

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 117**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06707630 .7**
96 Fecha de presentación: **16.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1863925**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.12.2007**

54 Título: **Procedimiento para predecir la respuesta clínica al tratamiento de quimioterapia a base de platino**

30 Prioridad:
16.03.2005 EP 05075632

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

73 Titular/es:
**PANGAEA BIOTECH, S.A.
USP INSTITUTO UNIVERSITARIO DEXEUS
DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA SABINO
ARANA 5-19
08028 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:
**ROSELL COSTA, Rafael y
TARÓN ROCA, Miguel**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

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).

ES 2 380 117 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para predecir la respuesta clínica al tratamiento de quimioterapia a base de platino

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico, en particular, a un procedimiento para predecir la supervivencia de pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), basado en el patrón de metilación del gen 14-3-3 sigma. También se refiere al uso de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de pacientes con CPNM.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa aproximadamente el 80 % de todos los cánceres de pulmón, con 1,2 millones de casos nuevos cada año en todo el mundo. El CPNM dio lugar a más de un millón de muertes en todo el mundo en 2001 y es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer tanto en hombres como en mujeres (31 % y 25 %, respectivamente). El pronóstico del CPNM avanzado, es pésimo. Un ensayo reciente del Eastern Cooperative Oncology Group de 1.155 pacientes no mostró diferencias entre las quimioterapias usadas: cisplatino/paclitaxel, cisplatino/gemcitabina, cisplatino/docetaxel y carboplatino/paclitaxel. El tiempo medio global hasta la progresión fue de 3,6 meses y la supervivencia media fue de 7,9 meses, una tasa de supervivencia al año del 33 % y una tasa de supervivencia a los 2 años del 11 por ciento. Un estudio aleatorizado más reciente de 1.218 pacientes informó de una media de supervivencia de 11 meses en pacientes en estadio IIIB-IV. Sin embargo, ningún parámetro clínico puede representar completamente las sorprendentes diferencias en la supervivencia entre pacientes con enfermedad avanzada, sobreviviendo algunos durante años y otros sólo unos pocos meses.

- 20 La supervivencia global a los cinco años de pacientes con CPNM ha permanecido en niveles inferiores al 15 % durante los últimos 20 años. La estadificación TNM (T = tumor primario; N = ganglios linfáticos regionales; M = metástasis a distancia) de subgrupos permite la identificación de grupos de pacientes con pronóstico y opciones de tratamiento similares. La supervivencia a los cinco años es de alrededor del 25 % para el estadio patológico IIB (T1-2N1M0, T3N0M0), del 13 % para el estadio IIIA (T3N1M0, T1-2-3N2M0) y un bajo 7 % para el estadio IIIB (T4N0-1-2M0).

- 25 Actualmente, el cisplatino (DDP) y el carboplatino se encuentran entre los fármacos antineoplásicos de uso más extendido. Sin embargo, la resistencia a estos fármacos a través de mecanismos de novo o inducidos socava su potencial curativo. Estos fármacos alteran la estructura del ADN a través de la formación de aductos intracatenarios. Se ha atribuido la resistencia a agentes de platino tales como el DDP a la tolerancia potenciada a aductos de platino, la acumulación reducida de fármacos o la reparación de ADN potenciada.

- 30 El 14-3-3σ es un miembro de la superfamilia 14-3-3 que es responsable del punto de control G₂ del ciclo celular en respuesta al daño del ADN en células humanas. Su función se ha analizado en la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT116 (que expresa 14-3-3σ y p53 natural). Después de irradiación ionizante, 14-3-3σ secuestró complejos de Cdc2/ciclina B1 en el citoplasma, deteniendo de este modo las células en G₂ y evitando que inicien la mitosis antes de reparar su ADN dañado. Las células de carcinoma de colon carentes de 14-3-3σ tratadas con adriamicina pueden aun así iniciar (pero no mantener) la detención en G₂, conduciendo a la catástrofe mitótica y la muerte celular. La expresión de 14-3-3σ se reduce por la inactivación del gen p53 y mediante el silenciamiento del gen 14-3-3σ a través de la metilación de islas CpG.

- 35 14-3-3σ fue indetectable en muestras de cáncer de mama mediante análisis proteómico y la hipermetilación de islas CpG no metiladas normalmente en la región promotora del 14-3-3σ se implicó en el silenciamiento génico en la transcripción en cánceres de mama (Ferguson AL, Evron E, Umbricht CB, y col.: High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 2000;97:6049-54). Se ha informado de efectos similares de hipermetilación de 14-3-3σ en muchos tumores, incluyendo carcinomas de pulmón, gástrico, ovárico, de próstata y hepatocelular.

- 40 Se sabe que, con frecuencia, se encuentran fragmentos de ADN bicatenario en cantidades considerables en el suero de pacientes con cáncer, encontrándose niveles significativamente más altos en el suero de pacientes con metástasis. En cánceres de la cabeza y el cuello, microcíticos de pulmón y no microcíticos de pulmón, las mismas alteraciones de microsatélite detectadas en el tumor también se encontraron en ADN sérico o en plasma (Sánchez-Céspedes M, Monzo M, Rosell R, y col. Detection of chromosome 3p alterations in serum DNA of non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol* 1998;9:113-6; Sozzi G, Musso-K, Ratcliffe C, Goldstraw P, Pierotti MA, Pastorino U. Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 1999;5:2689-92). Además, se informó por primera vez de la detección de hipermetilación en las regiones promotoras de genes supresores de tumores en el suero de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. La hipermetilación puede analizarse mediante el ensayo sensible de reacción en cadena de la polimerasa específico de metilación, que puede identificar un alelo metilado entre 1000 alelos no metilados (Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 1996;93:9821-6).

Sathyanarayana y col. (*Cancer Genomics & Proteomics*, 2004, 1:1-8) divulgan que el gen 14-3-3 sigma estaba hipermetilado en CPNM y que este efecto podría usarse en el análisis y el pronóstico del cáncer.

Se descubrió que el 14-3-3 σ estaba metilado en el 43 por ciento de 60 cánceres gástricos y que las líneas celulares gástricas humanas positivas para metilación de 14-3-3 σ MKN74 (con p53 natural) y MICN28 (con p53 mutado) eran ambas altamente sensibles a adriamicina, mientras que las líneas celulares negativas para metilación de 14-3-3 σ (con p53 natural o o mutado) eran resistentes.

Aunque no puede lograrse un impacto global importante con la quimioterapia tradicional en CPNM, como se explica anteriormente, es evidente que la quimiosensibilidad y, por tanto, la supervivencia se determina de manera individual. No obstante, a pesar de la lista creciente de anomalías genéticas identificadas como implicadas en rutas de reparación del ADN y de la quimiosensibilidad alterada en pacientes con CPNM, todavía no se han desarrollado ensayos traduccionales para su uso en quimioterapia individualizada.

Es un objeto de la presente invención proporcionar predictores de respuesta a quimioterapia, que pueden ser una herramienta clínica valiosa para su uso en la selección de modos de tratamiento óptimos, en particular para pacientes como los que padecen CPNM, con una tasa de supervivencia tan baja y una quimiosensibilidad impredecible.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una herramienta para su uso en la predicción de la supervivencia diferencial y la quimiosensibilidad y en la adaptación de la quimioterapia en CPNM.

La resistencia a fármacos es un acontecimiento complejo y con numerosos factores que implica la activación/represión de múltiples rutas bioquímicas. Empleamos un enfoque proteómico para estudiar la respuesta a fármaco y la resistencia a cisplatino. Partiendo del supuesto de que los defectos en los puntos de control del ciclo celular pueden contribuir a la quimiosensibilidad, investigamos si los pacientes con tumores positivos para metilación de 14-3-3 σ podrían obtener mayores beneficios de la quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino.

