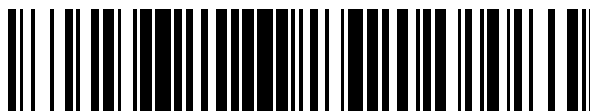


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 062**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04713289 .9**

96 Fecha de presentación: **20.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1597393**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Métodos para determinar un régimen quimioterapéutico basado en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa**

30 Prioridad:  
**27.02.2003 US 373752**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.03.2012**

73 Titular/es:  
**RESPONSE GENETICS, INC.  
1640 MARENGO STREET, 6TH FLOOR  
LOS ANGELES, CA 90033, US**

72 Inventor/es:  
**DANENBERG, Kathleen, D.**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

**ES 2 377 062 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar un régimen quimioterapéutico basado en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa.

5

**Antecedentes de la invención**

La timidilato sintasa (TS) cataliza la metilación reductora de 2'-desoxiuridilato 5,10-metilentetrahidrofolato para formar 2'-timidilato y dihidrofolato. Esto es una etapa esencial en la biosíntesis de ADN. Puesto que TS es la única fuente *de novo* de la base timidina, y su reacción es una de las etapas limitantes de la velocidad en la síntesis de ADN, la inhibición de TS ha sido un enfoque beneficioso en la quimioterapia contra el cáncer (Danenbergh, P.V., Biochim. Biophys. Acta, 473: 73-92, 1977). TS es la enzima diana para 5-fluorouracilo (5-FU), que durante casi 50 años ha sido uno de los fármacos de soporte para el tratamiento de muchos cánceres. 5-FU ejerce su efecto citotóxico a través de la inhibición de TS formando un complejo ternario estable entre 5,10-metilentetrahidrofolato, TS y 5-fluoro-2'-desoxiuridilato, el metabolito activo de 5-FU. Desde la aparición de 5-FU, se han desarrollado otras terapias a base de fluoropirimidinas tales como FUdR, UFT, S-1 y capecitabina, así como inhibidores de TS a base de folato, tales como ratitrexed, pemetrexed y nolatrexed. Los estudios *in vitro* han demostrado que las células se hacen resistentes a inhibidores de TS aumentando la expresión de TS y elevando los niveles intracelulares de TS (Wang, W., et al., Cancer Res., 61: 5505-5510, 2001), conduciendo a la suposición de que la cantidad de TS en tumores puede ser un predictor de la respuesta de la terapia dirigida por TS. De hecho, estudios recientes han demostrado que la expresión de TS varía considerablemente entre tumores, y que la sensibilidad de diversos tumores a quimioterapia a base de 5-FU está correlacionada con el nivel intratumoral de TS (Huang, C.L., et al., Int. J. Oncol., 17: 47-54, 2000; Nishimura, R., et al., Anticancer Res., 19: 5621-5626, 1999; Salonga, D., et al., Clin. Cancer Res., 6: 1322-1327, 2000; Shirota, Y., et al., J. Clin. Oncol., 19: 4298-4304, 2001; Yeh, K.H., et al., Cancer, 82: 1626-1631, 1998). Además, también se ha demostrado que los niveles elevados de TS en tumores están asociados con un peor pronóstico (Kralovanszky, J., et al., Oncology, 62: 1671-1674, 2002; Nakagawa, T., et al., Lung Cancer, 35: 165-170, 2002).

El mecanismo mediante el cual está regulada *in vivo* la expresión de TS no se ha definido aún claramente. Sin embargo, se ha sugerido que los polimorfismos que aparecen en el promotor de TS pueden constituir un factor regulador. Se sabe que el gen de TS tiene una única secuencia repetida en tándem de 28 pares de bases en la región no traducida de 5' (5'-UTR), y es polimórfica en los números de esta repetición (Horie, N., et al., Cell Struct. Funct., 20:191-197, 1995). La mayoría de los individuos tienen un genotipo de repetición en tándem doble (2R/2R), repetición triple (3R/3R) o un genotipo heterocigoto (2R/3R), aunque en unos pocos casos se encuentran repeticiones de mayor orden (Marsh, S., et al., Genomics, 58: 310-312, 1999). El polimorfismo de la región potenciadora de TS (TSER) es un determinante parcial de la expresión de la proteína de TS en cánceres gastrointestinales humanos (Kawakami, K., et al., Anticancer Res., 19: 3249-3252, 1999), referencia la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

El tejido de cáncer con genotipo 3R/3R ha mostrado una expresión de proteína de TS significativamente mayor que aquella con el genotipo 2R/3R, que se ha confirmado con experimentos *in vitro* (Kawakami, K., et al., Clin. Cancer Res., 7: 4096-4101, 2001), referencia la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Esta asociación entre el genotipo de TS y la expresión de TS, junto con el papel de la expresión de TS en una quimioterapia a base de 5-FU, sugiere que el genotipo de TS con respecto al número de repeticiones en tándem puede ser al menos un predictor parcial para la quimioterapia a base de 5-FU. De hecho, varios estudios clínicos correlativos recientes han obtenido pruebas preliminares de que el genotipo de TS de esta TSER está asociado con la respuesta y supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal tratados con terapias a base de 5-FU (Iacopetta, B., et al., Br. J. Cancer, 85: 827-830, 2001; Marsh, S., et al., Int. J. Oncol., 19: 383-386, 2001; Pullarkat, S. et al., Pharmacogenomics J., 1, 65-70, 2001; Villafranca, E., et al., J. Clin. Oncol., 19: 1779-1786, 2001).

La presencia de números variables de una secuencia de repetición en tándem de 28 pares de bases en la TSER ha atraído recientemente un considerable interés debido a que ésta es la única lesión genómica, aparte de la mutación p53, que puede predecir en cierto grado el resultado clínico de pacientes tratados con terapia a base de 5-FU. Todos los estudios hechos hasta la fecha están de acuerdo en que la posesión del genotipo 2R/2R se ha asociado consistentemente con un beneficio clínico mayor que el genotipo 3R/3R en pacientes tratados con 5-FU (Iacopetta, B., et al., Br. J. Cancer, 85: 827-830, 2001; Pullarkat, S. T. et al., Pharmacogenomics J., 1, 65-70, 2001; Villafranca, E., et al., J. Clin. Oncol., 19: 1779-1786, 2001; Etienne MC, et al., J. Clin. Oncol. 20:2832-43, 2002). El descubrimiento de polimorfismos de TS que pueden ser determinantes de la respuesta tumoral fue de considerable interés debido a la posibilidad de que se pudiera hacer la predicción de la respuesta tumoral mediante análisis de tejido normal fácilmente disponible (por ejemplo, células de sangre periférica). Esta expectativa se basa en la suposición de que el genoma en el tejido normal sería idéntico a aquel en tejido canceroso. Sin embargo, pruebas recientemente obtenidas demuestran que esta suposición no siempre es verdad en el caso del genotipo de TS. Se ha observado una incidencia elevada de LOH en el locus de TS en tejidos cancerosos, que conduce a la modificación del genotipo de TS en el tumor cuando es heterocigoto en el tejido normal (Kawakami K, et al., Jpn J Cancer Res. 93: 1221-1128, 2002; Zinzindohoue F, et al., J. Clin. Oncol. 19:3442, 2001). Esto es, la aparición de LOH en individuos que tienen un genotipo heterocigoto 2R/3R en su tejido normal daría lugar a un tumor con un

65

genotipo de TSER 2R/perdida o el 3R/perdida. De este modo, es posible que pacientes que son heterocigotos y que tienen LOH en el locus de TS en su tejido tumoral puedan experimentar resultados considerablemente diferentes de la quimioterapia, dependiendo de qué alelo se suprimió durante el suceso de LOH.

- 5 Basilion et al, *Molecular Pharmacology*, vol. 56, no.2, 1999, p. 359-369 describen el exterminio selectivo de células cancerosas basándose en LOH que se produce durante la oncogénesis.

