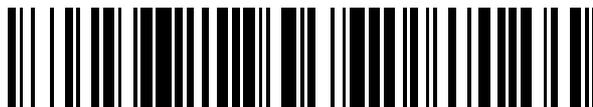


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 709**

21 Número de solicitud: 201130863

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**26.05.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.12.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

**27.12.2012**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
LA PAZ (33.3%)**

**Paseo de la Castellana 261**

**28046 Madrid, ES;**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (33.3%) y**

**EMPRESA PÚBLICA HOSPITAL DEL NORTE  
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**CEJAS GUERRERO, Paloma;**

**FELIU BATLLE, Jaime;**

**DE CASTRO CARPEÑO, Javier;**

**BELDA INIESTA, Cristóbal;**

**MORENO GARCÍA, Víctor;**

**BURGOS LIZALDE, Emilio;**

**SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, José Javier y**

**CASADO SÁENZ, Enrique**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **HUELLA GENÓMICA PARA LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CLÍNICA A TERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL.**

57 Resumen:

La presente invención se relaciona con un método in vitro para predecir la respuesta clínica de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal a una terapia antitumoral o para identificar a un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal con baja probabilidad de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral, preferiblemente una terapia antitumoral neoadyuvante, que comprende la detección de los niveles de expresión de una huella genómica formada por seis genes. Asimismo, la invención también se relaciona con kits para poner en práctica dicho método.

ES 2 393 709 A1

**DESCRIPCIÓN**

**HUELLA GENÓMICA PARA LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA CLÍNICA A TERAPIA ANTITUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL**

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal a una terapia antitumoral o para identificar a un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal con baja probabilidad  
10 de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral, preferiblemente una terapia antitumoral neoadyuvante.

**ANTECEDENTES**

15 El cáncer de intestino grueso es el tercer tumor maligno más frecuente en el mundo occidental, después del cáncer de pulmón y mama, representando el 10% de todos los cánceres y ocasionando el 10% de la mortalidad secundaria a cáncer. Aproximadamente un tercio de los cánceres de intestino grueso se forman en el recto, y la mayoría de estos se diagnostican como cánceres de recto localmente avanzados (CRLAs).

20

En el CRLA el desarrollo de la Excisión Total del Mesorrecto (ETM) y de estrategias preoperatorias con quimioterapia y radioterapia ha mejorado notablemente la supervivencia global, el control local y probablemente la tasa de procedimientos que preservan el esfínter anal. Además, de esta forma, se ha mitigado la toxicidad de la  
25 quimiorradioterapia (QRT).

De acuerdo a los datos de ensayos clínicos aleatorizados antiguos y recientes, el tratamiento combinado preoperatorio con QRT ha extendido la supervivencia global a los 5 años desde un 45% con cirugía convencional (Douglass, H.O., *et al.* 1986, N.Engl.J Med., 315: 1294-1295; Tveit, K.M., *et al.* 1997 Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group, Br.J Surg., 84: 1130-1135), a un 66-76% con QRT preoperatoria, y las recidivas locales han disminuido desde un 30-50% a un 6-8%. Sin embargo, un  
30 tercio de los pacientes desarrollará metástasis a distancia, que son responsables de la

elevada mortalidad (Sauer, R., *et al.* 2004 N.Engl.J.Med., 351: 1731-1740; Bosset, J.F., *et al.* 2006 N.Engl.J Med., 355: 1114-1123).

Además, un número importante de enfermos sufre considerables efectos adversos asociados a la QRT sin beneficio alguno. De forma opuesta, otros pacientes pueden ser infra-tratados. Así, resulta de enorme interés identificar las potenciales dianas involucradas en la resistencia a la QRT e identificar a los pacientes que recaerán y que pueden ser subsidiarios de tratamientos más intensivos.

