tratamiento multimodal como RT combinado con ADT y opcionalmente quimioterapia o inmunoterapia. Por otro lado, para un paciente de riesgo intermedio, un resultado de GPS inferior a 38, 39, 40, 41 o 42 o menor o igual a 38, 39, 40, 41 o 42 puede indicar que el paciente tiene un riesgo relativo menor de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP en comparación con pacientes de riesgo intermedio en general. En algunas modalidades, para un paciente de riesgo intermedio, un resultado de GPS inferior a 40 o menor o igual a 40 puede indicar que el paciente tiene un riesgo relativo más bajo de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP en comparación con los intermedios pacientes de riesgo en su conjunto. En tales casos, el paciente puede ser tratado con vigilancia activa, al menos inicialmente, en lugar de con cirugía, o puede ser tratado con tratamiento de modalidad única, como cirugía o radiación sola. En algunas modalidades, por ejemplo, que involucran a un paciente de riesgo intermedio, un resultado de GPS inferior a 18, 19, 20, 21 o 22, o menor o igual a 18, 19, 20, 21 o 22 indica un riesgo relativamente bajo de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP. En algunas modalidades, por ejemplo, que involucran a un paciente de riesgo intermedio, un resultado de GPS inferior a 20 o menor o igual a 20 indica un riesgo relativamente bajo de desenlaces clínicos negativos como RC, RBQ, Mets y MCP. En tales casos, por ejemplo, el paciente puede ser tratado con vigilancia activa, al menos

inicialmente, en lugar de con cirugía o radiación. En algunas modalidades, un paciente de riesgo intermedio puede tener un resultado de GPS que se encuentre entre estos puntos de corte superior e inferior. En tales casos, el paciente puede ser tratado con vigilancia activa, al menos inicialmente, en lugar de con cirugía, o puede ser tratado con tratamiento de modalidad única, como cirugía o radiación sola. Por lo tanto, el GPS puede permitir la segregación de pacientes de riesgo intermedio en dos o tres subgrupos de riesgo mayor y menor de desenlaces clínicos negativos. Por consiguiente, en algunas modalidades, después de la determinación del resultado de GPS y del análisis de la agrupación del paciente, puede seguir un cambio de estrategia de tratamiento. En otras modalidades, una estrategia de tratamiento inicial puede basarse, al menos en parte, en una combinación de grupo de riesgo (por ejemplo, AUA, NCCN o CAPRA) y el resultado de GPS.

MÉTODOS DE EVALUAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE UN PRODUCTO GENÉTICO

[00090] En esta documento se exponen diversos enfoques tecnológicos para la determinación de los niveles de expresión de los genes descritos, que incluyen, sin limitación: RT-PCR, micromatrices, secuenciación de alto rendimiento, análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y Expresión Genética Digital (DGE), que se analizará en detalle a continuación. En aspectos particulares, el nivel de expresión de cada gen puede determinarse en relación con diversas características de los productos de expresión del gen, incluidos los exones, intrones, epítomos de proteínas y la actividad de proteínas.

[00091] El producto de expresión que se ensaya puede ser, por ejemplo, ARN o un polipéptido. El producto de expresión puede estar fragmentado. Por ejemplo, el ensayo puede usar cebadores que sean complementarios a las secuencias diana de un producto de expresión y, por lo tanto, podría medir los transcritos completos, así como los productos de expresión fragmentados que contienen la secuencia diana. Se proporciona información adicional en la Tabla A de la Publicación Internacional de Patente No. WO2013/116144.

[00092] El producto de expresión de ARN se puede analizar directamente o mediante la detección de un producto de ADNc resultante de un método de amplificación basado en

PCR, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR). (Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 7,587,279). El producto de expresión de polipéptidos puede ensayarse usando inmunohistoquímica (IHC) mediante técnicas de proteómica. Además, tanto el ARN como los productos de expresión de polipéptidos también pueden ensayarse utilizando micromatrices.

[00093] Los métodos de perfiles de expresión génica incluyen métodos basados en el análisis de hibridación de polinucleótidos, métodos basados en la secuenciación de polinucleótidos, y métodos basados en proteómica. Los métodos ejemplares conocidos en la técnica para la cuantificación de la expresión de ARN en una muestra incluyen transferencia Northern e hibridación in situ (Parker & Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106: 247-283 (1999)); Ensayos de protección de ARNasa (Hod, *Biotechniques* 13: 852-854 (1992)); y métodos basados en PCR, tales como PCR de transcripción inversa (RT-PCR) (Weis et al., *Trends in Genetics* 8: 263-264 (1992)). Se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos de secuencia, incluidos dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los métodos representativos para el análisis de la expresión génica basada en la secuenciación incluyen el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y el análisis de la expresión génica mediante la secuenciación masiva de firmas paralelas (MPSS). Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica.

PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

[00094] Típicamente, el ARNm se aísla de una muestra de prueba. El material de partida es típicamente ARN total aislado de un tumor humano, generalmente de un tumor primario. Opcionalmente, se pueden utilizar tejidos normales del mismo paciente como control interno. Dicho tejido normal puede ser un tejido normal que aparece histológicamente adyacente a un tumor. El ARNm puede extraerse de una muestra de tejido, por ejemplo, de una muestra que está fresca, congelada (por ejemplo, congelada en fresco), o preservada en parafina y fijada (por ejemplo, fijada con formalina).

[00095] Los métodos generales para la extracción de ARNm son conocidos en la técnica y se describen en libros de texto estándar de biología molecular, que incluyen Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1997). Los métodos para la extracción de ARN de tejidos incluidos en parafina se describen, por ejemplo, en Rupp and Locker, *Lab Invest.* 56:A67 (1987), y de Andres et al., *BioTechniques* 18: 42044 (1995). En particular, el aislamiento de ARN puede realizarse utilizando un kit de purificación, un conjunto de buffer y proteasa de fabricantes comerciales, como Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el ARN total de las células en cultivo se puede aislar usando mini-columnas Qiagen RNeasy®. Otros kits de aislamiento de ARN disponibles en el mercado incluyen el kit completo de purificación de ADN y ARN MasterPure™ (EPICENTRE®, Madison, WI) y el kit de aislamiento de ARN del bloque de parafina (Ambion, Inc.). El ARN total de las muestras de tejido se puede aislar utilizando el ARN Stat-60 (Tel-Test). El ARN preparado a partir del tumor se puede aislar, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio.

[00096] La muestra que contiene el ARN se somete luego a una transcripción inversa para producir ADNc a partir de la plantilla de ARN, seguida de una amplificación exponencial en una reacción de PCR. Las dos transcriptasas inversas más utilizadas son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV-RT). El paso de la transcripción inversa suele iniciarse utilizando cebadores específicos, hexámeros aleatorios o cebadores oligo-dT, según las circunstancias y el objetivo del perfil de expresión. Por ejemplo, el ARN extraído se puede transcribir de forma inversa utilizando un kit de PCR GeneAmp RNA (Perkin Elmer, CA, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc derivado puede ser usado como plantilla en la siguiente reacción de PCR.