De este modo, todavía existe la necesidad de un método para predecir una respuesta a diversos regímenes quimioterapéuticos antes del tratamiento. Una predicción exacta permitiría a un médico determinar si continuar con un régimen quimioterapéutico deseado o intentar un régimen quimioterapéutico alternativo. Puesto que los efectos secundarios adversos son predominantes con la mayoría de los regímenes quimioterapéuticos, es deseable ser capaz de predecir la respuesta tumoral al agente quimioterapéutico para eliminar cualquier tratamiento innecesario o sin éxito. Además, si un médico es capaz de predecir la respuesta a un tratamiento, no se perderá tiempo en aquellos tratamientos que probablemente fracasarán, y en su lugar permitirá al médico centrarse en tratamientos más prometedores. Un método para predecir una respuesta al tratamiento proporciona a un médico las directrices a la hora de elegir la terapia, en lugar de un enfoque simple de ensayo y error.

### Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere a un método para predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico basándose en la pérdida de heterocigosidad en el locus del timidilato sintasa en tejido canceroso. Este método comprende determinar el genotipo de tejido normal para timidilato sintasa de un paciente; determinar el genotipo del tejido tumoral para timidilato sintasa de dicho paciente; comparar el genotipo de tejido normal con el genotipo de tejido tumoral; determinar si se ha producido una pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en el tejido tumoral basándose en la comparación de los genotipos; y predecir una respuesta al régimen quimioterapéutico basándose en la pérdida de heterocigosidad en la muestra tumoral.

La presente invención también contempla utilizar el genotipo del tejido normal para ayudar a predecir la respuesta del paciente (como en la respuesta de toxicidad farmacéutica) al régimen quimioterapéutico.

30 Para ayudar a predecir las respuestas, la presente invención contempla recopilar datos del paciente, tales como una base de datos, que hace referencia a datos del paciente tales como, pero sin limitarse a, genotipos tanto de tejido normal como de tejido canceroso, el cáncer que se esté tratando, el régimen quimioterapéutico administrado, la respuesta del paciente, es decir, la reducción del tamaño tumoral, si la hay, crecimiento tumoral, incremento en la metástasis, supervivencia del paciente, dosis quimioterapéutica, datos de toxicidad, duración de vida del paciente, etc. La base de datos ayudará a predecir la respuesta de un paciente, permitiendo comparar los factores del paciente con pacientes previos que tienen factores similares (tales como genotipo de tejido normal y de tejido canceroso, regímenes quimioterapéuticos, y resultado del tratamiento).

40 Tanto para predecir una respuesta como para crear la base de datos, se puede usar tejido reciente o conservado, para determinar el genotipo tisular.

### Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1A muestra la estructura de la región flanqueante de 5' de TS con una secuencia de 3 repeticiones. La región producida se indica mediante la barra negra. La barra blanca con flechas en ella indica la TSER. Las flechas representan secuencias repetidas en tándem y una secuencia inversa complementaria. Los números indican la posición nucleotídica cuando el primer nucleótido del codón de iniciación se define como +1. Los cebadores de PCR se diseñan para flanquear la región de las repeticiones en tándem, de manera que la presencia de tres repeticiones dará un producto de PCR más largo que una TSER de dos repeticiones.

50 La Figura 1B muestra ejemplos del análisis de genotipo de TS en ADN emparejado normal (N) y tumoral (T) de pacientes con cáncer colorrectal. Las bandas superior e inferior representan productos de PCR de la amplificación del segmento de TSER que contiene 3R y 2R, respectivamente. Los números se refieren a diferentes casos de pacientes. Cada paciente tiene un genotipo 2R/3R heterocigoto en tejido normal, como se indica por la presencia de ambas bandas. Caso 1: LOH da lugar a un tumor con un genotipo 3R/perdida. Caso 2: no se produce LOH. Caso 3: LOH da lugar a un tumor con un genotipo perdida/2R.

60 La Figura 2 representa las gráficas de supervivencia (Kaplan-Meier) que indican la probabilidad de supervivencia para pacientes con cada uno de los diversos genotipos de TSER de tumor posibles, separadamente.

La Figura 3 representa gráficas de supervivencia (Kaplan-Meier) que indican la probabilidad de supervivencia para pacientes agrupados según el genotipo 2R solamente (2R/perdida + 2R/3R), genotipo 3R solamente (3R/3R + 3R/perdida) y heterocigoto (2R/3R).

65

La Figura 4 muestra las secuencias de los cebadores de amplificación y sondas para la cuantificación de ARNm de TS (Tabla 1).

5 La Figura 5 es una tabla (Tabla 2) que muestra los genotipos de TS en tejido normal de un estudio de pacientes con CRC.

La Figura 6 es una tabla (Tabla 3) que muestra la frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH) en tejido tumoral en un estudio de pacientes con CRC.

10 La Figura 7 es una tabla (Tabla 4) que muestra las asociaciones entre variables clinicopatológicas y el genotipo de TS modulado por LOH.

La Figura 8 es una tabla (Tabla 5) que muestra el resultado clínico de pacientes, segregados por genotipo de TS.

15 La Figura 9 es una tabla (Tabla 6) que muestra la expresión de TS, segregada por genotipo de TS.

### Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona un método para predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico basándose en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en tejido canceroso. El gen de TS se ha localizado en la región telomérica del brazo corto del cromosoma 18, en la banda cromosómica 18p11.32 (Hori, T., et al., Human Genetics, 85(6):576-80, 1990), una región del genoma que se sabe que sufre supresiones en un porcentaje elevado de cánceres colorrectales (Vogelstein B., et al., Science, 244:207-211, 1989). Una de las dianas principales de estos sucesos de supresión puede ser el gen supresor de tumores bien conocido DCC (suprimido en 25 cáncer colorrectal) (Klingelhutz AJ, et al., Oncogene 10: 1581-1586, 1995). Debido a su proximidad al gen o genes diana de supresiones del cromosoma 18, el gen de TS puede estar contenido en algunos casos en el segmento de ADN suprimido. De hecho, se confirmó en un estudio anterior que la pérdida de heterocigosidad (LOH) se produjo frecuentemente en el locus de TS en ADN de tumor cuando los análisis del genotipo de TS de individuos 2R/3R mediante electroforesis en gel mostró una relación diferente entre 2R y las bandas de 3R en muestras de tejido 30 tumoral y en tejidos normales (es decir, un desequilibrio alélico) (Kawakami K, et al., Jpn J Cancer Res., 93: 1221-1228, 2002), que surge del hecho de que, con LOH, un genotipo heterocigoto 2R/3R se convertiría en un genotipo 2R/perdida o 3R/perdida. En este estudio previo (*id.*) (que se incorpora aquí en su totalidad como referencia), la frecuencia observada de LOH fue 62% (31 de 50) entre pacientes heterocigotos para el promotor de TS, que es casi idéntica a la dada a conocer por Zinzindohoue et al. (19/30; 63%) en su grupo de pacientes con cáncer colorrectal (CRC) (Zinzindohoue F, et al., J. Clin. Oncol., 19:3442, 2001). La frecuencia de LOH observada en el conjunto de 35 pacientes del presente estudio fue incluso mayor (77%), que se puede adscribir al uso de microdissección por captura con láser (LCM) de todas las muestras para aislar las áreas de células tumorales tan libres como fuese posible de cualquier tejido estrómic. Con esta técnica para purificar tejido tumoral, es posible observar de forma bastante inconfundiblemente, como se demuestra en la Fig. 2, la pérdida de uno o del otro alelo de TS, y de este modo 40 mostrar definitivamente la presencia o ausencia de un suceso de LOH en el locus de TS.