Sorprendentemente, descubrimos que 14-3-3 σ está metilado en los sueros de un tercio de los pacientes con cáncer de pulmón microcítico y que, en general, la metilación está relacionada con una supervivencia media significativamente mejor para estos pacientes. Además, la metilación de 14-3-3 σ tenía una influencia incluso mayor sobre la supervivencia en pacientes con respuesta. El riesgo de muerte para pacientes con respuesta negativos para metilación de 14-3-3 σ fue casi cinco veces la de los pacientes con respuesta positivos para metilación.

En un aspecto, se divulga un procedimiento *in vitro* para predecir la supervivencia después de quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino de un paciente que padece cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) que comprende las etapas de:

- a) aislar ácidos nucleicos a partir de una muestra de tejido, suero o líquido corporal del paciente;
- b) establecer el estado de metilación del ácido nucleico que codifica el 14-3-3 sigma de la muestra,
- c) y clasificar a los pacientes en 2 grupos definidos como negativos para metilación o positivos para metilación en función de los resultados,

en el que para cada grupo se establece un pronóstico con relación a la supervivencia.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para predecir la supervivencia de un paciente que padece CPNM a un tratamiento de quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino y proporcionar una respuesta completa o parcial a la quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino, que comprende la etapa de determinar el estado de metilación de un ácido nucleico que codifica 14-3-3 sigma en una muestra biológica del paciente, en el que la presencia de metilación es indicativa de una mayor supervivencia de dicho paciente como una respuesta a dicho tratamiento de quimioterapia.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para diseñar un tratamiento de quimioterapia individual a base de cisplatino o carboplatino para un sujeto que padece CPNM que comprende:

- i) determinar el estado de metilación de un ácido nucleico que codifica 14-3-3 sigma en una muestra biológica del paciente;
- ii) tener en cuenta los datos obtenidos en la etapa anterior para diseñar un tratamiento de quimioterapia individual.

La invención se refiere también al uso de un kit para predecir la supervivencia a tratamiento de quimioterapia de un paciente con CPNM, en el que el kit comprende un primer recipiente que contiene un reactivo que modifica citosina no metilada y un segundo recipiente que contiene cebadores para la amplificación de un ácido nucleico del gen 14-3-3 que contiene CpG, en el que los cebadores distinguen entre ácido nucleico no metilado y metilado modificado.

Es importante destacar que en una realización de la invención, la metilación de 14-3-3 σ puede detectarse en líquidos

corporales anteriores al tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, obviando la necesidad de tejido tumoral y ofreciendo un procedimiento preciso y novedoso para seleccionar pacientes para quimioterapia a base de cisplatino y predecir la supervivencia después del tratamiento con dobletes a base de platino. Preferentemente, el líquido corporal es suero.

- 5 Así, se divulga también la determinación del estado de metilación del gen 14-3-3 sigma en una muestra de un mamífero, caracterizada porque la muestra es una muestra de suero.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura del gen 14-3-3 σ y secuencia de ADN del exón 1. Los sitios de CpG contenidos están subrayados y los dinucleótidos de CpG que se probaron para evaluar su metilación mediante reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación se indican con cajas (dinucleótidos de CpG 3 y 4 en el cebador directo y dinucleótidos de CpG 8 y 9 en el cebador inverso).

Figura 2. Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación para 14-3-3 σ . La metilación se detectó en ADN extraído a partir de suero usando el mini kit para sangre QIAmp (QIAGEN, Valencia, CA, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó una modificación con bisulfito de sodio y se sometieron 5 nL del ADN resultante a la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores de amplificación específicos para 14-3-3 σ metilado (M) o no metilado (U). La línea celular de cáncer colorrectal humano (HT29 [American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.]) (U) se usó como control normal no metilado, mientras que se usó ADN de placenta modificado con Sssl y bisulfito *in vitro* (M) como control positivo metilado. También se sometieron controles que no eran molde (C-) a la reacción en cadena de la polimerasa como controles de contaminación. Las muestras se valoraron como positivas para metilación cuando había alelos metilados presentes, visualizados como bandas en el carril de ADN metilado (pacientes 2, 4, 7, 10) y como negativas para metilación cuando se vieron bandas sólo en el carril de ADN no metilado (pacientes 1, 3, 5, 6, 8, 9).

Figura 3. A muestra la probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier para todos los pacientes. Para el grupo negativo para metilación, las tasas de supervivencia porcentuales calculadas son: a los 6 meses, el 50 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 60-81 por ciento); a los 12 meses, el 36 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 26-49 por ciento); a los 18 meses, el 20 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 12-32 por ciento). Para el grupo positivo para metilación, las tasas de supervivencia porcentuales calculadas son: a los 6 meses, el 87 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 77-98 por ciento); a los 12 meses, el 62 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 48-80 por ciento); a los 18 meses, el 41 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 27-63 por ciento). B muestra la probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con respuesta. Para el grupo negativo para metilación, los porcentajes de supervivencia calculados son: a los 6 meses, el 93 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 83-100 por ciento); a los 12 meses, el 44 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 28-69 por ciento); a los 18 meses, el 21 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 9-47 por ciento). Para el grupo positivo para metilación, los porcentajes de supervivencia calculados son: a los 6 meses, el 95 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 87-100 por ciento); a los 12 meses, el 85 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 70-100 por ciento); a los 18 meses, el 64 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 44-94 por ciento). IC=intervalo de confianza.

Descripción detallada de la invención

El cisplatino sigue siendo la base del tratamiento de quimioterapia de combinación en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Los resultados tienden a ser similares tanto si el fármaco que lo acompaña es paclitaxel, como docetaxel o gemcitabina. En general, se obtienen resultados similares con carboplatino, aunque en un estudio aleatorizado, la supervivencia media fue de 8,2 meses en la rama de paclitaxel/carboplatino y de 9,8 meses en la rama de paclitaxel/cisplatino.

Muchos fármacos citotóxicos inducen daño de ADN similar al provocado por los carcinógenos. La unión covalente del carcinógeno o el fármaco citotóxico da como resultado la formación de una base químicamente modificada en el ADN que se denomina un "aducto". El cisplatino tiene una estructura rígida con dos ligando de cloro lábiles y dos de amina estables en una configuración *cis*. Al igual que algunos agentes alquilantes, la molécula de fármaco neutra tiene que convertirse en una forma reactiva. Esto se produce de manera no enzimática en disolución, donde las reacciones de desplazamiento dan lugar a un intercambio por etapas de los ligandos de cloro lábiles con moléculas de agua. Las especies hidratadas cargadas son altamente reactivas, pero la especie cloro-monohidratada es la más significativa desde la perspectiva de la interacción con ADN a pH fisiológico. En el caso del carboplatino, que es un ligando ciclobutanodicarboxilato bidentado más estable, la reacción de hidratación es mucho más lenta. Esto reduce la potencia del fármaco, que, de este modo, requiere una dosis mayor para un efecto antitumoral equivalente. Tan pronto se forma la especie monohidratada de cisplatino, reacciona inmediatamente con una base de ADN (preferentemente N7 de guanina) para formar un aducto funcional. Después, se hidroliza el ligando de cloruro restante unido a platino en el monoadducto y la especie hidratada resultante interactúa con un segundo sitio nucleófilo para formar entrecruzamientos de ADN. Se forman entrecruzamientos intracatenarios de ADN tanto 1,2- como 1,3. Se forman entrecruzamientos intracatenarios 1,2 entre bases de guanina opuestas preferentemente en secuencias 5'G-C3' de ambas hebras. Sin embargo, cada vez más pruebas indican que los aductos intracatenarios proporcionan

la base más sólida para la acción citotóxica del cisplatino.