[00097] Los métodos basados en PCR utilizan una ADN polimerasa termoestable dependiente del ADN, como una ADN polimerasa Taq. Por ejemplo, TaqMan® PCR utiliza típicamente la actividad 5' - nucleasa de la polimerasa Taq o Tth para hidrolizar una sonda de hibridación unida a su amplicón diana, pero se puede usar cualquier enzima con actividad 5' nucleasa equivalente. Se utilizan dos cebadores oligonucleotídicos para generar

un amplicón típico de un producto de reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, puede diseñarse para facilitar la detección de una secuencia de nucleótidos del amplicón ubicado entre los sitios de hibridación de los dos cebadores de PCR. La sonda puede estar marcada de forma detectable, por ejemplo, con un colorante indicador, y además puede proporcionarse con un colorante fluorescente y un colorante fluorescente de extinción, como en una configuración de sonda Taqman®. Cuando se usa una sonda Taqman®, durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa corta la sonda de una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en la solución, y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto de extinción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante informador para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no extinguido proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[00098] La TaqMan® RT-PCR puede realizarse utilizando equipos disponibles comercialmente, como, por ejemplo, plataformas de alto rendimiento, como el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7700 (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), o LightCycler® (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania). En una realización preferida, el procedimiento se ejecuta en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler® 480 (Roche Diagnostics), que es una plataforma de ciclador basada en placa de micropocillos.

[00099] Los datos del ensayo de nucleasa 5' generalmente se expresan inicialmente como un ciclo umbral ("Ct"). Los valores de fluorescencia se registran durante cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado hasta ese punto en la reacción de amplificación. El ciclo de umbral (Q) se describe generalmente como el punto en el que la señal fluorescente se registra por primera vez como estadísticamente significativa. Alternativamente, los datos pueden expresarse como un punto de cruce ("Cp"). El valor de Cp se calcula determinando las segundas derivadas de todas las curvas de amplificación de qPCR y su valor máximo. El valor de Cp representa el ciclo en el que el aumento de la fluorescencia es mayor y donde comienza la fase logarítmica de una PCR.

[000100] Para minimizar los errores y el efecto de la variación de una muestra a otra, la RT-PCR generalmente se realiza utilizando un estándar interno. El gen estándar interno ideal (también conocido como gen de referencia) se expresa a un nivel bastante constante entre los tejidos cancerosos y no cancerosos del mismo origen (es decir, un nivel que no es significativamente diferente entre los tejidos normales y cancerosos), y no se ve afectado significativamente por el tratamiento experimental (es decir, no muestra una diferencia significativa en el nivel de expresión en el tejido relevante como resultado de la exposición a la quimioterapia) y se expresa a un nivel bastante constante entre el mismo tejido tomado de diferentes pacientes. Por ejemplo, los genes de referencia útiles en los métodos descritos en el presente documento no deben mostrar niveles de expresión significativamente diferentes en la próstata cancerosa en comparación con el tejido prostático normal. Los genes de referencia ejemplares utilizados para la normalización comprenden uno o más de los siguientes genes: GUS, AAMP, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1. Las mediciones de la expresión génica pueden normalizarse en relación con la media de uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) genes de referencia. Las mediciones de expresión de referencia normalizadas pueden variar de 2 a 15, donde un aumento de una unidad generalmente refleja un aumento de 2 veces en la cantidad de ARN.

[000101] La PCR en tiempo real es compatible tanto con la PCR competitiva cuantitativa, donde se usa un competidor interno para cada secuencia diana para la normalización, como con la PCR comparativa cuantitativa que utiliza un gen de normalización contenido dentro de la muestra, o un gen de mantenimiento para la RT-PCR. Para más detalles ver, por ejemplo, Held et al., Genome Research 6: 986-994 (1996).

[000102] Los pasos de un protocolo representativo para uso en los métodos de la presente divulgación utilizan tejidos fijados, y preservados en parafina, como fuente de ARN. Por ejemplo, el aislamiento, la purificación, la extensión del cebador y la amplificación del ARNm pueden realizarse de acuerdo con los métodos disponibles en la técnica. (ver, por ejemplo, Godfrey et al. J. Molec. Diagnóstico 2: 84-91 (2000); Specht et al., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). En resumen, un proceso representativo comienza con el corte de aproximadamente 10 µg de secciones gruesas de muestras de tejido tumoral

preservados en parafina. Luego, se extrae el ARN y se agotan las proteínas y el ADN de la muestra que contiene ARN. Después del análisis de la concentración de ARN, el ARN se transcribe a la inversa utilizando cebadores específicos de gen seguidos de RT-PCR para proporcionar productos de amplificación de ADNc.

Diseño de cebadores y sondas de PCR basados en intrones

[000103] Los cebadores y sondas de PCR pueden diseñarse en función de las secuencias de exones o intrones presentes en los transcritos del ARNm del gen de interés. El diseño del cebador/sonda se puede realizar utilizando un software disponible públicamente, como el software DNA BLAT desarrollado por Kent, W.J., Genome Res. 12 (4):656-64 (2002), o por el software BLAST, incluidas sus variaciones.

[000104] Cuando sea necesario o deseado, las secuencias repetitivas de la secuencia objetivo se pueden enmascarar para mitigar señales no específicas. Las herramientas ejemplares para lograr esto incluyen el programa Repeat Masker disponible en línea a través de Baylor College of Medicine, que analiza las secuencias de ADN contra una biblioteca de elementos repetitivos y devuelve una secuencia de consulta en la que los elementos repetitivos están enmascarados. Las secuencias de intrones enmascarados se pueden usar para diseñar secuencias de cebadores y sondas utilizando cualquier paquete de diseño de cebadores/sondas disponibles comercialmente o de otro modo, como Primer Express (Applied Biosystems); Ensayo por diseño de MGB (Applied Biosystems); Primer3 (Steve Rozen y Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 en la WWW para usuarios generales y para programadores biólogos. Ver S. Rrawetz, S. Misener, Métodos y Protocolos de Bioinformática: Métodos en Biología Molecular, pp. 365-386 (Humana Press).

[000105] Otros factores que pueden influir en el diseño del cebador de PCR incluyen la longitud del cebador, la temperatura de fusión (T_m) y el contenido de G/C, la especificidad, las secuencias del cebador complementarias y la secuencia del extremo 3'. En general, los cebadores de PCR óptimos generalmente tienen una longitud de 17-30 bases, y contienen aproximadamente 20-80%, como, por ejemplo, aproximadamente 50-60% de bases G + C, y exhiben T_m entre 50 y 80 °C, por ejemplo alrededor de 50 a 70 °C.

[000106] Para más pautas para el diseño de cebadores y sondas de PCR, consulte, p. ej. Dieffenbach, CW. et al, "Conceptos generales para el diseño de cebadores de PCR" en: PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995, pp. 133-155; Innis y Gelfand, "Optimización de PCRs" en: Protocolos de PCR, Una guía de métodos y aplicaciones, CRC Press, Londres, 1994, páginas 5-11; y yesero, T.N. Primerselect: diseño de imprimación y sonda. Métodos Mol. Biol. 70: 520-527 (1997), cuyas descripciones completas se incorporan aquí expresamente como referencia.