La presente invención se basa en parte en la observación de que el locus de TS tiene una pérdida relativamente frecuente de heterocigosidad LOH en tejido canceroso, que conduce a la modificación del genotipo de TS en el tumor cuando es heterocigoto en tejido normal. Esto es, la LOH en individuos que tienen un genotipo heterocigoto 45 2R/3R en su tejido normal daría lugar a un tumor con un genotipo 2R/perdida o el genotipo 3R/perdida, dependiendo de qué alelo se suprimió durante el suceso de LOH. De este modo, si se pierde el alelo de 3R, el tumor tiene un genotipo 2R/perdida. Si se pierde el alelo de 2R, el tumor tiene un genotipo 3R/perdida.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los tumores adquieren las quimiosensibilidades respectivas características de tumores 2R/2R y 3R/3R cuando se produce una LOH en el locus de TS en tumores de 50 2R/3R heterocigoto y da como resultado un genotipo 2R/perdida o un genotipo 3R/perdida. El hallazgo prominente de este estudio es que el genotipo tumoral determina el resultado de la terapia: los pacientes 2R/3R con un genotipo 2R/perdida en el tumor tuvieron la misma supervivencia que la de los pacientes con sólo genotipos 2R, mientras que el genotipo 2R/perdida tuvo resultados sorprendentemente mejores a partir del tratamiento que los pacientes con el 55 genotipo 3R/perdida, ambos en términos de tasa de respuesta (80% frente a 14%) y supervivencia (333 días frente a 203 días). Estos resultados sugieren una relación directa entre el estado del polimorfismo de TSER en el tejido tumoral y la respuesta a una terapia a base de inhibidores de TS (tales como, pero sin limitarse a, 5-FU, FUdR, UFT, S-1 y capecitabina). Los datos ilustran además que la triple repetición de TSER (3R) tiene un efecto negativo directo sobre la respuesta tumoral, en oposición a 2R, que tiene un efecto positivo. Como se muestra en la Fig. 2, los 60 tiempos de supervivencia de pacientes que tienen el genotipo tumoral 2R/3R son cortos, similar a aquellos de los pacientes 3R solamente, mientras que si se pierde el alelo 3R durante LOH, el tumor 2R/perdida resultante tiene una tasa de respuesta elevada y una supervivencia prolongada.

Los mecanismos mediante los cuales las repeticiones polimórficas de TSER afectan a la respuesta tumoral todavía 65 no están claros. La observación de Horie et al. (Cell Struct. Funct., 20:191-197, 1995) de que la actividad de la expresión de un gen informador ligado al gen de TS con la repetición doble fue menor que aquella del gen con la

repetición triple sugirió la posibilidad de que los polimorfismos de T<sub>SER</sub> afectan a la sensibilidad tumoral a 5-FU regulando la expresión del gen de TS. Esta hipótesis parece que se confirmó con los resultados de Pullarkat *et al.* (Pullarkat, S. T., et al., *Pharmacogenomics J.*, 1, 65-70, 2001), quienes dieron a conocer una diferencia significativa dependiente de T<sub>SER</sub> (aprox. 3,6 veces) en expresiones del gen de TS en pacientes con cáncer colorrectal, y sugirieron que esta diferencia da cuenta de las menores tasas de respuesta de pacientes con cáncer 3R/3R en comparación con los genotipos 2R/2R. Sin embargo, cuando se consideran otros datos, la asociación entre el número de polimorfismos de T<sub>SER</sub> y la expresión del gen de TS no parece obvia. Por ejemplo, se analizaron 130 muestras de cáncer colorrectal, y no se encontró ninguna diferencia significativa en la expresión del gen de TS entre los genotipos 2R/2R y 3R/3R. En su lugar, los tumores 3R/3R tuvieron un nivel de proteína de TS significativamente mayor (Pullarkat, S. T., et al., *Pharmacogenomics J.*, 1, 65-70, 2001), lo que también justificaría las menores tasas de respuesta entre pacientes 3R/3R. Este hallazgo sugirió que la actividad traduccional que produce proteína de TS a partir de ARNm se efectúa por el polimorfismo de T<sub>SER</sub>, como de hecho se vio apoyado por experimentos *in vitro*, que muestran que el promotor de 3R provocó un incremento en la actividad traduccional (*id.*). Etienne et al. analizaron 103 tumores de CRC tratados con 5-FU/ácido folínico, y encontraron, de forma interesante, que los tumores 2R/3R tuvieron una actividad enzimática de TS mayor que los tumores 2R/2R o 3R/3R, así como la supervivencia más corta de los pacientes.

En el estudio que condujo a la presente invención, los tumores con sólo los genotipos 3R (3R/3R + 3R/perdida) mostraron una expresión media del gen de TS mayor que aquella con genotipos solo 2R (~1,5 veces). El hallazgo de que los genotipos 3R/perdida tuvieron una mayor expresión que los genotipos 2R/perdida (Tabla 6) en una cantidad similar sugiere que el 3R ejerce un aumento directo, aunque modesto, de la expresión del gen de TS. Sin embargo, la pequeña diferencia en la expresión media del gen de TS entre tumores que poseen sólo genotipos 2R o 3R parece insuficiente para justificar la diferencia más bien sorprendente en respuesta al tratamiento con S-1, sugiriendo que pueden estar implicados otros mecanismos distintos de (o además de) la regulación de TS.

Por ejemplo, varios estudios recientes sugieren que las repeticiones de T<sub>SER</sub> tienen un papel a la hora de regular los niveles de metabolitos de folato, lo que podría afectar a la toxicidad farmacéutica a pacientes y a la actividad antitumoral de fármacos que interaccionan con enzimas que utilizan folato. Se encontraron niveles significativamente menores de folatos y homocisteína en plasma en individuos con genotipo 3R/3R (Trinh, B.N., et al., *Hum. Genet.*, 111:299-302, 2002). Esta observación puede justificar la menor toxicidad al tratamiento con 5-FU experimentado por pacientes 3R/3R (Pullarkat, S. T., et al., *Pharmacogenomics J.*, 1, 65-70, 2001), debido a que se ha encontrado que niveles elevados de homocisteína plasmática están asociados con un mayor riesgo de toxicidad farmacéutica (Niyikiza, C., et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 1:545-52, 2002). El estado de la repetición de T<sub>SER</sub> se ha relacionado con la respuesta de leucemia linfoblástica aguda (ALL) de adultos a metotrexato, un inhibidor de dihidrofolato reductasa, que también puede estar influida por los niveles de folato (Krajinovic, M., et al., *Lancet*, 359:1033-1034, 2002). Se han señalado asociaciones entre polimorfismos de T<sub>SER</sub>, la ingesta de folato y el riesgo de cáncer colorrectal (Ulrich, C.M., et al., *Cancer Res.*, 62:3361-3364, 2002), así como con riesgo general de desarrollar riesgo de ALL de adulto (Skibola, C.F., et al., *Blood*, 99:3786-91, 2002).

De este modo, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un porcentaje elevado de pacientes con cáncer sufren LOH en el locus de TS en el tumor, y aquellos que tienen un genotipo de tejido normal 2R/3R se separan en dos grupos con diferentes genotipos de TS tumorales, uno de los cuales (el paciente 2R/perdida) puede anticipar el resultado clínico de forma considerablemente mejor a partir del tratamiento con fluoropirimidina que el otro (el paciente 3R/perdida). El hecho de que un individuo particular adquirirá un tumor 2R/perdida o un tumor 3R/perdida es una cuestión de oportunidad, con una probabilidad igual de terminar con uno cualquiera de ellos. De este modo, el análisis del genotipo de TS en el tejido tumoral, conjuntamente con medidas de expresión del gen de TS, puede ayudar a identificar pacientes que deberían ser considerados como buenos candidatos para la quimioterapia con regímenes dirigidos a TS, y aquellos que, debido a su menor probabilidad de respuesta, deberían ser considerados para otro tipo de tratamiento.

De este modo, la presente invención se refiere al uso de estos polimorfismos del gen de TS como herramientas para la predicción de respuesta y selección de terapia. Por lo tanto, es evidente que el análisis solamente de tejido normal es insuficiente, sino que también se debe de analizar el tejido tumoral para establecer el estado del polimorfismo de TS en el tumor. Además, la presente invención también contempla analizar el genotipo de tejido normal, como también proporciona una comprensión a la hora de predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico, particularmente a la hora de predecir niveles de toxicidad farmacéutica.