Generalmente, el cisplatino se formula como una solución estéril para inyección y se administra habitualmente a una dosis de aproximadamente 50 a 100 mg/m², administrada por vía intravenosa. Este ciclo puede repetirse aproximadamente cada 4 a 8 semanas.

- 5 Aunque el cisplatino y el carboplatino se usan ampliamente para pacientes con CPNM, la resistencia a estos fármacos a través de mecanismos de novo o inducidos socava su potencial curativo. En general, los mecanismos genéticos de la quimiorresistencia del cáncer son difíciles de entender. Durante los últimos 30 años, los oncólogos se han centrado en optimizar los resultados de pacientes con cáncer y es ahora cuando las nuevas tecnologías disponibles están permitiendo investigar polimorfismos, niveles de expresión génica y mutaciones génicas con el
- 10 objetivo de predecir el impacto de un tratamiento determinado en diferentes grupos de pacientes con cáncer para adaptar la quimioterapia.

- Para mejorar adicionalmente la tasa de supervivencia en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), es crucial su clasificación de pronóstico basada en alteraciones moleculares. Dicha clasificación proporcionará herramientas de diagnóstico más precisas y útiles y, en último término, opciones de tratamiento más
- 15 eficaces.

- Una de las alteraciones más importantes implicadas en la carcinogénesis es la metilación anómala de promotores. El interés en este campo ha crecido debido a la implantación del ensayo de PCR específica de metilación (MSP). La metilación de ADN se produce cuando se metila la citosina en la posición 5, ésta sólo aparece cuando cuando va seguida directamente de la base guanina en el dinucleótido de CpG. Esta modificación tiene importantes efectos
- 20 reguladores sobre la expresión génica, predominantemente cuando implica zonas ricas en CpG (islas CpG). Las citosinas metiladas en las regiones promotoras de un gen conducen a su inactivación.

- En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento novedoso y preciso para predecir la supervivencia de pacientes con CPNM después de quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino, basado en el estado de metilación de ácidos nucleicos del gen 14-3-3 sigma, en particular los de las secuencias promotoras. En una
- 25 realización, el estado de metilación se determina estudiando el patrón de metilación de las islas CpG del exón 1 de la secuencia de ADN del 14-3-3 sigma.

- Las proteínas 14-3-3 son una familia de moléculas de unión a fosfoserina/fosfotreonina altamente conservadas que controlan la función de un amplio conjunto de proteínas celulares. Desempeñan papeles importantes en una amplia variedad de procesos regulatorios vitales, incluyendo transducción de señales, apoptosis, progresión del ciclo celular y duplicación del ADN. En células de mamíferos, se han identificado siete isoformas de 14-3-3 (beta gamma, epsilon, eta, sigma, teta y zeta) y cada una de ellas parece tener diferente localización tisular y funciones específicas de isoforma. La expresión de 14-3-3σ se limita a células epiteliales. Estudios anteriores han demostrado que los niveles de proteína 14-3-3 son más elevados en cánceres de pulmón humanos en comparación con tejidos normales.
- 30

- 35 De todos los genes 14-3-3, el 14-3-3σ es el que se ha relacionado más directamente con el cáncer (Hermeking H., The 14-3-3 cancer connection. *Nature Rev Cancer* 2003;3:931-43). Se piensa que funciona como un supresor tumoral inhibiendo la progresión del ciclo celular y haciendo que las células dejen el compartimento de células madre y se sometan a diferenciación. La inactivación de 14-3-3σ se produce a muchos niveles y la alta frecuencia de inactivación de 14-3-3σ indica que tiene un papel crucial en la formación de tumores.

- 40 Sorprendentemente, descubrimos que pacientes con CPNM que presentan hipermetilación (y, por lo tanto, silenciamiento) del gen 14-3-3 sigma son más sensibles a quimioterapia con cisplatino o carboplatino y muestran una supervivencia significativamente mejor. Esta diferencia en la supervivencia es incluso más pronunciada en pacientes que responden a la quimioterapia.

- A continuación se describirá con detalle el procedimiento de la invención en sus distintas realizaciones. En primer lugar, se toma una muestra de tejido o líquido corporal de un paciente que padece CPNM. El presente procedimiento puede aplicarse a cualquier tipo de tejido o líquido corporal de un paciente.
- 45

En una realización, es preferible examinar tejido tumoral. Preferentemente, esto se realiza antes de la quimioterapia. Los tumores o sus porciones se extirpan quirúrgicamente del paciente o se obtienen mediante biopsia rutinaria. Para simplificar la conservación y el manejo de las muestras, éstas pueden fijarse con formalina e incluirse en parafina.

- 50 Sin embargo, desde el punto de vista clínico, la obtención de muestras de tejido es limitada debido a la escasez de tejido tumoral obtenido por broncoscopia en pacientes con CPNM en estadio IV. En estadios tempranos, podemos beneficiarnos a veces de especímenes de tumor reseccionados que proporcionan tejido tumoral para extracción de ARN. Pero una alternativa mucho mejor es usar líquidos corporales, en particular suero, como la muestra.

- 55 Análisis genéticos han mostrado que el ADN en circulación fuera de las células en plasma o suero de pacientes con cáncer comparte alteraciones genéticas similares a las descritas en el tumor correspondiente. En un estudio, se descubrió una alta correlación entre la metilación de algunos genes en el tumor y el suero de muestras de pacientes

con glioblastomas y una buena correlación en muestras de pacientes con CPNM (Ramírez, JL, Taron, M, y col. Serum DNA as a tool for cancer patient management, *Rocz Afad Med Bialymst.* 2003;48:34-41).

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, se prefiere que la muestra biológica sea un líquido corporal del paciente con CPNM seleccionada de entre sangre, plasma o suero. Más preferentemente, es suero. Puede disponerse de suero del paciente de manera fácil e inmediata, basta con tomar una muestra de sangre y separar las células por centrifugación.

Los ácidos nucleicos, preferentemente ADN, se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos por el experto y comercialmente disponibles, tal como el mini kit para sangre QIAmp de QIAGEN.

Una vez aislado el ácido nucleico, el procedimiento de la invención incluye determinar el estado de metilación de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican el gen 14-3-3 sigma y aislados a partir del paciente.

Las expresiones "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" como se usan en el presente documento se refieren a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido o a un fragmento de cualquiera de ellos, a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar una hebra sentido o antisentido, ácido nucleico peptídico (PNA) o a cualquier material de tipo ADN o ARN, de origen natural o sintético. Como entenderán los expertos en la técnica, cuando el ácido nucleico es ARN, los desoxinucleótidos A, G, C y T son reemplazados por ribonucleótidos A, G, C y U, respectivamente.

Puede usarse cualquier procedimiento para determinar el estado de metilación de los ácidos nucleicos, tales como los descritos en los documentos WO 02/27019, US 6.017.704, US 6.331.393 y US 5.786.146. La determinación del estado de metilación del ácido nucleico incluye amplificar el ácido nucleico por medio de cebadores de oligonucleótido que distinguen entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Uno de tales procedimientos se describe con detalle en los ejemplos.

Preferentemente, el procedimiento para detectar un ácido nucleico que contiene CpG metilado incluye poner en contacto una muestra que contenga ácido nucleico con un agente que modifica citosina no metilada, amplificar el ácido nucleico que contiene CpG de la muestra por medio de cebadores de oligonucleótido específicos para CpG, en el que los cebadores de oligonucleótido distinguen entre ácido nucleico no metilado metilado modificado y detectar el ácido nucleico metilado. La etapa de amplificación es opcional y, aunque es deseable, no es esencial. El procedimiento se basa en la reacción de PCR misma para distinguir entre ADN modificado (p. ej., modificado químicamente) metilado y no metilado.