[000107] La Tabla A de la Publicación de Patente Internacional N° WO2013/116144 proporciona información adicional con respecto a las secuencias de cebadores, sondas y amplicones que pueden usarse con los genes descritos en el presente documento.

Sistema MassARRAY®

[000108] En los métodos basados en MassARRAY, como el método ejemplar desarrollado por Sequenom, Inc. (San Diego, CA) luego del aislamiento del ARN y la transcripción inversa, el ADNc obtenido se enriquece con una molécula de ADN sintético (competidor), que coincide con la región de ADNc objetivo en todas las posiciones, excepto una base única, y sirve como un estándar interno. La mezcla de ADNc/competidor se amplifica por PCR y se somete a un tratamiento enzimático de fosfatasa alcalina (SAP) de camarón post-PCR, que resulta en la desfosforilación de los nucleótidos restantes. Después de la inactivación de la fosfatasa alcalina, los productos de PCR del competidor y el ADNc se someten a una extensión del cebador, que genera señales de masa distintas para los productos de la PCR derivados del competidor y del ADNc. Después de la purificación, estos productos se dispensan en una matriz de chips, que se carga previamente con los componentes necesarios para el análisis con análisis de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por desorción asistida por matriz (MALDI-TOF MS). El ADNc presente en la reacción se cuantifica luego analizando las relaciones de las áreas de los picos en el espectro de masas generado. Para más detalles ver, por ejemplo, Ding y Cantor, Proc. Natl Acad Sci. USA 100: 3059-3064 (2003).

Otros métodos basados en PCR

[000109] Otras técnicas basadas en PCR que pueden encontrar uso en los métodos descritos aquí incluyen, por ejemplo, la tecnología BeadArray® (Illumina, San Diego, CA; Oliphant et al., Descubrimiento de marcadores para enfermedades (Suplemento a las biotecnologías), junio de 2002; Ferguson et al. Analytical Chemistry 72: 5618 (2000)); BeadsArray para la detección de “Gene Expression®” (BADGE), utilizando el sistema LuminexIOO LabMAP® disponible comercialmente y múltiples microesferas codificadas por color (Luminex Corp., Austin, TX) en un ensayo rápido para la expresión génica (Yang et al., Genome Res. 11: 1888-1898 (2001)); y perfiles de expresión de alta cobertura (HOLA CEP) análisis (Fukumura et al., Nucl. Acids Res. 31 (16) e94 (2003).

Microarreglos

[000110] Los niveles de expresión de un gen o microarreglos de interés también se pueden evaluar utilizando la técnica de microarreglos. En este método, las secuencias de polinucleótidos de interés (incluidos los ADNc y los oligonucleótidos) están dispuestas en un sustrato. Las secuencias agrupadas se ponen en contacto en condiciones adecuadas para la hibridación específica con ADNc marcado de forma detectable generado a partir del ARN de una muestra de prueba. Al igual que en el método de RT-PCR, la fuente de ARN típicamente es el ARN total aislado de una muestra tumoral y, opcionalmente, del tejido normal del mismo paciente como un control interno o líneas celulares. El ARN puede extraerse, por ejemplo, de muestras de tejido congeladas o archivadas, preservadas en parafina y fijadas (por ejemplo, fijadas con formalina).

[000111] Por ejemplo, las inserciones amplificadas por PCR de clones de ADNc de un gen a ensayar se aplican a un sustrato en una matriz densa. Normalmente, se aplican al sustrato al menos 10.000 secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, los genes de micromatrices, inmovilizados en el microchip a 10.000 elementos cada uno, son adecuados para la hibridación en condiciones rigurosas. Las sondas de ADNc marcadas por fluorescencia pueden generarse a través de la incorporación de nucleótidos fluorescentes por transcripción inversa de ARN extraído de tejidos de interés. Las sondas de ADNc

etiquetadas aplicadas al chip se hibridan con especificidad a cada punto de ADN en la matriz. Después de lavarse bajo condiciones rigurosas para eliminar las sondas no específicamente unidas, el chip se escanea mediante microscopía láser confocal o mediante otro método de detección, como una cámara CCD. La cuantificación de la hibridación de cada elemento agrupado permite la evaluación de la abundancia de ARN correspondiente.

[000112] Con fluorescencia de doble color, las sondas de ADNc marcadas por separado generadas a partir de dos fuentes de ARN se hibridan por pares a la matriz. La abundancia relativa de las transcripciones de las dos fuentes correspondientes a cada gen especificado se determina así simultáneamente. La escala miniaturizada de la hibridación permite una evaluación conveniente y rápida del patrón de expresión para un gran número de genes. Se ha demostrado que tales métodos tienen la sensibilidad requerida para detectar transcritos raros, que se expresan en unas pocas copias por célula, y para detectar de manera reproducible al menos aproximadamente el doble de diferencias en los niveles de expresión (Schena et al, Proc. Natl Acad Sci. USA 93 (2):106-149 (1996)). El análisis de microarreglos se puede realizar con el equipo disponible comercialmente, siguiendo los protocolos del fabricante, como el uso de la tecnología Affymetrix GenChip® o la tecnología de microarreglos de Incyte.

Análisis Serial de Expresión Génica (SAGE)

[000113] El análisis en serie de la expresión génica (SAGE) es un método que permite el análisis simultáneo y cuantitativo de un gran número de transcripciones de genes, sin la necesidad de proporcionar una sonda de hibridación individual para cada transcripción. Primero, se genera un fragmento de secuencia corta (aproximadamente 10-14 pb) que contiene información suficiente para identificar de manera única una transcripción, siempre que la secuencia se obtenga de una posición única dentro de cada transcripción. Luego, muchas transcripciones se unen para formar moléculas seriales largas, que pueden secuenciarse, revelando la identidad de las múltiples secuencias simultáneamente. El patrón de expresión de cualquier población de transcripciones puede evaluarse cuantitativamente determinando la abundancia de secuencias individuales e identificando

el gen correspondiente a cada secuencia. Para más detalles, ver, por ejemplo, Velculescu et al., Science 270: 484-487 (1995); y Velculescu et al., Cell 88: 243-51 (1997).

Análisis de expresión génica por secuenciación de ácidos nucleicos

[000114] Las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos son métodos adecuados para el análisis de la expresión génica. El principio que subyace a estos métodos es que el número de veces que se detecta una secuencia de ADNc en una muestra está directamente relacionado con la expresión relativa del ARN correspondiente a esa secuencia. En ocasiones, el término Expresión Genética Digital (DGE) hace referencia a estos métodos para reflejar la propiedad numérica discreta de los datos resultantes. Los primeros métodos que aplicaron este principio fueron el análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y la secuenciación masiva de firmas paralelas (MPSS). Véase, por ejemplo, S. Brenner, et al., Nature Biotechnology 18 (6):630-634 (2000). Recientemente, la llegada de las tecnologías de secuenciación de "nueva generación" ha hecho que el DGE sea más simple, un rendimiento más alto y más asequible. Como resultado, más laboratorios pueden utilizar DGE para detectar la expresión de más genes en muestras de pacientes más individuales de lo que antes era posible. Véase, por ejemplo, J. Marioni, Genome Research 18 (9):1509-1517 (2008); R. Morin, Genome Research 18 (4):610-621 (2008); A. Mortazavi, Nature Methods 5 (7):621-628 (2008); N. Cloonan, Nature Methods 5 (7):613-619 (2008).