De este modo, para predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico, el genotipo del tejido tumoral es relevante a la hora de predecir si el tumor probablemente responderá a un régimen quimioterapéutico. Además, el genotipo del tejido no tumoral puede ser relevante a la hora de predecir el riesgo de desarrollar toxicidad farmacéutica. De este modo, el conocimiento de ambos genotipos tisulares ayuda al médico a desarrollar un régimen quimioterapéutico adecuado que tendrá una mayor oportunidad de éxito para luchar contra el tumor, mientras que también disminuye el riesgo de toxicidad farmacéutica.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención proporciona un método para predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico basándose en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en tejido

canceroso. Este método comprende determinar el genotipo del polimorfismo de repetición en tándem en la región potenciadora del gen de TS (TSER) de un paciente en tejido normal y en el tejido canceroso. Los dos genotipos se comparan para determinar si se ha producido en el tejido tumoral una pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa. Basándose en la pérdida de heterocigosidad en la muestra tumoral, se puede predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico. Como se muestra anteriormente, un paciente que tenga un genotipo 2R/perdida en la muestra tumoral probablemente tendrá una respuesta similar al régimen quimioterapéutico que los pacientes que tengan un genotipo 2R/2R de la muestra tumoral. Por ejemplo, si los pacientes que tienen una muestra tumoral 2R/2R responden positivamente a un régimen quimioterapéutico, entonces se puede predecir que los pacientes que tienen un genotipo tumoral 2R/perdida también responderán positivamente al mismo régimen quimioterapéutico. De forma similar, si los pacientes que tienen una muestra tumoral 3R/3R responden negativamente o no muestran respuesta a un régimen quimioterapéutico, entonces se puede predecir que los pacientes que tienen un genotipo tumoral 3R/perdida también responderán negativamente o no mostrarán respuesta al mismo régimen quimioterapéutico.

Además, el genotipo del tejido normal se puede usar para predecir el riesgo del paciente a desarrollar toxicidad farmacéutica. Por ejemplo, como se señala anteriormente, los estudios han mostrado que se encontró que los pacientes 3R/3R experimentan menores riesgos de toxicidad farmacéutica que los pacientes 2R/2R. De este modo, un paciente con tejido normal 2R/3R probablemente mostrará toxicidad farmacéutica a dosis en cierto modo menores que los pacientes 3R/3R, pero probablemente serán capaces de soportar mayores dosis que los pacientes 2R/2R.

El término "respuesta" hace referencia a los efectos de un régimen quimioterapéutico sobre el tejido o células tumorales. Los métodos para medir tal respuesta se definen con criterios variables según sea apropiado, dependiendo habitualmente del régimen quimioterapéutico y del tipo de cáncer que se esté tratando. Generalmente, los criterios incluyen la reducción del tamaño tumoral, metástasis en sitios distantes (tales como ganglios linfáticos y metástasis pulmonar en el caso de cáncer colorrectal), y otros, dependiendo del tipo de tejido canceroso, etapa del cáncer y metástasis y régimen quimioterapéutico. Un experto en la materia apreciará y entenderá los criterios apropiados para las condiciones que rodean al tipo tumoral y al régimen quimioterapéutico. Por ejemplo, en uno de los estudios que condujo a la presente invención, para ser clasificado como un "respondedor" a un régimen quimioterapéutico, un tumor tuvo que tener una reducción de 50% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de la lesión indicadora, sin crecimiento de otra enfermedad o la aparición de nuevas lesiones. De este modo, en este caso, una respuesta positiva significaría una reducción del tumor y ninguna formación de nuevas lesiones. Contrariamente, una respuesta negativa significaría ninguna reducción tumoral o incluso crecimiento continuado del tumor, y/o la aparición de nuevas lesiones.

En una realización de la presente invención, el genotipo de un tejido normal del paciente se usa también para predecir la toxicidad farmacéutica potencial. Por ejemplo, como se señala anteriormente, los estudios han mostrado que se encontró que los pacientes 3R/3R experimentan menores riesgos de toxicidad farmacéutica a 5-FU que los pacientes 2R/2R. De este modo, un paciente con tejido normal 2R/3R probablemente mostrará toxicidad farmacéutica a dosis en cierto modo menores que los pacientes 3R/3R, pero probablemente serán capaces de soportar mayores dosis que los pacientes 2R/2R. De este modo, usando uno de los métodos de la presente invención para predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico, se podría predecir que un paciente que tiene un genotipo de tejido normal 2R/3R y un genotipo de tejido tumoral 2R/perdida reaccione positivamente al tratamiento con 5-FU (es decir, disminución del tamaño tumoral), pero sea más sensible a toxicidad farmacéutica que un paciente que tenga un genotipo de tejido normal 3R/3R. De este modo, usando esta predicción, junto con los datos compilados sobre otros individuos similares, un médico puede personalizar el régimen quimioterapéutico y dosificarlo basándose en datos de pacientes previos relacionados con respuestas tumorales y toxicidad farmacéutica.

Para determinar el genotipo de la muestra tumoral, se puede usar tejido/células tumorales recientes o conservadas. Si son conservadas, se conservan preferiblemente como muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (FPE). La muestra tumoral de FPE se somete entonces preferiblemente a microdissección por captura con láser (LCM). LCM es útil aislando células tumorales de células no tumorales, y de este modo proporciona una evaluación más exacta del genotipo del tejido tumoral.

Kohya et al, International Journal of Molecular Medicine, vol. 11, 2003, p. 65-69 se refieren a muestras de tejido tumoral que se fijaron con formalina y se embebieron en parafina para uso en microdissección manual. Este artículo también describe la microdissección por captura con láser de muestras de tejido tumoral crioconservadas.

También se pueden medir en el tejido tumoral los niveles de expresión del gen de TS. Tal medida puede ayudar a predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico, ya que los estudios *in vitro* han mostrado que las células se hacen resistentes a inhibidores de TS aumentando la expresión de TS y elevando los niveles intracelulares de TS. Los estudios han mostrado que la expresión de TS varía considerablemente entre tumores, y que la sensibilidad de diversos tumores a quimioterapia a base de 5-FU está correlacionada con el nivel intratumoral de TS. De este modo, además de determinar el genotipo tumoral, la medición de la expresión del gen de TS en el tumor puede proporcionar una información útil para predecir una respuesta a un resultado quimioterapéutico.

Para ayudar a predecir una respuesta, la presente invención también contempla recopilar datos relacionados con el genotipo de tejido tumoral y normal de los pacientes y sus respuestas a regímenes quimioterapéuticos, y/o los niveles de expresión del gen de TS en células tumorales. Por ejemplo, los pacientes cuyos tumores respondieron a un régimen quimioterapéutico se pueden clasificar como “respondedores”. El genotipo de su tumor, así como los niveles de expresión del gen de TS en sus tumores, se determina y se registra. Igualmente, los pacientes cuyos tumores no respondieron favorablemente a un régimen quimioterapéutico se pueden clasificar como “no respondedores”. El genotipo de su tumor, así como los niveles de expresión del gen de TS en sus tumores, se determina y se registra. Después, cuando se le diagnostica a un paciente un cáncer, el genotipo del tumor así como los niveles de expresión del gen de TS en el tumor se ensayan y se comparan con los datos recopilados. Si el genotipo tumoral y los niveles de expresión del gen de TS del paciente se correlacionan con el grupo respondedor, se puede predecir una respuesta positiva para ese paciente. Por el contrario, cuando un genotipo tumoral y los niveles de expresión del gen de TS del paciente se correlacionan con el grupo no respondedor, se puede predecir una respuesta negativa para el régimen quimioterapéutico para ese paciente.