El término "modifica" como se usa en el presente documento significa la conversión de una citosina no metilada a otro nucleótido que facilitará los procedimientos para distinguir la citosina no metilada de la metilada. Preferentemente, el agente modifica la citosina no metilada a uracilo. Preferentemente, el agente usado para modificar la citosina no metilada es bisulfito de sodio, aunque también pueden usarse otros agentes que modifican de forma similar citosina no metiladas, pero no citosina metilada. El bisulfito de sodio (NaHSO_3) reacciona fácilmente con el doble enlace 5,6 de la citosina, pero escasamente con citosina metilada. La citosina reacciona con el ion bisulfito para formar un intermedio de reacción de sulfonato de citosina que es susceptible de desaminarse, dando lugar a un sulfonato de uracilo. El grupo de sulfonato puede retirarse bajo condiciones alcalinas, dando como resultado la formación de uracilo. El uracilo se reconoce como una timina por la polimerasa Taq ($\text{C} \rightarrow \text{U} \rightarrow \text{T}$) y, por lo tanto, tras la PCR, el producto resultante contiene citosina sólo en la posición en la que aparece 5-metilcitosina en el ADN molde de partida ($\text{mC} \rightarrow \text{mC} \rightarrow \text{C}$).

Los cebadores usados para determinar el estado de metilación del gen 14-3-3 sigma son, preferentemente, de la región promotora, más preferentemente del exón 1. Se prefiere especialmente la región entre los dinucleótidos de CpG 3 y 9 dentro del gen 14-3-3 σ debido a la precisión de los resultados obtenidos.

El estado de metilación puede determinarse cualitativamente o cuantitativamente. Pueden usarse procedimientos bien conocidos tales como la PCR cuantitativa a base de fluorescencia (usando cebadores fluorescentes tales como sondas Taqman). Pueden encontrarse detalles adicionales en el documento US 6.331.393.

En una realización preferida, se usa una determinación cualitativa, es más rápida y más sencilla de implantar en un laboratorio y los resultados son precisos. En esta realización, se usan para la PCR cebadores capaces de distinguir entre el DNA metilado o no metilado, como se explica anteriormente, y después el ADN resultante se purifica y se determina su estado de metilación, por ejemplo, por separación mediante electroforesis en gel de agarosa. Una simple exploración visual (requiere tinción previa) bajo luz UV permite clasificar la muestra como metilada, cuando las bandas están presentes en el carril metilado, o no metilada, cuando las bandas están presentes sólo en el carril no metilado. Se usan como controles ADN sintéticamente metilado y no metilado.

Una vez obtenido el estado de metilación de una muestra, puede predecirse la supervivencia de acuerdo con los resultados mostrados en los ejemplos. Los pacientes con estado de metilación tendrán tiempo hasta la progresión y supervivencia mejorados si se tratan con quimioterapia con cisplatino o carboplatino. Puede predecirse que los intervalos de tiempo de supervivencia son, de media, un 30 % más largos para pacientes metilados.

Después de la quimioterapia, la predicción pueden mejorarse adicionalmente una vez se sabe si el paciente pertenece al grupo de "pacientes con respuesta". Si es así, puede predecirse que la posibilidad de supervivencia

después de cuatro meses es al menos cinco veces mayor para pacientes con respuesta positivos para metilación que para pacientes con respuesta negativos para metilación, y puede predecirse que los intervalos de tiempo de supervivencia son, en general, al menos un 50 % mayores para pacientes con 14-3-3-sigma metilado.

Como se usa en el presente documento, "una respuesta clínica" es la respuesta del tumor al tratamiento con un agente quimioterapéutico. Los criterios para determinar una respuesta al tratamiento están ampliamente aceptados y permiten comparaciones de la eficacia de tratamientos alternativos. Una respuesta completa (o remisión completa) es la desaparición de la totalidad de la enfermedad maligna detectable. Una respuesta parcial es una disminución de aproximadamente un 50 por ciento en el producto de los diámetros perpendiculares mayores de una o más lesiones, ausencia de nuevas lesiones y ausencia de progresión de cualquier lesión. Un paciente con respuesta es un paciente que muestra una respuesta completa o parcial a la quimioterapia con cisplatino o carboplatino.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporciona el uso de un kit para predecir la supervivencia al tratamiento con quimioterapia de CPNM en un sujeto. Los kits de la invención incluyen un primer recipiente que contiene un reactivo que modifica citosina no metilada y un segundo recipiente que contiene cebadores para la amplificación de un ácido nucleico del gen 14-3-3 que contiene CpG, en el que los cebadores distinguen entre ácido nucleico no metilado y metilado modificado. Preferentemente, el reactivo que modifica citosina no metilada es bisulfito.

Habiéndose descrito de este modo la invención, se ilustra la puesta en práctica de la invención mediante los ejemplos experimentales que se proporcionan a continuación. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Se llevó a cabo un estudio prospectivo multicéntrico para evaluar la metilación de 14-3-3 σ en los sueros de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico avanzado y correlacionar el estado de metilación con la supervivencia. El estudio fue aprobado por los comités de ética independientes de los seis centros participantes y todos los pacientes dieron su consentimiento informado firmado.

Pacientes

Los pacientes se consideraron idóneos para el presente estudio si tenían cáncer de pulmón no microcítico en estadio IV o estadio IIIB (con derrame pleural maligno) confirmado histológicamente. Otros criterios de idoneidad incluían un estado funcional del Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) de 0 (sin síntomas y plenamente activo) o 1 (con síntomas, con capacidad plena de levantarse, con actividad física intensa limitada); una edad de al menos 18 años; función hematológica adecuada (al menos 9 g por decilitro [5,6 mmol por litro] de hemoglobina, recuento de neutrófilos de al menos 1.500 por milímetro cúbico y un recuento plaquetario de al menos 100.000 por milímetro cúbico); función renal adecuada (creatinina sérica menos de 1,5 veces el límite superior de normalidad); y función hepática adecuada (bilirrubina no más de 1,5 veces el límite superior normal, aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa no más de 5 veces el límite superior de normalidad). Se excluyeron los pacientes con metástasis cerebrales clínicamente manifiestas y aquellos que habían recibido quimioterapia anteriormente. También se excluyeron los pacientes con un estado funcional ECOG de 2 (con síntomas, puede levantarse, autonomía para el cuidado personal, pasa más del 50 por ciento de las horas que está despierto fuera de la cama), basándose en resultados de estudios anteriores en los que estos pacientes tuvieron una elevada tasa de acontecimientos adversos graves y una escasa supervivencia.

Los pacientes recibieron cisplatino en una dosis de 75 mg por metro cuadrado de superficie corporal en el día 1 más gemcitabina a una dosis de 1.250 mg por metro cuadrado en los días 1 y 8. El ciclo se repitió cada 3 semanas durante un máximo de seis ciclos.

Antes del estudio, se sometió a todos los pacientes a procedimientos de estadificación, incluyendo una exploración clínica, una radiografía de tórax desde dos vistas y una tomografía computerizada del tórax y el abdomen. La gammagrafía ósea o el escáner tomográfico del cerebro fueron necesarios sólo para pacientes con sospecha de metástasis ósea o cerebral. Antes de cada administración de quimioterapia, los pacientes se sometieron a una exploración clínica consistente en una analítica bioquímica rutinaria y recuentos sanguíneos.