La selección del tratamiento QRT para cada caso individual de adenocarcinoma de recto depende de variables clínicas y patológicas que resultan incapaces de predecir la eficacia terapéutica. Estrategias dirigidas, individuales, que correlacionan biomarcadores basales concretos con la respuesta al tratamiento QRT preoperatorio han mostrado marcadores de interés, incluyendo las mutaciones en p53 (Kandioler, D. *et al.*, 2002. Ann.Surg., 235:493-498; Rebischung, C., *et al.* 2002, Int. J Cancer, 100: 131-135), expresión de timidilato sintetasa (Johnston, P.G., *et al.* 1994, J Clin Oncol, 12: 2640-2647; Edler, D. *et al.*, 2000, Clin Cancer Res. 6:1378-1384), p21 (Reerink, O., *et al.* 2004, Anticancer Res., 24:1217-1221; Qiu, H., *et al.* 2000, Dis. Colon Rectum, 43: 451-459; Fu, C.G., *et al.* 1998, Dis. Colon Rectum, 41: 68-74; Rau, B., *et al.* 2003, J Clin Oncol, 21: 3391-3401), EGFR (Milas, L., *et al.* 2004, Int. J Radiat.Oncol.Biol.Phys., 58: 966-971), COX 2 (Smith, F.M., *et al.* 2006, Int. J Radiat.Oncol.Biol.Phys., 64: 466-472; Min, B.S., *et al.* 2008, Arch Surg, 143: 1091-1097), índice de apoptosis espontánea (Rodel,C., *et al.* 2002, Int. J Radiat.Oncol Biol.Phys., 52: 294-303; Abe,T., *et al.* 2001, Anticancer Res., 21: 2115-2120) o el CEA (Park, Y.A., *et al.* 2006, J Surg.Oncol, 93: 145-150). Sin embargo, ninguna de ellas ha demostrado claramente su utilidad predictiva en clínica.

Por otra parte, existen pocos trabajos que estudien la expresión de colecciones de genes en series significativas de pacientes antes del tratamiento QRT preoperatorio.

30

Ghadimi, B.M. *et al.*, 2005 (J Clin Oncol, Vol. 23(9): 1826-38) describe la evaluación con microarrays de una muestra de 23 tumores de recto procedentes del ensayo alemán CAO/ARO/AIO-94, en el que los pacientes recibieron fluorouracilo y

radioterapia antes de la cirugía. En este estudio se generó un algoritmo predictivo de respuesta a la QRT preoperatoria de 54 genes, que fueron posteriormente validados en otra muestra de siete pacientes.

- 5 Watanabe, T., *et al.*, 2006 (Cancer Res, vol. 66(7): 3370-3374) describe un perfil de expresión genético de 33 genes útil para predecir la sensibilidad de células de cáncer de recto en respuesta a la radioterapia preoperatoria.

- Kim, I.J., *et al.*, 2007 (Dis Colon Rectum, Vol. 50(9): 1342-53) describe un perfil de  
10 expresión génica compuesto por 95 genes analizados mediante microarrays, que permiten predecir si la respuesta a la QRT preoperatoria en pacientes con cáncer rectal avanzado será parcial o completa.

- La solicitud de patente internacional WO2009/071720, a nombre de Universidad  
15 Autónoma de Madrid, describe un perfil de 13 genes que permite predecir la respuesta a una terapia, monitorizar el efecto de dicha terapia o pronosticar la evolución del paciente tras la administración de la terapia en sujetos diagnosticados de adenocarcinoma colorrectal.

- 20 Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar una huella genómica alternativa a las ya existentes, que permita pronosticar con fiabilidad la respuesta de un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal a la terapia neoadyuvante administrada en el tratamiento de dicho cáncer, previamente a la administración de dicha terapia. Del mismo modo, dicha huella genómica podría ser también útil para  
25 pronosticar la respuesta de un sujeto diagnosticado con cáncer colorrectal a la terapia adyuvante administrada en el tratamiento de dicho cáncer.