Por ejemplo, si un paciente “A” tiene el genotipo de tejido normal de 2R/3R y el genotipo de tejido tumoral es 2R/perdida, usando un método de la presente invención se podría predecir que la respuesta al régimen quimioterapéutico en el paciente “A” es similar a una respuesta al mismo régimen quimioterapéutico en un paciente que tiene un genotipo de tejido tumoral 2R/2R o un genotipo de tejido normal 2R/2R. Como otro ejemplo, si un paciente “B” tiene el genotipo de tejido normal de 2R/3R y el genotipo de tejido tumoral es 3R/perdida, usando un método de la presente invención se podría predecir que la respuesta al régimen quimioterapéutico en el paciente “B” es similar a una respuesta a un mismo régimen quimioterapéutico en pacientes que tienen un genotipo de tejido normal o cáncer 3R/3R.

De forma similar, para predecir la toxicidad farmacéutica, la presente invención contempla recopilar datos referidos a niveles de toxicidad farmacéutica en pacientes, junto con el genotipo de tejido normal y de tejido tumoral de los pacientes. De este modo, se puede predecir un nivel “seguro” de fármaco administrado (antes de provocar una toxicidad farmacéutica mortal) basándose en el genotipo de tejido normal del paciente en comparación con otros pacientes que tienen el mismo genotipo de tejido normal y sus niveles de dosificación farmacéutica seguros.

El régimen quimioterapéutico puede ser cualquier régimen útil para tratar el cáncer/tumor en cuestión. Un experto en la materia estará al tanto del régimen quimioterapéutico apropiado a elegir. Diversos factores incluyen, pero no se limitan a, el tipo de cáncer, el estado/salud del paciente, el grado del cáncer, el tamaño tumoral, etc. Además, también se pueden usar simultáneamente otras terapias, tales como terapia de radiación, o una combinación farmacéutica quimioterapéutica. También, el régimen quimioterapéutico puede combinar otras terapias, incluyendo el uso de terapias génicas usando oligonucleótidos antisentido, anticuerpos dirigidos contra antígenos del cáncer, cofactores, tratamiento de radiación, y similares.

En el caso de cánceres gastrointestinales humanos, tales como cáncer colorrectal, los inhibidores de TS, incluyendo fluoropirimidinas e inhibidores a base de folato, parecen ser las quimioterapias actuales *de moda*. De este modo, la presente invención contempla predecir una respuesta a, pero no limitada a, inhibidores de TS. Los inhibidores de TS incluyen, pero no se limitan a, 5-FU, FUdR, UFT, S-1, capecitabina, ratiitrexed, pemetrexed, y nolatrexed, o una combinación de los mismos. A menudo, para tratar CRC, están implicadas múltiples terapias. Estas incluyen la administración de sustancias quimioterapéuticas adicionales, tales como cisplatino, oxaliplatino, taxanos, así como tratamiento de radiación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

Población de pacientes:

Los pacientes elegibles tuvieron (a) un diagnóstico de cáncer colorrectal diseminado o recurrente tras operación quirúrgica; (b) un estado de comportamiento de 0 a 2 del Eastern Cooperative Oncology Group, con función hematológica, hepática y renal adecuada; (c) no tuvieron tratamiento durante las cuatro semanas anteriores; y (d) una lesión que fue medible mediante examen radiológico.

Tratamiento

Los pacientes se trataron con S-1 dos veces al día durante 28 días, seguido de un período de descanso de 2 semanas. El S-1 se administró oralmente después del desayuno y de la cena. Como en estudios de fase II previos (Villafranca, E., et al., J. Clin. Oncol., 19:1779-1786, 2001; Zinzindohoue, F., et al., J. Clin. Oncol., 19:3442, 2001), se usó el área de superficie corporal para determinar la dosis de S-1 administrada, según lo siguiente: BSA < 1,25 m<sup>2</sup>, 40 mg; 1,25-1,5 m<sup>2</sup>, 50 mg; >= 1,5 m<sup>2</sup>, 60 mg. Estos tratamientos se repitieron hasta la progresión de la enfermedad según se determina por el médico del tratamiento, o a discreción del médico.

El protocolo se revisó y fue aprobado por una junta de revisión institucional y el comité ético antes de la activación del estudio, y se obtuvo una autorización escrita de cada paciente según las normativas institucionales.

Evaluación

5 Después de dos ciclos de tratamiento, se volvió a evaluar la enfermedad medible. Los criterios de respuesta fueron las definiciones estándar usadas para los ensayos del grupo cooperativo nacional (Green, S. et al., *Investig. New Drugs*, 10: 239-253, 1992). La respuesta se evaluó mediante CT en metástasis hepática, de ganglios linfáticos, y pulmonar, así como en lesiones primarias. Para ser clasificado como un respondedor, un tumor tenía que tener una  
10 reducción de 50% en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de la lesión indicadora sin crecimiento de otra enfermedad o la aparición de nuevas lesiones (*id.*).

Microdissección

15 Se seleccionó por un patólogo, tras el examen de los portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina, una muestra representativa de tumor de pretratamiento con S-1 embebida en parafina y fijada en formalina. Se tiñeron secciones de diez micrómetros de grosor con rojo neutro para permitir la visualización de histología para la microdissección por  
20 captura con láser (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Munich Alemania), que se llevó a cabo para asegurarse de que se estudiaron sólo células tumorales. El tejido recogido de la muestra que no tuvo invasión cancerosa mediante histopatología se consideró tejido normal.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

25 El aislamiento de ARN a partir de muestras embebidas en parafina se realizó según el procedimiento expuesto en la patente US nº 6.248.535, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Tras el aislamiento de ARN, se preparó ADNc de cada muestra como se describió previamente (Lord RV, et al., *J. Gastrointest Surg.*, 4: 135-142, 2000).

RT-PCR

30 La cuantificación relativa de ADNc para TS y un gen de referencia interna ( $\beta$ -actina) se realizó usando un método de detección en tiempo real a base de fluorescencia (Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM 7900 [TaqMan®], Applied Biosystems, Foster City, CA), como se describió previamente (Lord RV, et al., *J. Gastrointest Surg.*, 4: 135-142, 2000; Heid CA, et al., *Genome Res.*, 6: 986-994, 1996; Gibson UE, et al., *Genome Res.*, 6: 995-  
35 1001, 1996). En la Tabla 1 se dan los cebadores y las secuencias de las sondas usados. La mezcla de reacción de PCR consistió en 600 nM de cada cebador, 200 nM de sonda, 2,5 U de AmpliTaq Gold Polymerase, 200  $\mu$ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, 400  $\mu$ M de dUTP, 5,5 mM de  $MgCl_2$ , y 1 x tampón A Taqman que contiene un colorante de referencia, hasta un volumen final de 25  $\mu$ l (todos los reactivos son de Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones del ciclo fueron 50°C durante 10 s, 95°C durante 10 min., seguido de 46 ciclos a 95°C durante 15 s y  
40 60°C durante 1 min. Los ARN de colon, hígado y pulmón (todos de Stratagene, La Jolla, CA) se usaron como calibradores de control en cada placa.

Extracción de ADN, PCR y electroforesis

45 El ADN recogido se extrajo usando el kit QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, USA). La región promotora del gen de TS se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores: cebador directo 5'-GCGGAAGGGTCTGCCA-3' (SEC ID NO: 1) y cebador inverso 5'-TCCGAGCCGGCCACAGGCAT-3' (SEC ID NO:2). La PCR se llevó a cabo usando las condiciones descritas previamente (Kawakami, K., et al., *Anticancer Res.*, 19: 3249-3252, 1999). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con 10% de TBE-urea (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).  
50

Análisis estadístico

55 Los valores de la expresión génica se expresaron como relaciones entre dos medidas absolutas (gen de interés/gen de referencia interna). Los valores de la expresión génica en cada grupo de genotipo de TS se analizaron usando la prueba de la U de Mann-Whitney. Para evaluar la asociación entre el genotipo de TS y la respuesta a la quimioterapia, se usó Chi cuadrada para el ensayo de independencia. Para medir la asociación entre el genotipo de TS y la supervivencia, se usó la prueba de logaritmo del rango.