Las respuestas objetivas fueron evaluadas por investigadores clínicos después del tercer y el sexto ciclo de tratamiento, repitiendo los procedimientos de estadificación. Se definió una respuesta completa como la desaparición de todos los sitios conocidos de enfermedad; se definió una respuesta parcial como una reducción del 50 por ciento o más de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares mayores de lesiones medibles, ausencia de nuevas lesiones y ausencia de progresión de cualquier lesión; se definió enfermedad estable como una reducción de menos del 50 por ciento o un incremento de menos del 25 por ciento de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares mayores de lesiones medibles y ausencia de lesiones nuevas; y se definió enfermedad progresiva como un incremento del 25 por ciento o más del tamaño de una o más lesiones medibles, o una nueva lesión. Para la evaluación de la respuesta, los pacientes que lograron una respuesta completa o parcial se consideraron "pacientes con respuesta" y todos los demás pacientes se consideraron "pacientes sin respuesta". El tiempo hasta la progresión se calculó desde la fecha de inscripción hasta la fecha de progresión. La supervivencia se calculó desde la fecha de inscripción hasta la fecha de la muerte o el último seguimiento clínico.

Análisis de 14-3-3 σ por reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación

Se recogieron diez mililitros de sangre periférica en tubos con activador de la coagulación y se separó el suero de las células por centrifugación. Las muestras se enviaron a nuestro laboratorio (Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, España) para el análisis de la metilación de 14-3-3 σ . Se extrajo el ADN de 800 microlitros de suero usando el mini kit para sangre QIAmp (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y se resuspendió en un volumen final de 50 mililitros. Se usaron como control ADN sérico y tumoral emparejados de un grupo independiente de 28 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico extirpado quirúrgicamente. El ADN genómico tumoral también se derivó de un tejido tumoral extirpado incluido en parafina obtenido por microdissección con captura láser (Palm, Oberlensheim, Alemania). El ADN tumoral aislado se incubó con proteinasa K y se extrajo el ADN con precipitación con fenol-cloroformo y etanol. El ADN tumoral o sérico purificado se desnaturizó con hidróxido de sodio y se modificó con bisulfito de sodio, que convierte las citosinas no metiladas, pero no las metiladas, en uracilo.

La reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación se realizó con cebadores específicos para el ADN metilado o el modificado no metilado que se extiende en la región entre los dinucleótidos de CpG 3 y 9 dentro del gen 14-3-3 σ (fig. 1). Después, se purificaron las muestras de ADN con la resina de purificación de ADN Wizard (Promega, Madison, WI, EE. UU.), se trataron de nuevo con hidróxido de sodio, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua. Los cebadores específicos para ADN metilado [5'-GATATGGTAGTTTTATGAAAGGCGTCG-3' (sentido) y 5'-CCTCTAACC GCCCACCACG-3' (antisentido)] y los cebadores específicos para ADN no metilado [5'-GATATGGTAGTTTTATGAAAGGTGTTGTG-3' (sentido) y 5'-CCCTCTAACCACCCACCACA-3' (antisentido)] proporcionaron un producto de reacción en cadena de la polimerasa de 109 pb. Las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes: 1 ciclo a 95 °C durante 12 minutos; 45 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 58 °C (reacción no metilada) o 64 °C (reacción metilada) durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos; y 1 ciclo a 72 °C durante 7 minutos.

Se usó ADN de placenta tratado *in vitro* con metiltransferasa SssI (New England Biolabs, Beverly, MA, EE. UU.) como control positivo para alelos metilados 14-3-3 σ y se usó ADN de linfocitos normales como control negativo. Se cargaron diez microlitros de cada producto amplificado específico de metilación de 50 microlitros directamente en geles de agarosa al 2 por ciento no desnaturizantes, se tiñeron con bromuro de etidio y se examinaron bajo iluminación ultravioleta. Las muestras se valoraron como positivas para metilación cuando había alelos metilados presentes, visualizados como bandas en el carril de ADN metilado (fig. 2) y como negativas para metilación cuando se vieron bandas sólo en el carril de ADN no metilado (fig. 2).

Análisis estadísticos

La supervivencia desde la fecha de inscripción fue el criterio de valoración principal. Suponiendo un nivel de significación bilateral de 0,05, se calculó que un tamaño inicial de muestra de 121 pacientes proporcionaba una potencia del 90 por ciento para detectar un incremento del 15 por ciento en la supervivencia al año en el grupo positivo para metilación (Parmar MKB, Machin D. Sample sizes for survival studies. In Parmar MKB, Machin D, ed. Survival analysis. A practical approach. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, 1996:196-207). Los análisis se llevaron a cabo en un total de 115 pacientes. Los tiempos de supervivencia de acuerdo con el estado de metilación de 14-3-3 σ se calcularon con el procedimiento de Kaplan-Meier y se compararon con la prueba del orden logarítmico bilateral. Las características basales y la respuesta de acuerdo con el estado de metilación de 14-3-3 σ se compararon con la prueba exacta de Fisher bilateral o con la prueba Chi-cuadrado para variables categóricas y con la prueba de la t de Student para la edad. La normalidad de la edad se verificó con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. La correlación entre la respuesta y otras variables se evaluó con una prueba exacta de Fisher bilateral. Se realizaron ajustes de modelos de regresión logísticos de multivariable y univariable para obtener oportunidades relativas ajustadas y en bruto para estados de metilación. Se usó la prueba de Hosmer-Lemeshow para evaluar la bondad del ajuste. Se usó un análisis de regresión de Cox de univariable para evaluar la asociación entre cada factor de pronóstico potencial y la supervivencia y el tiempo hasta la progresión. Los factores que se descubrió que eran significativos ($P < 0,1$) en el análisis de univariable se incluyeron en un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox de multivariable con un procedimiento por etapas (tanto hacia delante como hacia atrás) para evaluar la significación independiente de diferentes variables en la supervivencia. Se usó la prueba del cociente de verosimilitudes para evaluar la bondad del ajuste y se usó la prueba de Wald para evaluar el coeficiente de significación. Los intervalos de riesgo relativo y de confianza del 95 % se calcularon a partir del modelo de Cox para todos los predictores significativos del tiempo hasta el acontecimiento. Los cálculos del tiempo hasta el acontecimiento, con intervalos de confianza asociados del 95 %, se realizaron de acuerdo con el procedimiento de incidencia acumulativo. Se usó un análisis de referencia, con un tiempo de referencia de cuatro meses, para evaluar la asociación de la respuesta con la supervivencia. Se realizó un análisis de multivariable usando el modelo de regresión de Cox estratificado por respuesta, con el estado de metilación de 14-3-3 σ ajustado según el estado funcional. Para todos los análisis de regresión, se probaron y se cumplieron las suposiciones del modelo de Cox. La significación estadística se estableció a 0,05. Se realizaron análisis usando SPSS 11.0 para realizar los cálculos y S-PLUS 6.1 para las gráficas.

Resultados

Se inscribieron un total de 115 pacientes en este estudio entre el 1 de agosto de 2001 y el 30 de junio de 2002. El seguimiento medio de los pacientes que seguían vivos en el momento del análisis fue de 17 meses (intervalo, 1-30,7). La media de edad fue de 62 años (intervalo, 31-81); hombres, 108 (93,9 por ciento); estado funcional ECOG de 0, 32 (27,8 por ciento), 1, 83 (72,2 por ciento); fumadores, 99 (86,1 por ciento); adenocarcinoma, 51 (44,7 por ciento), carcinoma de células escamosas, 42 (36,8 por ciento), carcinoma de células grandes, 21 (18,4 por ciento). Veinticinco pacientes (21,7 por ciento) tenían derrame pleural maligno y ocho (7 por ciento) se habían sometido a cirugía del tumor primario de pulmón con anterioridad. Ningún paciente recibió radioterapia torácica. Las características de los 115 pacientes se muestran en la tabla 1.

Los resultados representativos de la reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación se muestran en la tabla 1. Treinta y nueve pacientes fueron positivos para metilación de 14-3-3 σ y 76 fueron negativos para metilación de 14-3-3 σ . Las características demográficas y clínicas estaban bien equilibradas entre estos dos grupos (tabla 1). De 28 pacientes sometidos a resección quirúrgica usados como control, siete fueron positivos para metilación tanto en tumor como en suero y los 21 restantes fueron negativos para metilación tanto en tumor como en suero.