Aislando el ARN de los fluidos corporales

[000115] Métodos para aislar ARN para análisis de expresión de sangre, plasma y suero (ver, por ejemplo, K. Enders, et al., Clin Chem 48, 1647-53 (2002) (y las referencias aquí citadas en el mismo) y de la orina (ver, por ejemplo, R. Boom, et al., J. Clin Microbiol. 28, 495-503 (1990) y las referencias allí citadas) han sido descritos.

Inmunohistoquímica

[000116] Los métodos de inmunohistoquímica también son adecuados para detectar los niveles de expresión de los genes y se aplican al método aquí descrito. En tales métodos pueden usarse anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) que se unen

específicamente a un producto génico de un gen de interés. Los anticuerpos pueden detectarse mediante el marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de hapteno como biotina o una enzima como la peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Alternativamente, el anticuerpo primario no marcado se puede usar junto con un anticuerpo secundario marcado específico para el anticuerpo primario. Los protocolos y kits de inmunohistoquímica son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Proteómica

[000117] El término "proteoma" se define como la totalidad de las proteínas presentes en una muestra (por ejemplo, tejido, organismo o cultivo celular) en un determinado momento. La proteómica incluye, entre otras cosas, el estudio de los cambios globales de la expresión de proteínas en una muestra (también conocida como "expresión proteómica"). La proteómica generalmente incluye los siguientes pasos: (1) separación de proteínas individuales en una muestra por electroforesis en gel 2-D (2-D PAGE); (2) identificación de las proteínas individuales recuperadas del gel, p. ej. espectrometría de masas o secuenciación N-terminal, y (3) análisis de los datos mediante bioinformática.

Descripción general del aislamiento, purificación y amplificación del ARNm

[000118] Los pasos de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica utilizando tejidos fijados, y preservados en parafina como fuente de ARN, incluido el aislamiento, purificación, extensión del cebador y amplificación del ARNm se proporcionan en varios artículos publicados en revistas. (Véase, por ejemplo, T.E. Godfrey, et al., J. Molec. Diagnóstico 2: 84-91 (2000); K. Specht et al., Enm. J. Pathol. 158: 419-29 (2001), M. Cronin, et al., Am J Pathol 164: 35-42 (2004)). En resumen, un proceso representativo comienza con el corte de una sección de muestra de tejido (por ejemplo, aproximadamente 10 µm de secciones gruesas de una muestra de tejido tumoral preservado en parafina). Luego se extrae el ARN y se eliminan las proteínas y el ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, la reparación del ARN se realiza si se desea. La muestra puede

luego someterse a análisis, por ejemplo, mediante transcripción inversa utilizando promotores específicos de genes seguidos de RT-PCR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

[000119] Un experto en la materia reconocerá que hay muchos métodos estadísticos que pueden usarse para determinar si existe una relación significativa entre un resultado clínico de interés (por ejemplo, recidiva) y GPS u otra puntuación de prueba diagnóstica.

[000120] Por ejemplo, las pruebas de hipótesis pueden informarse utilizando valores p de dos caras. Para investigar si existe una relación significativa de resultados (ej. RC, RBQ, Mets, MCP) con entidades particulares medidas o calculadas, se pueden usar modelos de Riesgos Proporcionales (PH) de Cox que utilizan estimadores de probabilidad pseudo parcial de máxima ponderación y valores p de las pruebas de Wald de la hipótesis nula de que la relación de riesgo (HR) es uno puede ser reportado.

NORMALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN.

[000121] Los datos de expresión utilizados en los métodos descritos en el presente documento pueden normalizarse. La normalización se refiere a un proceso para corregir (es decir, normalizarse), por ejemplo, las diferencias en la cantidad de ARN y la variabilidad en la calidad del ARN obtenido de una muestra, para eliminar las fuentes no deseadas de variación sistemática en las mediciones de Ct o Cp y similares. Con respecto a los experimentos de RT-PCR que involucran muestras de tejido fijadas en parafina, por ejemplo, las fuentes de variación sistemática pueden incluir el grado de degradación del ARN en relación con la edad de la muestra del paciente y el tipo de fijador utilizado para almacenar la muestra. Otras fuentes de variación sistemática son atribuibles a las condiciones de procesamiento del laboratorio.

[000122] Los ensayos pueden proporcionar normalización al incorporar la expresión de ciertos genes de referencia, que no difieren significativamente en los niveles de expresión en las condiciones relevantes. Los genes constitutivos ejemplares descritos en el presente documento incluyen genes de mantenimiento. (Ver, por ejemplo, E. Eisenberg, et al., Trends

in Genetics 19 (7):362365 (2003).) En general, los genes de referencia son, típicamente, genes que se sabe que no exhiben una expresión significativamente diferente en el cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático no canceroso, y que se rastrean con diversas condiciones de la muestra y el proceso, por lo tanto, proporcionan la normalización de efectos extraños. En modalidades ejemplares, uno o más de los siguientes genes se utilizan como genes de referencia por los cuales se normalizan los datos de expresión de ARNm: GUS, AAMP, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1. Las mediciones de C_T o C_p promedio ponderadas calibradas para cada uno de los genes de prueba, como BGN, COL1A1, SFRP4, TPX2, AZGP1, FAM13C, KLK2, SRD5A2, FLNC, GSN, GSTM2 y TPM2, pueden normalizarse con relación a la media de cinco o más genes de referencia. La normalización puede, en otras modalidades, basarse alternativamente en la señal media o mediana (C_t o C_p) de todos los genes analizados o en un gran subconjunto de estos (enfoque de normalización global).

[000123] Los expertos en la materia reconocerán que la normalización puede lograrse de numerosas maneras, y las técnicas descritas anteriormente pretenden ser solo ejemplares, no exhaustivas.

NORMALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN

[000124] Los datos de expresión utilizados en los métodos descritos en este documento pueden estandarizarse. La estandarización se refiere a un proceso para poner efectivamente todos los genes en una escala comparable. Esto se realiza porque algunos genes exhibirán más variación (un rango de expresión más amplio) que otros. La estandarización se realiza dividiendo el valor de cada expresión por su desviación estándar en todas las muestras para ese gen. Las relaciones de riesgo se interpretan como el cambio proporcional en el riesgo para el desenlace clínico (recidiva clínica, recidiva biológica, muerte por cáncer de próstata o muerte por cualquier causa) por 1 desviación estándar de aumento en la expresión.