60 Resultados

65 Se estudió un total de 30 muestras de cáncer colorrectal de pretratamiento con S-1 primario procedentes de 30 pacientes, todos los cuales tuvieron enfermedad de etapa IV. Trece de los pacientes (43,3%) se clasificaron como respondedores a S-1, y 17 pacientes (56,7%) fueron no respondedores. Los valores del genotipo de TS y de la expresión de TS se obtuvieron para todos los 30 pacientes. Catorce de los 30 pacientes (46,6%) incluidos en el estudio fueron varones, y la edad media fue 65,0 (intervalo 39-79). El tiempo de supervivencia global medio para los



30 pacientes fue 215,5 días (intervalo 98-627). La supervivencia global media para pacientes con tumores que responden a S-1 fue 303 días (intervalo 139-627), y para no respondedores fue 190 días (intervalo 98-435).

5 Polimorfismo de TS y LOH en el número de secuencia de repeticiones de TS en tejido normal colorrectal y tejido canceroso colorrectal

10 Se obtuvieron fragmentos de PCR con una longitud estimada de 107 y 135 pb (Fig. 1). Los fragmentos de 107 y 135 pb representan la secuencia de dos repeticiones y tres repeticiones (2R y 3R). Los genotipos de TS se clasificaron en homocigoto 2R (2R/2R), homocigoto 3R (3R/3R), y heterocigoto 2R/3R. La frecuencia de cada genotipo en los 30 tejidos normales colorrectales se muestra en la Tabla 2. En los 22 tejidos normales con el genotipo 2R/3R, los 10 tejidos cancerosos mostraron sólo la banda de la secuencia de 2R (2R/perdida), y los 7 tejidos cancerosos mostraron sólo la banda de la secuencia de 3R (3R/perdida). Véanse la Tabla 3 y la Fig. 1. La tasa de incidencia de pérdida de heterocigosidad en el locus de TS fue 45% (10/22) del genotipo 2R/perdida, y 31,8% (7/22) del genotipo pérdida/3R (Tabla 3).

15 Características clinicopatológicas y polimorfismo de TS modulado por LOH

20 Los 30 pacientes se dividieron en cinco grupos, dependiendo del genotipo de TS modulado por LOH. Con respecto a las características clinicopatológicas, no hubo diferencia significativa entre estos cinco grupos (Tabla 4). Con respecto a la categoría de recaída, 13 de los 30 pacientes (43%) tuvieron metástasis hepática. La mayoría de los tumores (29/30) fueron histológicamente adenocarcinoma bien o moderadamente diferenciado.

Polimorfismo de TS modulado por LOH, y respuesta a quimioterapia con S-1

25 La tasa de respuesta de los 10 pacientes con genotipo 2R/perdida en el cáncer es 80% (8/10) y el mayor en cada uno de los genotipos, y la tasa de respuesta de los 7 pacientes con el genotipo 3R/perdida es 14% (1/7) y la más baja en cada uno de los genotipos. Hay una diferencia significativa entre cada tasa de respuesta ( $p = 0,029$ ) (Tabla 5).

30 Polimorfismo de TS modulado por LOH, y supervivencia global

35 Los períodos de supervivencia global media fueron 333 días (95% de C.I.; 241-468 d.) para aquellos pacientes colorrectales con genotipo 2R/3R en su tejido normal y genotipo 2R/perdida en el tejido canceroso. Esta supervivencia es significativamente más prolongada que la de pacientes con otros genotipos ( $p = 0,004$ ) Tabla 4 y Fig. 2). Los períodos de supervivencia global media fueron 308 días (95% de C.I.; 233-418 d.) para pacientes colorrectales con el genotipo 2R/2R o 2R/perdida en el tejido canceroso. Esto es significativamente más prolongado que aquel de pacientes con otros genotipos en el tejido canceroso ( $p = 0,002$ ) (Tabla 5 y Fig. 3).

40 Polimorfismo de TS modulado por LOH, y expresión de ARNm de TS intratumoral

45 La expresión media de ARNm de TS intratumoral fue 2,45 (intervalo 0,6-4,14) para pacientes con 2R/2R o 2R/perdida en el tejido canceroso, 2,97 (intervalo 1,63-19,23) para pacientes con genotipo 2R/3R en el tejido canceroso, y 3,68 (intervalo 1,64-11,97) para pacientes con genotipo pérdida/3R o 3R/3R. El genotipo de TS modulado por LOH en el tejido canceroso se asoció estadísticamente con la expresión de ARNm de TS intratumoral ( $p = 0,026$ ) (Tabla 6).

#### LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> DANENBERG, KATHLEEN

<120> MÉTODOS PARA DETERMINAR UN RÉGIMEN QUIMIOTERAPÉUTICO BASADO EN LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN EL LOCUS DE TIMIDILATO SINTASA

55 <130> 11220/230

<140>

<141> 20-02-2004

60 <160>6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
5	<400> 1 gcctcgggtgt gcctttca	18
10	<210> 2 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
	<400> 2 cccgtgatgt gcgcaat	17
20	<210> 3 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda	
	<400> 3 tcgccagcta cgcctgctc a	21
30	<210> 4 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
40	<400> 4 tgagcgcggc tacagctt	18
45	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador	
	<400> 5 tccttaatgt cagcacgat tt	22
55	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda	
	<400> 6 accaccacgg cggagcgg	18

**REIVINDICACIONES**

1. Método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen quimioterapéutico, en el que el régimen comprende un inhibidor de timidilato sintasa (TS), comprendiendo dicho método:
- 5 (a) determinar el genotipo del polimorfismo de repetición en tándem en la región potenciadora del gen de TS (TSER) en el tejido normal del paciente;
- (b) determinar dicho genotipo en el tejido tumoral del paciente;
- 10 (c) comparar el genotipo de tejido normal con el genotipo de tejido tumoral para determinar si se ha producido en el tejido tumoral una pérdida de heterocigosidad en la TSER; y
- (d) si hay una pérdida de heterocigosidad, predecir una respuesta al régimen quimioterapéutico basándose en la pérdida de heterocigosidad en la muestra tumoral, en el que
- 15 (i) una determinación de la presencia de un alelo con repetición triple en TSER (3R) predice un efecto negativo directo sobre la respuesta del tumor al régimen quimioterapéutico;
- (ii) una determinación de la pérdida de heterocigosidad de 2R/3R en tejido normal a 2R/perdida en tejido tumoral predice una mayor sensibilidad del tumor al régimen quimioterapéutico con respecto a la sensibilidad de un tumor que tiene un genotipo 2R/3R; y/o
- 20 (iii) una determinación de la pérdida de heterocigosidad de 2R/3R en tejido normal a 3R/perdida en tejido tumoral predice una sensibilidad del tumor al régimen quimioterapéutico similar a la de un tumor que tiene un genotipo 3R/3R.
- 25
2. Método según la reivindicación 1, en el que el tejido tumoral es tejido embebido en parafina fijado en formalina (FPE).
- 30
3. Método según la reivindicación 2, que comprende además someter el tejido tumoral FPE a microdissección por captura con láser.
- 35
4. Método según la reivindicación 1, que comprende además medir los niveles de expresión del gen de TS en el tejido tumoral.
5. Método según la reivindicación 4, que comprende además
- (a) determinar los niveles de la expresión del gen de TS en células tumorales de pacientes respondedores, teniendo dichos pacientes respondedores tumores que responden al régimen quimioterapéutico;
- 40 (b) determinar los niveles de la expresión del gen de TS en células tumorales de pacientes no respondedores, teniendo dichos pacientes no respondedores tumores que no muestran respuesta al régimen quimioterapéutico;
- (c) comparar los niveles de la expresión del gen de TS en tejido tumoral de dicho paciente con niveles de expresión del gen de TS de pacientes respondedores y no respondedores; y
- 45 (d) predecir una respuesta al régimen quimioterapéutico basándose en la comparación de la etapa (c).
- 50
6. Método según la reivindicación 1, en el que el régimen quimioterapéutico comprende la administración de 5-FU, FUdR, UFT, S-1, capecitabina, ratitrexed, pemetrexed, o nolatrexed, o una combinación de los mismos.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el régimen quimioterapéutico comprende la administración de 5-FU, FUdR, UFT, S-1, capecitabina, ratitrexed, pemetrexed, o nolatrexed, en combinación con cisplatino, oxaliplatino, un taxano, o radiación.
- 55
8. Método según la reivindicación 1, que comprende además
- (a) identificar otros pacientes que tienen un genotipo de tejido normal que es el mismo que el genotipo de tejido normal del paciente con cáncer;
- 60 (b) calcular los niveles de toxicidad farmacéutica en dichos otros pacientes después del tratamiento con el régimen quimioterapéutico; y
- (c) correlacionar dichos niveles de toxicidad farmacéutica con el paciente con cáncer, para predecir la respuesta del paciente al régimen quimioterapéutico.
- 65