Tabla 1: Características de los pacientes para los 115 pacientes y desglose según el estado de metilación de 14-3-3 σ .

	Total	Negativos para metilación de 14-3-3 σ	Positivos para metilación de 14-3-3 σ
N.º de pacientes	115	76	39
Edad			
Media	62	63	61
Intervalo	31-81	40-81	31-78
Sexo			
Masculino	108 (93,95 %)	70 (92,1 %)	38 (97,4 %)
Femenino	7 (6,1 %)	6 (7,9 %)	1 (2,6 %)
Condición de fumador			
Fumador	99 (86,1 %)	64 (84,2 %)	35 (89,7 %)
No fumador	16 (13,9 %)	12 (15,8 %)	4 (10,3 %)
Estado funcional ECOG			
0	32 (27,8 %)	21 (27,6 %)	11 (28,2 %)
1	83 (72,2 %)	55 (72,4 %)	28 (71,8 %)
Histología			
Adenocarcinoma	51 (44,3 %)	38 (50 %)	13 (33,3 %)
Carcinoma de células escamosas	42 (36,5 %)	23 (30,3 %)	19 (48,7 %)

(continuación)

Carcinoma de células grandes	22 (19,1 %)	15 (19,7 %)	7 (17,9 %)
Derrame pleural			
Sí	25 (21,7 %)	16 (21,1 %)	9 (23,1 %)
No	90 (78,3 %)	60 (78,9 %)	30 (76,9 %)
Cirugía anterior			
Sí	8 (7 %)	5 (6,6 %)	3 (7,7 %)
No	107 (93 %)	71 (93,4 %)	36 (92,3 %)
Respuesta			
Respuesta completa	2 (1,7 %)	2 (2,6 %)	0
Respuesta parcial	49 (42,6 %)	27 (35,5 %)	22 (56,4 %)
Enfermedad estable	27 (23,5 %)	22 (28,9 %)	5 (12,8 %)
Enfermedad progresiva	37 (32,2 %)	25 (32,9 %)	12 (30,8 %)

Respuesta del tumor

Se pudo evaluar la respuesta de ciento quince pacientes. Dos pacientes (1,7 por ciento) consiguieron una respuesta completa; 49 (42,6 por ciento) presentaron una respuesta parcial; 27 (23,5 por ciento) presentaron enfermedad estable y 37 (32,2 por ciento) presentaron enfermedad progresiva. El modelo de regresión de univariable mostró que sólo los estados funcionales ECOG se correlacionaban significativamente con la respuesta (oportunidades relativas en bruto: estado funcional de 0, 2,33 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,01-5,36]; $P = 0,05$). La oportunidad relativa en bruto para el estado positivo para metilación de 14-3-3 σ fue de 2,10 (intervalo de confianza del 95 por ciento, 0,96-4,59) ($P = 0,06$).

Tiempo hasta la progresión

El tiempo global hasta la progresión para los 115 pacientes fue de 6,9 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 5,3-8,5). El tiempo hasta la progresión fue de 6,3 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 4,5-8,2) para el grupo negativo para metilación y de 8,0 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 5,3-10,7) para el grupo positivo para metilación ($P = 0,027$ mediante la prueba del orden logarítmico bilateral).

El modelo de regresión de Cox de univariable mostró que sólo el estado de metilación de 14-3-3 σ se correlacionaba significativamente con el tiempo hasta la progresión (cociente de riesgos instantáneos: 14-3-3 σ con estado de metilación negativo, 1,59 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,05-2,40]; $P = 0,029$). Un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox de multivariable por etapas identificó sólo el estado de metilación de 14-3-3 σ como un factor de pronóstico independiente para el tiempo hasta la progresión. Sesenta y cuatro pacientes (55,7 por ciento) no recibieron quimioterapia de segunda línea. De los 51 pacientes restantes (44,3 por ciento) que recibieron quimioterapia de segunda línea, 32 (62,7 por ciento) fueron negativos para metilación y 19 (37,3 por ciento) fueron positivos para metilación.

Supervivencia

La media de supervivencia para los 115 pacientes fue de 10,9 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 8,6-13,2). La supervivencia media fue de 9,8 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 7,3-12,5) para el grupo negativo para metilación en comparación con 15,1 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 9,7-20,6) para el grupo positivo para metilación ($P = 0,004$ mediante la prueba del orden logarítmico bilateral) (fig. 4A). El modelo de regresión de Cox de univariable mostró que sólo el estado de metilación de 14-3-3 σ y el estado funcional ECOG se correlacionaban significativamente con la supervivencia (proporciones de riesgo: estado de metilación de 14-3-3 σ negativo, 2,07 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,24-3,45; $P = 0,006$]; estado funcional de 1, 2,45 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,39-4,32; $P = 0,002$] (tabla 2). El modelo de regresión de Cox de multivariable por etapas también identificó sólo el estado de metilación de 14-3-3 σ y el estado funcional ECOG como marcadores de pronóstico independientes para la supervivencia.

Supervivencia de acuerdo con la respuesta del tumor y el estado de metilación de 14-3-3 σ

El modelo de regresión de Cox de univariable que incluía a los 115 pacientes mostró que, además del estado de metilación de 14-3-3 σ y el estado funcional ECOG, la respuesta también se correlacionaba significativamente con la supervivencia (cociente de riesgos instantáneos para pacientes sin respuesta, 2,84 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,75-4,60; $P < 0,001$] (tabla 2).

Tabla 2. Correlación de características anteriores al tratamiento y respuesta con la supervivencia en 115 pacientes mediante análisis de univariable.

		N. ° de pacientes	Cociente de riesgos instantáneos	P
Estado de 14-3-3σ				0,006
	Positivo para metilación	39	1 referente	
	Negativo para metilación	76	2,07 (1,24-3,45)	
Respuesta				<0,001
	Pacientes con respuesta	51	1 referente	
	Pacientes sin respuesta	64	2,84 (1,75-4,60)	
Estado funcional ECOG				0,002
	0	32	1 referente	
	1	83	2,45 (1,39-4,32)	
Cirugía anterior				0,99
	No	107	1 referente	
	Sí	8	1,01 (0,44-2,33)	

(continuación)

Fumador			0,09
No	16	1 referente	
Sí	99	2,08 (0,90-4,80)	
Derrame pleural			0,97
No	90	1 referente	
Sí	25	0,99 (0,56-1,74)	
Histología			
Adenocarcinoma	51	1 referente	0,68
Carcinoma de células escamosas	42	0,90 (0,54-1,50)	0,29
Carcinoma de células grandes	22	1,38 (0,77-2,48)	
Sexo			0,26
Femenino	7	1 referente	
Masculino	108	1,96 (0,62-6,21)	
Edad			0,95
	115	0,99 (0,98-1,02)	

Por tanto, se llevaron a cabo análisis de exploración adicionales para investigar la posible influencia sobre la supervivencia de la respuesta tumoral y el estado de metilación. Con un análisis de referencia que excluyó 16 pacientes que habían muerto antes del tiempo de referencia de cuatro meses, se descubrió que en los 99 pacientes restantes, la respuesta seguía siendo significativa para la supervivencia mejorada (cociente de riesgos instantáneos para pacientes sin respuesta, 2,16 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,29-3,61]; $P = 0,03$). El modelo de regresión de Cox de univariable mostró que sólo el estado de metilación de 14-3-3 σ , el estado funcional ECOG y la respuesta se correlacionaban significativamente con la supervivencia en estos 99 pacientes (proporciones de riesgo: estado de metilación de 14-3-3 σ negativo, 1,99 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,13-3,51; $P = 0,017$]; estado funcional de 1, 2,17 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,19-3,95; $P = 0,012$]; pacientes sin respuesta, 2,68 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,65-4,37; $P < 0,001$]). Además, un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox de multivariable que incluía la respuesta, el estado de metilación y el estado funcional y que también permitía sus interacciones de segundo orden, identificó el estado de metilación de 14-3-3 σ , el estado funcional ECOG y la respuesta en la referencia seleccionada de cuatro meses como factores de pronóstico independientes para la supervivencia (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de multivariable posterior al procedimiento por etapas (hacia delante y hacia atrás) en 99 pacientes con un tiempo de referencia de 4 meses.