KITS DE LA INVENCION

[000125] Los materiales para uso en los métodos de la presente invención son adecuados para la preparación de kits producidos de acuerdo con procedimientos bien conocidos. La presente descripción proporciona así, kits que comprenden agentes, que pueden incluir sondas y/o cebadores específicos de genes o selectivos de genes, para cuantificar la expresión de los genes descritos para predecir el resultado pronóstico o la respuesta al tratamiento. Dichos kits pueden contener, opcionalmente, reactivos para la extracción de ARN de muestras tumorales, en particular muestras de tejido fijadas en parafina y/o reactivos para la amplificación de ARN. Además, los kits pueden comprender opcionalmente el (los) reactivo (s) con una descripción o etiqueta de identificación o instrucciones relacionadas con su uso en los métodos de la presente invención. Los kits pueden comprender recipientes (incluidas placas de microlitro adecuadas para su uso en una implementación automatizada), cada uno con uno o más de los diversos materiales o reactivos (típicamente en forma concentrada) utilizados en los métodos, que incluyen, por ejemplo, columnas cromatográficas, microarreglos prefabricados, buffer, los trifosfatos de nucleótido apropiados (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP; o rATP, rCTP, rGTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN polimerasa, ARN polimerasa y una o más sondas y cebadores de la presente invención (p. ej., poli (T) de longitud apropiada o cebadores aleatorios unidos a un promotor reactivo con la ARN polimerasa). Los algoritmos matemáticos utilizados para estimar o cuantificar información pronóstica o predictiva también son componentes potenciales de los kits.

[000126] En algunas modalidades, un kit puede comprender los reactivos necesarios para determinar los niveles de transcritos de ARN particulares en una muestra de paciente mediante RT-PCR. Por ejemplo, en algunas modalidades, un kit puede comprender un cartucho u otra estructura física similar que comprende al menos un pozo (que puede constituir un canal, cámara, área o superficie) que comprende uno o más cebadores para determinar los niveles de transcritos de ARN de uno o más de los genes BGN, COL1A1, SFRP4, TPX2, AZGP1, FAM13C, KLK2, SRD5A2, FLNC, GSN, GSTM2, y TPM2. En algunas modalidades, los cebadores están unidos a uno o más pozos en el cartucho. En

algunas modalidades, cada pocillo puede comprender cebadores para dos, tres, cuatro, cinco o seis genes diferentes, por ejemplo, utilizando cebadores marcados con diferentes etiquetas de color. En algunas modalidades, al menos un pocillo comprende al menos un cebador para determinar los niveles de transcritos de ARN de uno o más genes de referencia. En algunas modalidades, el gen de referencia comprende el gen GUS. En otras modalidades, el gen de referencia comprende uno o más de GUS, AAMP, ARF1, ATP5E, CLTC, GPS1 y PGK1. En algunas modalidades, los cebadores contenidos en el cartucho comprenden cebadores para determinar los niveles de transcritos de ARN de un conjunto de genes que consiste en BGN, COL1A1, SFRP4, TPX2, AZGP1, FAM13C, KLK2, SRD5A2, FLNC, GSN, GSTM2 y TPM2 y de uno o más genes de referencia. En algunas modalidades, el cartucho comprende además reactivos de amplificación tales como buffer, trifosfatos de nucleótido (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP y dTTP; o rATP, rCTP, rGTP y UTP), transcriptasa inversa, ADN polimerasa y/o ARN polimerasa. En algunas modalidades, el cartucho es parte de un sistema que comprende uno o más componentes que introducen estos reactivos en los pocillos del cartucho. En algunas modalidades, el ARN se extrae de la muestra y el ARN extraído se aplica al cartucho. En otras modalidades, no se necesita un paso de extracción y la muestra se aplica directamente al cartucho. Los cartuchos de muestra y los sistemas asociados que pueden utilizarse para determinar los niveles de transcritos de ARN en este documento se describen en la Publicación Internacional No. WO2006/136990 y su patente de los Estados Unidos asociada, No. 9,568,424.

[000127] En algunas modalidades, el cartucho comprende al menos un pocillo que comprende cebadores donde tiene lugar el termociclado, así como uno o más pocillos para introducir, lisar y/o lavar la muestra. En algunas modalidades, la estructura general del cartucho también comprende bombas, válvulas, pozos de proceso y depósitos de fluidos y desechos, lo que permite llevar a cabo el tratamiento de muestras y las reacciones de RT-PCR y la detección asociada de los niveles de transcritos de ARN de genes particulares en el cartucho.

[000128] En algunas modalidades que utilizan un sistema de cartucho, el sistema es capaz de determinar los niveles de transcritos de ARN utilizando el ARN de la muestra y los cebadores y reactivos comprendidos en el cartucho, y el sistema también incluye un software capaz de determinar los niveles de transcritos de ARN normalizados asociados y calcular cualquier puntaje cuantitativo asociado, como un puntaje de GPS. En algunas modalidades, el sistema puede además determinar si el paciente tiene un riesgo clínico bajo, intermedio o alto, como el riesgo de recidiva clínica (RC), recidiva bioquímica (RBQ), metástasis distantes (Mets), y muerte por cáncer de próstata (MCP), al colocar la puntuación cuantitativa del paciente (por ejemplo, el puntaje de GPS) en el rango apropiado de riesgo bajo, intermedio o alto como se describe en el presente documento. En algunas modalidades, el sistema también es capaz de crear un informe que proporciona la puntuación cuantitativa de un paciente.

INFORMES

[000129] Los métodos de esta invención, cuando se practican con fines de diagnóstico comercial, generalmente producen un informe o resumen de la información obtenida de los métodos descritos aquí. Por ejemplo, un informe puede incluir información sobre los niveles de expresión de uno o más genes, el resultado de GPS, la comparación del resultado de GPS con los umbrales o puntos de corte específicos y/o la puntuación media para los pacientes con próstata, así como otra información sobre el paciente como el grupo de riesgo reconocido según AUA o NCCN u otro, y la información utilizada para ubicar al paciente en un grupo de riesgo como el nivel de PSA, la puntuación de Gleason, etc. Los métodos e informes de esta invención pueden incluir además almacenar el informe en una base de datos. El método puede crear un registro en una base de datos para el sujeto y rellenar el registro con datos. El informe puede ser un informe en papel, un informe auditivo o un registro electrónico. El informe puede mostrarse y/o almacenarse en un dispositivo informático (por ejemplo, dispositivo de mano, computadora de escritorio, dispositivo inteligente, sitio web, etc.). Se contempla que el informe se proporcione a un médico y/o al paciente. La recepción del informe puede incluir además el establecimiento de una conexión

de red a una computadora servidor que incluya los datos y el informe, y solicitar los datos e informes a la computadora servidor.

PROGRAMA DE COMPUTADORA

[000130] Los valores de los ensayos descritos anteriormente, como los datos de expresión, se pueden calcular y almacenar manualmente. Alternativamente, los pasos descritos anteriormente pueden ser realizados total o parcialmente por un programa informático. La presente invención proporciona así un producto de programa informático que incluye un medio de almacenamiento legible por ordenador que tiene un programa informático almacenado en él. Cuando se lee con una computadora, el programa puede ejecutar cálculos relevantes basados en los valores obtenidos del análisis de una o más muestras biológicas de un individuo (por ejemplo, niveles de expresión de genes, normalización, estandarización, umbral y conversión de valores de análisis a una puntuación). y/o texto o representación gráfica del estadio del tumor e información relacionada). El producto del programa informático ha almacenado en él un programa informático para realizar el cálculo.