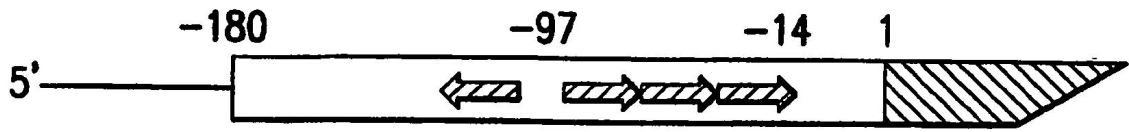


FIG.1A

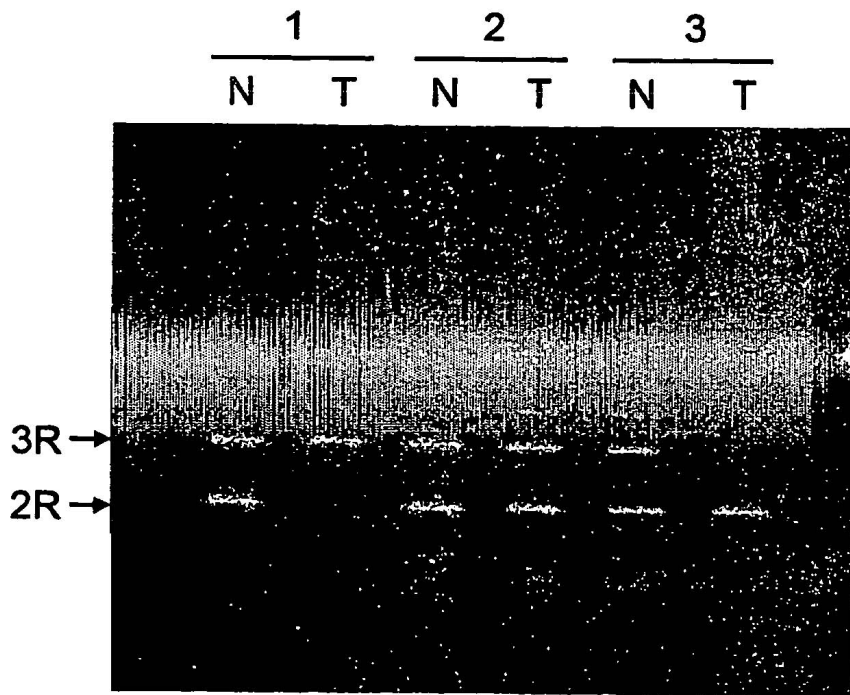


FIG.1B

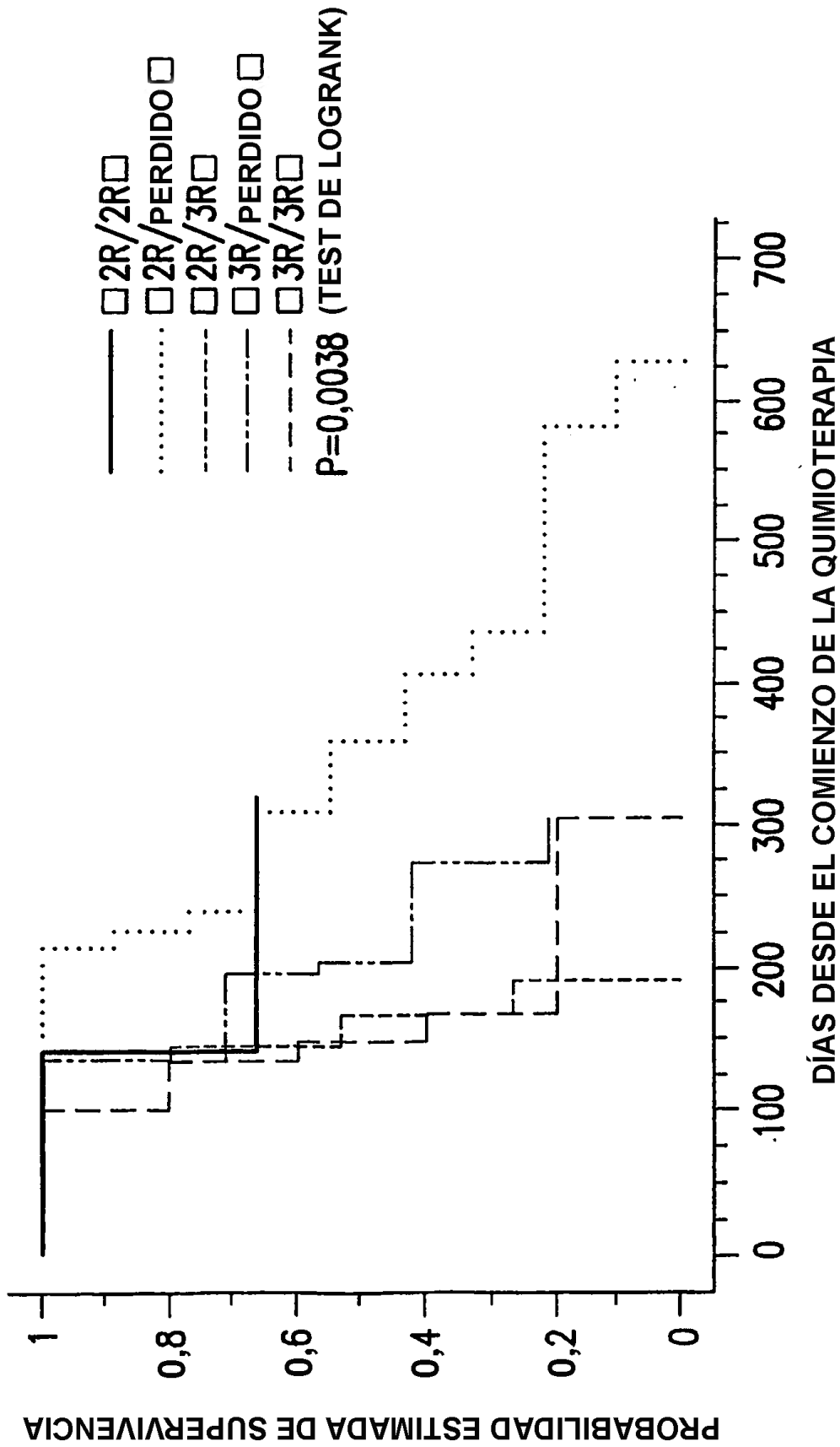


FIG. 2

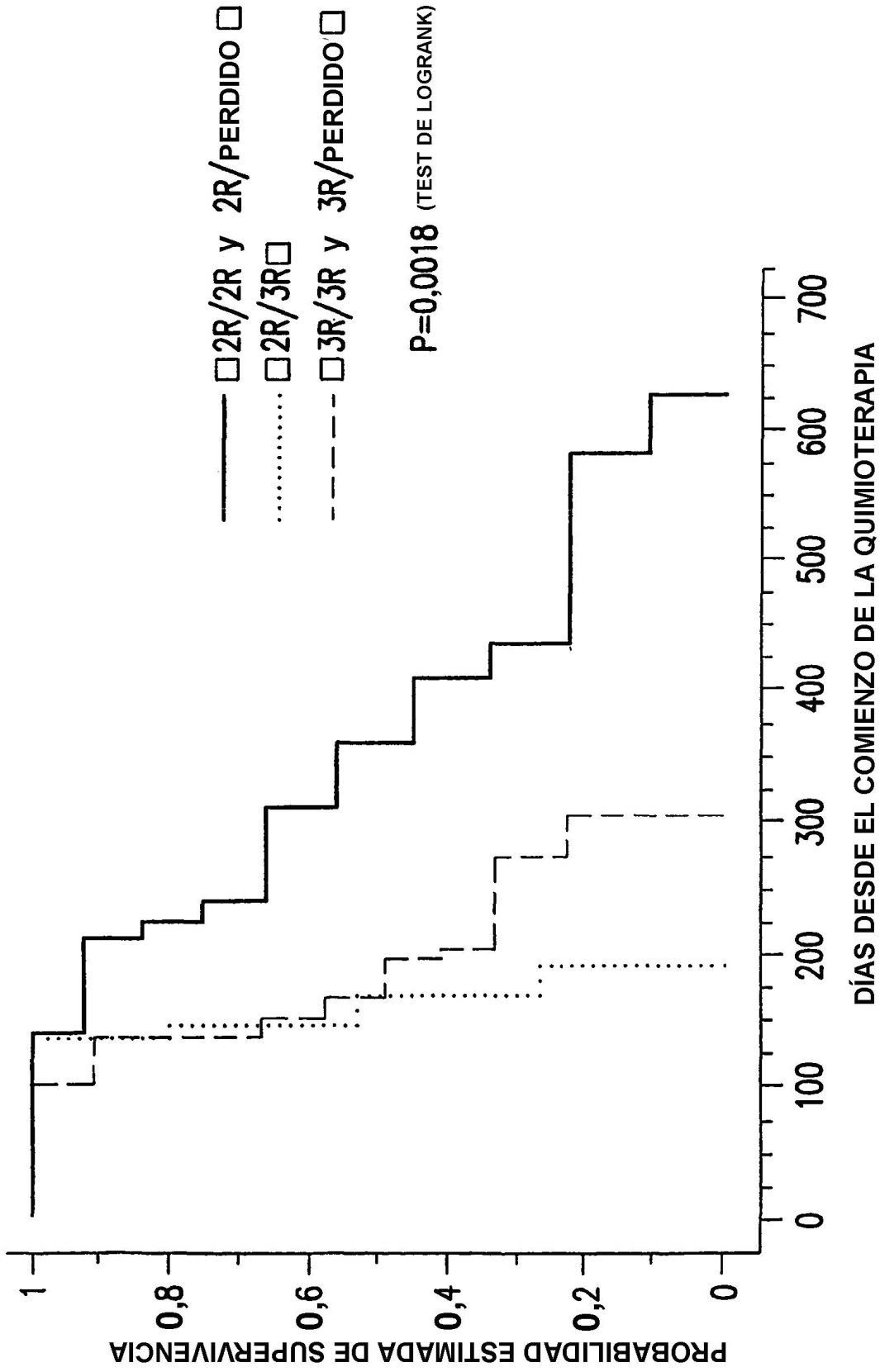


FIG.3

Secuencias de los cebadores de la amplificación y sondas para la santificación de ARNm de IS

Timidilato sintasa		
Cebador directo (TS-2-764F)	SEC ID nº 1	5'-GCCTCGGTGTGCCTTTCA-3'
Cebador inverso (TS2-830R)	SEC ID nº 2	5'-CCCGTGATGTGGCAAT-3'
Sonda (TS2-785T)	SEC ID nº 3	5'-(FAM)TCGCCAGCTACGCCCTGCTCA(TAMRA)-3'
$\beta$ -Actina		
Cebador directo (-actina-592F)	SEC ID nº 4	5'-TGAGCGCGGTACAGCTT-3'
Cebador inverso ( $\beta$ -actina-651R)	SEC ID nº 5	5'-TCCTTAATGTCAGCAGGATT-3'
Sonda (-octin-611T)	SEC ID nº 6	5'-(FAM)ACCACCAGGCCGAGCGG(TAMRA)-3'

FIG.4

Genotipo de TS en tejido normal

Genotipo en tejidos normales	2R/2R		2R/3R		3R/3R	
	n	%	n	%	n	%
	3	10%	22	73.3%	5	16.7%

FIG.5

Frecuencia de pérdida de heterocigosidad(LOH) en tejido tumoral

Genotipo en tejidos normales	2R/3R (n=22)					
	2R/loss		2R/3R		loss/3R	
Genotipo en tejidos tumorales	n	%	n	%	n	%
	10	45.5%	5	22.7%	7	31.8%
LOH	+		-		+	

FIG.6



Asociaciones entre variables clinicopatológicas y genotipo de TS modulado por LOH

Genotipo de tejido normal	2R/2R (n=3)	2R/perdida (n=10)	2R/3R (n=22)	perdida/3R (n=7)	3R/3R (n=5)	Valor de P
Genotipo de tejido tumoral						
Variable	n	n	n	n	n	
Sexo						
macho	1	6	2	3	2	n.s.
hembra	2	4	3	4	3	
Edad						
<65	1	4	3	5	1	n.s.
>=65	2	6	2	2	4	
Categoría de recaída						
Metástasis hepática	2	5	0	2	4	n.s.