	N. ° de pacientes	Cociente de riesgos instantáneos	P
Estado de 14-3-3σ			0,001
Positivo para metilación	36	1 referente	
Negativo para metilación	63	4,66 (1,83-11,84)	
Respuesta			0,001
Pacientes con respuesta	51	1 referente	
Pacientes sin respuesta	48	5,53 (2,03-15,02)	
Estado funcional ECOG			0,003
0	31	1 referente	
1	68	2,54 (1,38-4,70)	
Estado de 14-3-3σsegún la respuesta	99	0,21 (0,07-0,67)	0,009

Después, los pacientes se estratificaron según la respuesta y se ajustaron dos modelos de regresión de Cox distintos, ajustando el estado de metilación de 14-3-3 σ según el estado funcional. Se observó una diferencia significativa en el riesgo de muerte sólo en el grupo de pacientes con respuesta, donde el riesgo de muerte para pacientes con respuesta negativos para metilación de 14-3-3 σ fue de al menos cinco veces el de los pacientes con respuesta positivos para metilación (cociente de riesgos instantáneos = 4,87 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,88-12,61]; P = 0,001 mediante el modelo de Cox) (tabla 4).

Tabla 4. Correlación del estado de metilación de 14-3-3 σ , la respuesta y el estado funcional ECOG con la supervivencia, mediante análisis de multivariable estratificando en función de la respuesta cuando 14-3-3 σ se ajusta según el estado funcional ECOG en 99 pacientes tras establecer un tiempo de referencia de 4 meses.

	N. ° de pacientes	Cociente de riesgos instantáneos de pacientes con respuesta	P
Estado de 14-3-3σ			
Positivo para metilación	22	1 referente	0,001
Negativo para metilación	29	4,87 (1,88-12,61)	
Estado funcional ECOG			0,075
0	19	1 referente	
1	32	2,21 (0,92-5,28)	

(continuación)

	N. ° de pacientes	Cociente de riesgos instantáneos de pacientes sin respuesta	P
Estado de 14-3-3σ			
Positivo para metilación	14	1 referente	0,992
Negativo para metilación	34	0,99 (0,49-2,05)	
Estado funcional ECOG			0,018
0	12	1 referente	
1	36	2,93 (1,20-7,17)	

Las curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia de los pacientes con respuesta de acuerdo con el estado de metilación de 14-3-3 σ mostraron que no se ha alcanzado la media de supervivencia para 22 pacientes con respuesta positivos para metilación de 14-3-3 σ , mientras que para 29 pacientes con respuesta negativos para metilación de 14-3-3 σ , fue de 11,3 meses (intervalo de confianza del 95 por ciento, 9,0-13,5) (P = 0,001 mediante la prueba del orden logarítmico bilateral) (fig. 3B). La tasa de supervivencia a los 18 mese calculada es del 64 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 44-94 por ciento) para pacientes con respuesta positivos para metilación y del 21 por ciento (intervalo de confianza del 95 por ciento, 9-47 por ciento) (P = 0,017 mediante la prueba del orden logarítmico bilateral) para pacientes con respuesta negativos para metilación. Los pacientes con respuesta negativos para metilación mostraron un riesgo de muerte cuatro veces mayor que los pacientes con respuesta positivos para metilación (cociente de riesgos instantáneos = 3,95 [intervalo de confianza del 95 por ciento, 1,57-9,94]; P = 0,004 mediante el modelo de Cox).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> FUNDACION PARA LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN
- 5 <120> PROCEDIMIENTO PARA PREDECIR LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO DE QUIMIOTERAPIA CON CISPLATINO O CARBOPLATINO
- <160> 5
- 10 <210> 1
<211> 248
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<223> Exón 1 del gen 14-3-3 sigma
- 15 <400> 1
atggagagag ccagtctgat ccagaaggcc aagctggcag agcaggccga acgctatgag 60
gacatggcag ccttcattgaa aggcgccgtg gagaagggcg aggagctctc ctgcgaagag 120
cgaaacctgc tctcagtagc ctataagaac gtggtgggcg gccagagggc tgcctggagg 180
gtgctgtcca gtattgagca gaaaagcaac gaggagggct cggaggagaa ggggcccag 240
gtgcgtga 248
- <210> 2
- 20 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
- 25 <223> Cebador sentido específico para ADN metilado diseñado para amplificar ADN del gen 14-3-3 sigma
- <400> 2
gatattgtag tttttatgaa aggcgtcg 28
- 30 <210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220> ADN sintético
<223> Cebador antisentido específico para ADN metilado diseñado para amplificar ADN del gen 14-3-3 sigma
- 40 <400> 3
cctctaaccg cccaccacg 19
- <210> 4
<211> 30
- 45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220> ADN sintético
<223> Cebador sentido específico para ADN no metilado diseñado para amplificar ADN del gen 14-3-3 sigma
- 50

	<400> 4	
	gatatggtag tttttatgaa aggtgttgtg	30
	<210> 5	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> ADN sintético	
10	<223> Cebador antisentido específico para ADN no metilado diseñado para amplificar AND del gen 14-3-3 sigma	
	<400> 5	
	ccctctaacc acccaccaca	20
15		

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para predecir la supervivencia de un paciente que padece CPNM a un tratamiento de quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino y proporcionar una respuesta completa o parcial a la quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de determinar el estado de metilación de un ácido nucleico que codifica 14-3-3 sigma en una muestra biológica del paciente, en el que la presencia de metilación es indicativa de una mayor supervivencia de dicho paciente como una respuesta a dicho tratamiento de quimioterapia.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el estado de metilación del ácido nucleico se determina en la región reguladora del ácido nucleico.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que región reguladora es la región promotora o el exón 1 del gen 14-3-3 sigma.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que el estado de metilación del ácido nucleico se determina en la región entre los dinucleótidos de CpG 3 y 9 dentro del gen 14-3-3 sigma.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la muestra biológica es una muestra de tumor del paciente.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la muestra biológica es una muestra de suero del paciente.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino se selecciona de entre cisplatino o carboplatino como agentes únicos o una combinación seleccionada de entre cisplatino/paclitaxel, cisplatino/gemcitabina, cisplatino/docetaxel y carboplatino/paclitaxel.
8. Procedimiento para diseñar un tratamiento de quimioterapia individual a base de cisplatino o carboplatino para un sujeto que padece CPNM y proporcionar una respuesta completa o parcial a la quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino, comprendiendo dicho procedimiento:
 - i) determinar el estado de metilación de un ácido nucleico que codifica 14-3-3 sigma en una muestra biológica del paciente;
 - ii) tener en cuenta los datos obtenidos en la etapa anterior para diseñar un tratamiento de quimioterapia individual, de manera que la presencia de metilación es indicativa de la predisposición del paciente a tener un tiempo de supervivencia mayor con un tratamiento de quimioterapia que comprende cisplatino o carboplatino.
9. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 u 8 en el que la muestra es una muestra de sangre.
10. Uso de un kit que comprende un primer recipiente que contiene un reactivo que modifica citosina no metilada y un segundo recipiente que contiene cebadores para la amplificación de un ácido nucleico del gen 14-3-3 sigma que contiene CpG, en el que los cebadores distinguen entre ácido nucleico no metilado y metilado modificado, para predecir la supervivencia a un tratamiento de quimioterapia a base de cisplatino o carboplatino de un paciente con CPNM.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los cebadores usados en el kit pertenecen a la región promotora de 14-3-3σ.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los cebadores usados en el kit pertenecen a la región entre los dinucleótidos de CpG 3 y 9 dentro del gen 14-3-3σ.
13. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 12 en el que el reactivo que modifica citosina no metilada es bisulfito.