[000131] La presente divulgación proporciona sistemas para ejecutar el programa descrito anteriormente, cuyo sistema generalmente incluye: a) un entorno de computación central; b) un dispositivo de entrada, conectado operativamente al entorno informático, para recibir datos del paciente, en el que los datos del paciente pueden incluir, por ejemplo, el nivel de expresión u otro valor obtenido de un ensayo utilizando una muestra biológica del paciente, o datos de micromatrices, como descrito en detalle arriba; c) un dispositivo de salida, conectado al entorno informático, para proporcionar información a un usuario (por ejemplo, personal médico); y d) un algoritmo ejecutado por el entorno de computación central (por ejemplo, un procesador), donde el algoritmo se ejecuta basándose en los datos recibidos por el dispositivo de entrada, y en el que el algoritmo calcula una puntuación de expresión, un umbral u otras funciones descritas en este documento. Los métodos proporcionados por la presente invención también pueden automatizarse total o parcialmente.

[000132] Habiendo descrito la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Riesgo de recidiva clínica (RC) y muerte por cáncer de próstata (MCP) asociado a un resultado de GPS <20

[000133] Se analizaron dos cohortes de cáncer de próstata longitudinal grandes para estimar el riesgo de RC y MCP para GPS < o > 20 unidades en una escala de 0 a 100. Se analizaron los datos de pacientes de E. Klein y otros, Eur Urol 66: 550-560 (2014) y J. Cullen, y otros, Urol 68: 123-131 (2015) para establecer el riesgo de RC asociado a MCP con un punto de corte de GPS preestablecido de 20. Ver E. Klein et al., Eur Urol 66: 550-560 (2014), Tabla 1, y J. Cullen, et al., Eur Urol 68: 123-131 (2015), Tabla 1, para obtener más detalles sobre características de base de los pacientes en este estudio.

[000134] Los pacientes se dividieron según el valor de GPS (ya sea bien ≤ 20 o > 20). Los análisis de regresión de Cox explicaron las ponderaciones muestrales de la cohorte. Dado que el GPS se desarrolló utilizando los cocientes de riesgo estandarizados de Klein (std HR, HR para 1 desviación estándar (SD), cambio en la covariable) para GPS y RC y las curvas de supervivencia de MCP para los 2 grupos se estimaron corrigiendo la regresión a la media (RM).

[000135] De los 402 pacientes en Cullen (mediana de seguimiento de 5,2 años), solo 5 pacientes desarrollaron metástasis y los 5 tenían GPS > 20. De los 426 pacientes en Klein con una mediana de seguimiento de 6,6 años, hubo 109 RC (incluidas metástasis a distancia y recidivas locales) y 39 MCP, pero solo uno de ellos tenía un GPS <20. Comparativamente, el 28% de los pacientes de Klein tenían GPS <20. El GPS fue un predictor significativo tanto para la RC (HR estándar 2.50 (IC del 95% 1,99, 3,15, p <0,001, la HR estándar corregida en RM 2,16, FDR <0,1%) y MCP (HR estándar 2,90 (IC del 95% 2,06, 4,06, p <0,001, HR corregido por RM 1,96, FDR <0,1%) después del ajuste para el grupo de riesgo según AUA. Como se muestra en la tabla a continuación, los hombres con

cáncer de próstata de riesgo intermedio (AUA) y un resultado de GPS de ≤ 20 tienen un riesgo de 2,6% y un 0,7% a 10 años de RC y MCP corregido respectivamente. Los hombres con un cáncer de próstata de riesgo intermedio (AUA) y un resultado de GPS de > 20 tienen mayores riesgos de RC y MCP estimados en 10 años. Estos resultados sugieren que los hombres en los grupos de riesgo muy bajo, bajo o intermedio según la NCCN y un resultado de GPS ≤ 20 pueden ser candidatos adecuados para la vigilancia activa en lugar del tratamiento definitivo inmediato.

Tabla 1

Riesgos de RC y MCP estimados en 10 años			
Grupo de riesgo según AUA	Grupo GPS	Riesgo RC	Riesgo MCP
Bajo	≤ 20	1,8%	0,5%
	> 20	4,3%	1,0%
Intermedio	≤ 20	2,6%	0,7%
	> 20	10,9%	3,1%
Alto	≤ 20	6,0%	2,1%
	> 20	21,2%	7,8%

Ejemplo 2: Resultados de GPS de ≤ 40 y > 40 y riesgo de metástasis a distancia y muerte por cáncer de próstata en pacientes con cáncer de próstata

[000136] Se seleccionó una población inicial de 259 pacientes de un sistema de atención de la salud integrado en los EE. UU de 6184 pacientes con cáncer de próstata con riesgos según NCCN de muy bajo a alto comprendida entre 1995-2010. Específicamente, entre 6,184 pacientes elegibles, 404 fueron seleccionados en base a un esquema de muestreo de cohorte preespecificado, de los cuales 334 pacientes tenían tejidos de biopsia disponibles. Hubo 14 (4%) excluidos debido a la inelegibilidad clínica, 41 (12%) debido a un tumor insuficiente o tipo de tumor incorrecto. De los 279 restantes, se obtuvieron resultados de GPS válidos para 259 (93%) pacientes, que representan la población evaluable final.

Los 259 pacientes incluyeron 5 en el grupo de riesgo muy bajo, 35 en el grupo de riesgo bajo, 160 en el grupo de riesgo intermedio y 57 en el grupo de riesgo alto. La siguiente tabla proporciona características de los 259 pacientes evaluables.

Tabla 2

Características	Valares	N (Ponderado %)
Raza/Etnia	Blanco-no hispánico	201 (79,0)
	Afroamericanos	26 (11,0)
	Otros	32 (10,0)
PSA ng/mL	0-4	24 (9,5)
	4,1-10	159 (70,1)
	10,1 y superior	75 (20,4)
Estadio T clínico	T1	67 (24,9)
	T2	189 (74,6)
	T3	2 (0,4)
Puntuación de la biopsia Gleason (central)	3+3	69 (37,6)
	3+4	113 (45,5)
	4+3	42 (11,4)
	4+4	12 (2,7)
	Cualquier patrón 5	23 (2,8)
Grupo de riesgo según la NCCN	Muy bajo	5 (3,0)
	Bajo	35 (20,6)
	Intermedio	160 (67,1)
	Alto	57 (9,3)

[000137] Los 259 pacientes evaluables incluyeron 79 metástasis a distancia (proporción ponderada = 8,8%) y 180 no metástasis. Los 259 pacientes evaluables incluyeron 64 MCP (proporción ponderada = 1,8%) y 195 no MCP.

[000138] Se determinaron estimaciones a diez años de metástasis distantes (Mets) y muerte por cáncer de próstata (MCP) para cada uno de los grupos de riesgo del paciente y se obtuvieron resultados de GPS. (Ver Figs. 1 A-1B y 2A-2B para más detalles). El GPS promedio para los 259 pacientes fue de 31 y el puntaje promedio fue de 28, como se muestra en la tabla a continuación.

Tabla 3

	GPS
Media	31,3
SD	14,1
Min	0
Q1	21,3
Mediana	28,4
Q3	38,8
Max	100

[000139] Para el grupo de riesgo muy bajo y bajo de 40 pacientes, la puntuación media fue de 22, para el grupo intermedio de 160 pacientes, la mediana fue de 29, y para el grupo de riesgo alto de 57 pacientes, la mediana fue de 43.