Metástasis peritoneal y de ganglios linfáticos	0	2	2	3	1	
Recidiva local	1	1	3	0	0	
Metástasis hepática	0	2	0	2	0	
Histología						
Adenocarcinoma bien diferenciado	2	8	4	5	5	n.s.
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	1	1	1	2	0	
Adenocarcinoma mucinoso	0	1	0	0	0	

FIG.7

Genotipo de TS modulado por LOH y resultado clínico

Genotipo de tejido normal	2R/2R (n=3)	2R/perdida (n=10)	2R/3R (n=22)	3R/3R (n=5)	Valor de P
Genotipo de tejido tumoral		2R/perdida (n=10)	2R/3R (n=5)	perdida/3R (n=7)	
Respuesta a S-1					
Nº de casos de respuesta	2	8	1	1	0.029*
Nº de casos sin respuesta	1	2	4	4	
Tasa de respuesta	67%	80%	20%	20%	
Supervivencia global					
Supervivencia media (día)	224	333	143	150	0.004**
[95% de C.I. (día)]	[-]	[241-468]	[127-184]	[152-279]	[74-268]
Supervivencia global					
Supervivencia media (día)	308		143	181	0.002**
[95% de C.I. (día)]	[233-418]		[127-184]	[151-243]	

El valor de P se basa en \*X2 (Chi cuadrado) para el ensayo de independencia y \*\*la prueba de log de rangos.

**FIG.8**

Genotipo de TS modulado por LOH y expresión de TS

Genotipo de tejido normal Genotipo de tejido tumoral	2R/2R(n=3)	2R/3R(n=22)		3R/3R(n=5)	Valor de P
	2R/perdida(n=10)	2R/3R(n=5)	perdida/3R(n=7)		
ARNm de TS intratumoral media [intervalo]	2.86 [1.31-4.14]	2.72 [0.6-19.23]		3.31 [1.64-11.97]	0.026***
	2.86 [1.31-4.14]	2.43 [0.61-3.44]	3.74 [2.10-10.71]	3.31 [1.64-11.97]	
	2.45 [0.6-4.14]	2.97 [1.63-19.23]	3.68 [1.64-11.97]		

\*\*\*

\*\*\*El valor de P se basa en la prueba de la U de Mann Whitney

FIG.9