FIGURA 1

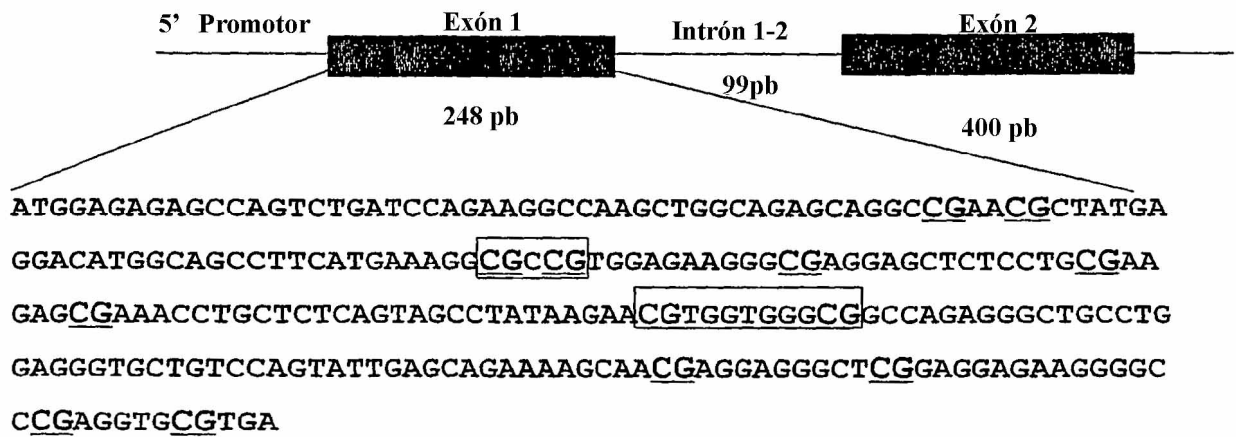


FIGURA 2

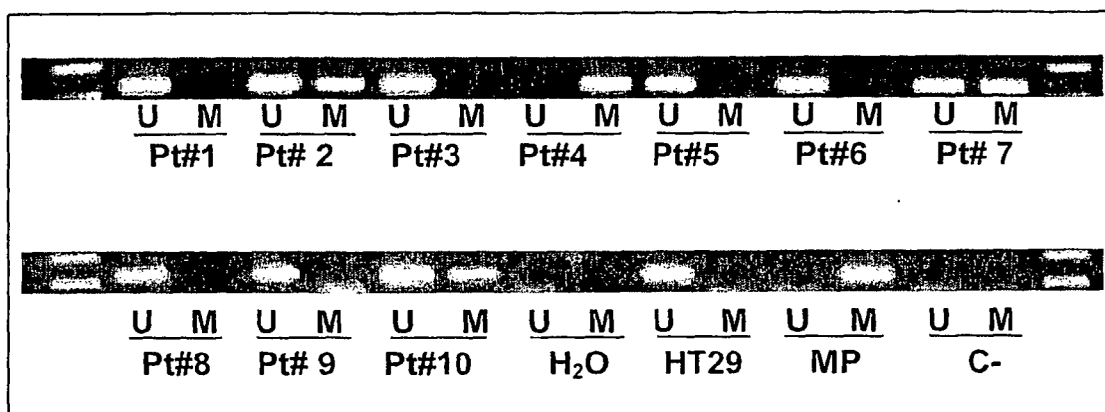
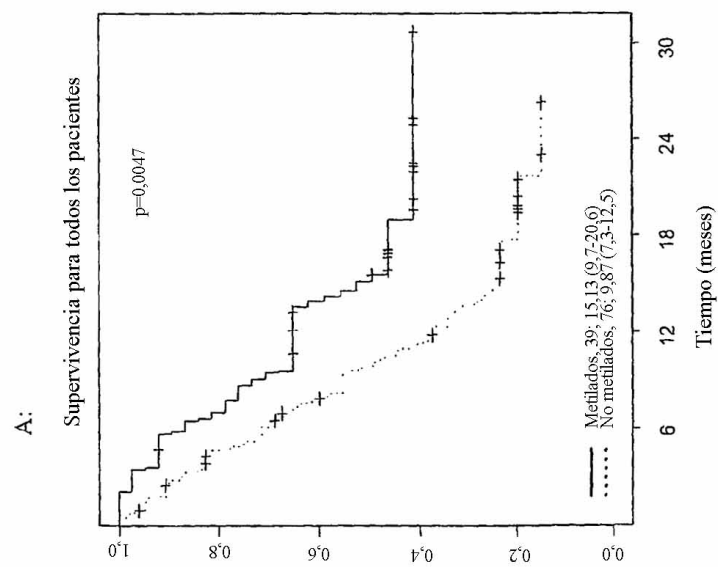
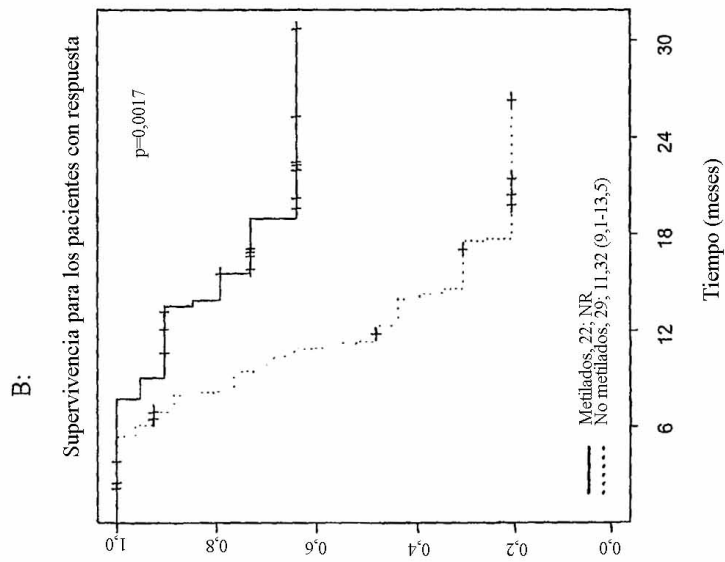


FIGURA 3



Meses	0	6	12	18
Negativo para metilación				
Pacientes en riesgo	76	50	23	10
Punto calculado		0,70	0,36	0,20
95 % IC		(0,60-0,81)	(0,26-0,49)	(0,12-0,32)
Acontecimientos acumulativos		22	45	55
Positivo para metilación				
Pacientes en riesgo	39	32	20	8
Punto calculado		0,87	0,62	0,41
95 % IC		(0,77-0,98)	(0,48-0,80)	(0,27-0,63)
Acontecimientos acumulativos		5	14	20



Meses	0	6	12	18
Negativo para metilación				
Pacientes en riesgo	29	25	10	18
Punto calculado		0,93	0,44	0,21
95 % IC		(0,83-1)	(0,28-0,69)	(0,09-0,47)
Acontecimientos acumulativos		2	14	19
Positivo para metilación				
Pacientes en riesgo	22	20	15	7
Punto calculado		0,95	0,85	0,64
95 % IC		(0,87-1)	(0,70-1)	(0,44-0,94)
Acontecimientos acumulativos		1	3	6