[000140] En un análisis multivariado (MVA) que considera el GPS frente a la puntuación de Gleason, el grupo de riesgo según NCCN, el grupo de riesgo según AUA o la puntuación de Capra, se encontró que el GPS estaba significativamente asociado con el riesgo a 10 años de Mets y MCP con valores de p desde <0,001 a 0,007. Vea las tablas a continuación para más detalles. Véase también la Fig. 3.

Tabla 4: Asociación de factores clínicos GPS + con los Mets, el GPS es significativo en todos los MVA

Modelo	Variable	N	HR	IC 95%	Valor p
1	GPS	259	2,01	(1,21-3,33)	0,007
	Bx Gleason Total				0,004
	Bx puntuación de Gleason 7 vs <=6		7,26	(1,60-33,03)	0,010
	Bx puntuación de Gleason >=8 vs <=6		19.29	(3,36-110,64)	<,001
2	GPS	257	2,34	(1,42-3,86)	<u><,001</u>
	Grupo de riesgo según NCCN				0,064
	NCCN alto vs Muy Bajo y Bajo		11,02	(1,44-84,29)	0,021
	NCCN Int. vs Muy Bajo y Bajo		5,70	(0,83-39,05)	0,076
3	GPS	257	2,51	(1,49-4,23)	<u><,001</u>
	Grupo de riesgo de la AUA				0,109

Modelo	Variable	N	HR	IC 95%	Valor p
	AUA Intermedio vs Bajo		5,53	(0,75-40,73)	0,093
	AUA Alto vs Bajo		7,83	(1,14-53,65)	0,036
4	GPS	257	2,63	(1,58-4.36)	<,001
	Puntuación de Capra		1,23	(1,00-1.52)	0,050

Tabla 5: Asociación de GPS con MCP en modelo multivariable, el GPS es significativo además de los nomogramas clínicos

Modelo	Variable	N	HR	IC 95%	Valor p
1	GPS	257	2,69	(1,50-4,82)	<,001
	Grupo de riesgo de la NCCN				0,017
	NCCN Alto vs muy bajo y bajo		22,54	(2,38-213,07)	0,007
	NCCN Int. vs muy bajo y bajo		8,59	(1,06-69,56)	0,044
2	GPS	257	3,04	(1,79-5,18)	<,001
	Grupo de riesgo de la AUA				0,013
	AUA Int. vs bajo		7,12	(0,83-61,40)	0,074
	AUA alto vs bajo		16,79	(1,99-141,78)	0,010
3	GPS	257	3,40	(2,04-5,64)	<,001
	Puntuación Capra		1,76	(1,37-2,26)	<,001

[000141] El resultado de GPS también se asoció significativamente con la MCP (valor de p = 0,004) en un modelo multivariado que se ajusta a factores clínicos como la edad al momento del diagnóstico, la puntuación de Gleason, el nivel de PSA en el momento del diagnóstico y el porcentaje de núcleos de biopsia positivos. Mira la tabla de abajo para más detalles.

Tabla 6: Asociación de GPS con MCP en modelo multivariable

Variable	N	HR	HR 95% IC	Valor P de Wald
GPS por 20 Unidades	242	2,52	(1,34, 4,76)	0,004
Edad al diagnostico	242	1,07	(0,99, 1,16)	0,069
Puntuación de Gleason 7 vs <=6	242	3,02	(0,74, 12.29)	0,122
8+ vs <=6	242	7,89	(1,35, 46,24)	0,022
Porcentaje de Núcleos de Biopsia Positivo	242	11,47	(1,89, 69,48)	0,008
PSA al momento del diagnóstico	242	1,01	(1,004, 1,02)	0,003

[000142] Además, el análisis de los datos de los 160 pacientes con riesgo intermedio según NCCN mostró que los pacientes con un resultado de GPS de > 40 (24%) tenían un

riesgo de metástasis a 5 años similar al de los pacientes de riesgo alto. Específicamente, el 84% de estos pacientes estaban libres de metástasis a los 5 años, mientras que el 85% de los pacientes de riesgo alto, independientemente del resultado de GPS, estaban libres de metástasis a los 5 años, y el 97% de los pacientes de riesgo intermedio con un resultado de GPS de ≤ 40 Libre de metástasis a los 5 años. Además, los pacientes con riesgo alto según NCCN con un GPS ≤ 40 (el 41% del grupo de riesgo alto estudiado) tenían un riesgo a 5 años de metástasis a distancia similar al de los pacientes con riesgo clínico intermedio. Específicamente, se estimó que esos pacientes estaban libres de metástasis en un 96% a los 5 años, mientras que todos los pacientes intermedios estaban libres de metástasis en un 94% a los 5 años. En contraste, los pacientes de riesgo alto con GPS > 40 no tenían metástasis en un 59% a los 5 años.

[000143] Las puntuaciones de los grupos de genes individuales (respuesta estromal, organización celular, señalización de andrógenos y proliferación) también se determinaron y analizaron contra la aparición de Mets y MCP. Ver la Fig. 5 de las puntuaciones del grupo de genes en donde los Mets y MCP se mantienen según lo esperado en función de las asociaciones de las puntuaciones del grupo de genes con otras variables, como la RC.

[000144] En general, los resultados demuestran que el GPS es un predictor significativo del riesgo de metástasis y MCP después de la prostatectomía radical para pacientes con riesgo de cáncer de próstata clínicamente bajo, intermedio y alto, la asociación entre el GPS y el tiempo hasta la metástasis y la MCP sigue siendo significativa después de realizar ajustes clínicos y covariables patológicas, incluidos los grupos de riesgo clínico según NCCN, AUA y CAPRA, y que el GPS agrega información pronóstica más allá de los factores pronósticos clínico-patológicos convencionales y mejora la estratificación del riesgo en el momento del diagnóstico. Además, dentro del grupo de riesgo intermedio según la NCCN, el GPS fue un predictor significativo de los resultados. En particular, aquellos con un resultado de GPS superior a 40 tenían un riesgo de metástasis a distancia durante 5 años similar al de los pacientes con riesgo clínico alto. Como resultado, estos pacientes de grupos de riesgo intermedio con GPS >40 pueden ser candidatos adecuados para un tratamiento más intensivo, como el tratamiento multimodalidad.

[000145] La correlación entre el GPS y la recidiva bioquímica (RBQ) también se estudió en este grupo de pacientes. Para los fines del estudio, un evento de RBQ después de la cirugía se definió según la guía AUA de 2007 como (1) un nivel de PSA postoperatorio de > 0,2 ng/mL con un nivel de PSA confirmatorio sucesivo de > 0,2 ng/mL, donde la fecha de RBQ es la primera fecha de PSA; o (2) el inicio de la radioterapia de rescate o la terapia hormonal después de un aumento del nivel de PSA > 0,1 ng/mL, donde la fecha de RBQ es la fecha de la terapia de rescate. El estudio encontró una asociación significativa entre el valor de GPS por 20 unidades y la RBQ (HR 2,50; HR 95% IC 1,62, 3,85, Wald Chisq 17,00; valor p de Wald <0,0001) en los 259 pacientes estudiados en un modelo univariado.