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

- 30 En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para predecir la respuesta clínica a una terapia antitumoral en un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal o para la identificación de un paciente diagnosticado de cáncer

colorrectal que presenta baja probabilidad de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral que comprende

- 5 (i) determinar los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- (ii) calcular un factor predictivo en base a los niveles de expresión de dichos genes y
- 10 (iii) comparar el valor del factor predictivo obtenido en la etapa (ii) con un valor de referencia

en donde una alteración del valor del factor predictivo con respecto al valor de referencia es indicativa de una peor respuesta clínica a la terapia antitumoral o de que el paciente tiene una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a una terapia antitumoral que comprende reactivos adecuados para la detección de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*.

20

Por último, en otro aspecto, la invención también se relaciona con el uso de dicho kit para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a una terapia antitumoral.

## 25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra la supervivencia global en función de la expresión de los 6 genes (*ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*) en pacientes con adenocarcinoma rectal tras el tratamiento con quimiorradioterapia. Como punto de corte se ha utilizado el valor de la mediana: 0.8. Aquellos pacientes con tumores que

30 presentan un resultado  $>0.8$  de expresión global de los 6 genes, calculada mediante el análisis factorial, presentan una probabilidad de supervivencia global a los 50 meses del

50% comparado con aquellos pacientes con resultado  $\leq 0.8$  cuya probabilidad de supervivencia a los 50 meses es del 85%.

La figura 2 muestra la clasificación de los pacientes estudiados en función del grado de respuesta tumoral obtenida a partir del análisis del perfil de los 6 genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*. Se observa en el diagrama de cajas como con la expresión de los 6 genes se obtiene una puntuación que se correlaciona de forma significativa con el grado de respuesta tumoral (no respuesta vs. buena vs. respuesta completa), de forma que a mayor puntuación mayor es la probabilidad de obtener una mejor respuesta. Los asteriscos (\*) y círculos (°) de la figura corresponden a valores atípicos.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La selección del tratamiento quimioterapéutico para cada caso individual de cáncer colorrectal depende de variables clínicas y patológicas que resultan incapaces de predecir la eficacia terapéutica de un tratamiento o de pronosticar la evolución de un paciente que sufre dicho tipo de cáncer.

Los autores de la presente invención han identificado un conjunto de 6 genes cuya cuantificación de la expresión respecto a un valor de referencia permite, sorprendentemente, predecir la mejor o peor respuesta de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal a la administración de una terapia e identificar a un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal que presenta baja probabilidad de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral. De este modo, se puede seleccionar a aquellos pacientes que no se beneficiarán de una terapia neoadyuvante y que son candidatos a la resección directa del tumor; o a aquellos pacientes que no van a responder a una terapia adyuvante para evitar toxicidades innecesarias

## MÉTODO PREDICTIVO DE LA INVENCIÓN

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral en un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal o para la identificación de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal que presenta baja probabilidad de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral que comprende

- (i) determinar los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- (ii) calcular un factor predictivo en base a los niveles de expresión de dichos genes y
- (iii) comparar el valor del factor predictivo obtenido en la etapa (ii) con un valor de referencia

en donde una alteración del valor del factor predictivo con respecto al valor de referencia es indicativa de una peor respuesta clínica a la terapia antitumoral o de que el paciente tiene una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral.

- 5 El término “predicción”, tal como aquí se utiliza, se refiere a la determinación de la probabilidad de que el paciente que sufre de cáncer colorrectal responda favorable o desfavorablemente a una terapia antitumoral. Especialmente, el término “predicción”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la valoración individual de la supervivencia global esperada de un paciente que sufre de cáncer  
10 colorrectal si se trata con una terapia antitumoral.