Tabla 7: Asociación de Factores Clínicos con RBQ

Modelo	Variable	N	HR	95% IC	Valor p
1	Edad al diagnostico	259	1,00	(0,95-1,05)	0,949
2	Raza	259			0,617
	Negro vs. Blanco		1,56	(0,64-3,83)	0,330
	Otro vs. blanco		1,13	(0,44-2,90)	0,794
3	Estadio T clínico	258			<,001
	estadio cT 2 vs 1		0,88	(0,45-1,71)	0,700
	estadio cT 3 vs 1		17,45	(8,34-36,52)	<,001
4	Bx Gleason Total	259			<,001
	Bx Puntuación de Gleason 7 vs <-6		3,79	(1,58-9,09)	0,003
	Bx Puntuación de Gleason >=8 vs <=6		12,66	(4,85-33,03)	<,001
5	% Núcleo Positivo Bx	243	2,68	(0,73-9,79)	0,137
6	Categoría BX PSA	258			0,014
	PSA <4 vs 4 a <10		1,80	(0,67-4,82)	0,242
	PSA >=10 vs 4 a <10		2,56	(1,35-4,85)	0,004
7	Densidad de PSA en 0,1 unidades	243	1,16	(1,05-1,28)	0,003
8	Grupo de Riesgo de la NCCN	257			<,001
	NCCN Intermedio vs VL & Bajo		2,13	(0,79-5,77)	0,137
	NCCN Alto vs VL & Bajo		9,91	(3,60-27,32)	<,001
9	Grupo de Riesgo de la AUA	257			0,025
	AUA Intermedio vs Bajo		2,19	(0,78-6,11)	0,135
	AUA Alto vs Bajo		3,72	(1,35-10,23)	0,011
10	Puntuación Capra	257	1,69	(1,42-2,01)	<,001

Tabla 8: La asociación de GPS con RBQ en el modelo multivariable GPS es significativa además de los nomogramas clínicos

Modelo	Variable	N	HR	95% IC	Valor p
1	GPS	257	2,11	(1,41-3,14)	<u><,001</u>
	Grupo de Riesgo de la NCCN				0,001
	NCCN High vs Muy Bajo y Bajo		5,21	(1,84-14,79)	<u>0,002</u>
	NCCN Int. vs Muy Bajo & Bajo		1,68	(0,61-4,65)	0,318
2	GPS	257	2,41	(1,64-3,54)	<u><,001</u>
	Grupo de Riesgo de la AUA				0,061
	AUA Int. vs Bajo		1,53	(0,52-4,45)	0,439
	AUA Alto vs Bajo		2,74	(0,97-7,75)	0,058
3	GPS	257	2,30	(1,58-3,36)	<u><,001</u>
	Puntuación Capra		1,56	(1,31-1,85)	<,001

Tabla 9: Asociación de GPS con RBQ en modelo multivariable

Variable	N	HR	HR 95% IC	Valor P de Wald
<u>GPS por 20 unidades</u>	<u>258</u>	<u>2,07</u>	<u>(1,32, 3,25)</u>	<u>0,002</u>
estadio cT T2 vs T1	258	0,79	(0,40, 1,56)	0,499
T3 vs T1		9,08	(4,03, 20,45)	<,0001
Puntuación central de Gleason 7 vs <=6	258	2,67	(1,12, 6,37)	0,027
8+ vs <=6		5,32	(1,94, 14,56)	0,001
PSA en el diagnóstico	258	1,02	(1,01, 1,02)	<,0001

[000146] La asociación siguió siendo significativa (p <0,001) en un modelo multivariado teniendo en cuenta las puntuaciones según NCCN, AUA y Capra, así como el resultado de GPS. Vea la Tabla 4 para más detalles. La asociación también se mantuvo significativa después de ajustar factores como estadio cT, la puntuación de Gleason y el PSA en el momento del diagnóstico. Vea la Tabla 5 para más detalles.

Ejemplo 3: Resultados de GPS de ≤ 40 y > 40 y riesgo de recidiva clínica (RC) y recidiva bioquímica (RBQ) en pacientes con cáncer de próstata

[000147] En dos estudios adicionales, se analizaron los datos de los pacientes de E. Klein y otros, Eur Urol 66: 550-560 (2014) y J. Cullen, y otros, Eur. Urol 68: 123-131 (2015) para considerar cómo el resultado de GPS por encima o por debajo de 40 se correlaciona con RBQ y RC en pacientes de riesgo intermedio. Consulte también E. Klein et al., Eur Urol 66: 550-560 (2014), Tabla 1, y J. Cullen, et al., Eur Urol 68: 123-131 (2015), Tabla 1, para obtener más detalles sobre las características basales de los pacientes en estos estudios.

[000148] Un estudio de pacientes con cáncer de próstata en una base de datos de la Clínica Cleveland (CC) descrita en E. Klein et al., Eur Urol 66: 550-560 (2014) mostró que los pacientes del grupo de riesgo intermedio según AUA con GPS ≤ 40 tenían un riesgo estimado de recidiva clínica (RC) corregido por RM a los 10 años del 4,7%, mientras que los pacientes con riesgo intermedio según AUA con GPS > 40 tenían un riesgo estimado de RC corregido por RM a 10 años del 16,9%. Los pacientes en el grupo de riesgo alto según AUA tenían un riesgo estimado de RC corregido por RM a 10 años del 18,2%, independientemente del resultado de GPS. Por lo tanto, los grupos de riesgo intermedio y alto según GPS tenían riesgos similares de RC a los 10 años.

[000149] También se encontró que los pacientes en el grupo de riesgo intermedio según AUA con GPS ≤ 40 tienen un riesgo estimado de recidiva bioquímica (RBQ) corregido por RM (umbral de PSA de 0,2) a los 3 años del 15,7% y a los 5 años del 23,6%, mientras que se encontró que los pacientes de riesgo intermedio según AUA con GPS > 40 tenían un riesgo estimado de RBQ corregido por RM a 3 años del 33,5% y a 5 años del 47,1%. Los pacientes en el grupo de riesgo alto según AUA tenían un riesgo estimado de RBQ corregido por RM a 3 años del 32,9% y a 5 años del 45,4%, independientemente del resultado de GPS. Nuevamente, los grupos de riesgo intermedio y alto según GPS tenían riesgos similares de RBQ a los 3 y 5 años.

[000150] En un análisis similar de pacientes de un estudio de la base de datos del Centro de Investigación de Enfermedades de la Próstata (CPDR) descrito en J. Cullen, et al., Eur

Urol 68: 123-131 (2015), se evaluó un grupo de 139 pacientes con riesgo intermedio según NCCN para considerar el resultado de GPS frente al riesgo de RBQ a 3 años o 5 años. Los pacientes de riesgo intermedio con un GPS de ≤ 40 (61% de los pacientes) tenían un riesgo de RBQ (umbral de PSA de 0,2) a 3 años de 8,0% y un riesgo de RBQ a 5 años de 16,1%. En contraste, aquellos con un GPS > 40 tenían un riesgo de RBQ a 3 años de 27,4% y un riesgo de RBQ a 5 años de 36,0%). Estos resultados son similares a los de los pacientes en el estudio CC/Klein.