En la presente invención se entiende por “respuesta clínica” la respuesta de un paciente que sufre de cáncer colorrectal a una terapia antitumoral. Para evaluar la respuesta a la terapia antitumoral puede utilizarse el sistema propuesto por Dworak  
15 (Dworak, O. *et al.*, 1997 Int J Colorectal Dis., 12: 19-23) que clasifica la respuesta basándose en el grado de respuesta tumoral (GRT) en tres grupos: no respuesta tumoral (GRT 0 y 1), buena respuesta tumoral (GRT 2 y 3) y respuesta tumoral completa (GRT 4). El término “respuesta”, tal como se usa en el presente documento, puede ser una respuesta tumoral completa, en la que no hay células  
20 tumorales viables; o bien una buena respuesta tumoral, en la que se produce una regresión mayor del 25% de la masa tumoral con al menos algunas células tumorales viables. La “no-respuesta” se define como la no-regresión o la regresión de menos del 25% de la masa tumoral. Los pacientes que consiguen una buena respuesta o una respuesta completa se consideran como respondedores, y el resto de pacientes como  
25 no-respondedores.

Para determinar la respuesta al tratamiento antes de la administración de la terapia puede utilizarse cualquier otro parámetro ampliamente aceptado para comparar la eficacia de tratamientos alternativos. Dichos parámetros incluyen, sin limitación:

30

- riesgo de recaída que, tal como se usa en el presente documento, se entiende como la probabilidad de un paciente de volver a desarrollar cáncer colorrectal tras un período libre de enfermedad.

- supervivencia global que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de pacientes que sobreviven, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, al cabo de un período de tiempo definido.

5

-muerte por enfermedad que, tal como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de pacientes que fallecen como consecuencia de la enfermedad, desde el momento del diagnóstico o tratamiento, al cabo de un período de tiempo definido.

10 En una realización de la invención el parámetro que se utiliza para determinar la respuesta clínica se selecciona de riesgo de recaída, supervivencia global y muerte por enfermedad.

En una realización particular de la invención el parámetro que se utiliza para  
15 determinar la respuesta clínica es la supervivencia global.

En la presente invención se entiende por “paciente” cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, vacas,  
20 caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el paciente es un ser humano de sexo femenino o masculino y de cualquier raza o edad. En el contexto de la presente invención, el paciente es un paciente que sufre de cáncer colorrectal o que ha sido previamente diagnosticado de cáncer colorrectal.

25 El término “cáncer colorrectal”, tal como aquí se utiliza, se refiere a cualquier tipo de cáncer colorrectal, es decir, a cualquier neoplasia del colon, recto o apéndice. En una realización particular, el cáncer colorrectal es adenocarcinoma colorrectal, más preferiblemente adenocarcinoma de recto.

30 Una vez diagnosticado el cáncer colorrectal, se llevan a cabo pruebas para determinar su estadificación, es decir, para evaluar la extensión del cáncer y si éste se ha propagado a otras partes del organismo. La estadificación del cáncer requiere una combinación de exámenes físicos, colonoscopia, ultrasonidos, radiografías, etc. Los

hallazgos obtenidos mediante estos procedimientos permiten asignar un estadio específico al tumor. Existen diferentes sistemas de estadiaje del cáncer colorrectal, entre los que se incluyen la estadificación de Dukes, la de Astler-Coller, y la más habitual, la clasificación TNM. El método de la invención puede aplicarse a cualquier estadio de cáncer colorrectal. No obstante, en una realización particular, el 5 cáncer colorrectal es un cáncer en estadios II o III, más preferiblemente en estadios T2N1 o T3N0.

En la terapia del cáncer colorrectal se pueden utilizar una variedad de tratamientos 10 para intentar eliminar o contener el cáncer. Dependiendo de la salud del paciente, así como del tamaño, sitio y etapa del cáncer, se puede utilizar (i) cirugía, que consiste en eliminar la parte del colon o del recto que contiene cáncer, junto con una porción del tejido sano que está a su alrededor, (ii) tratamientos citotóxicos/citostáticos, tales como quimioterapia, que utiliza medicamentos contra el cáncer para destruir las 15 células cancerosas al hacer circular los medicamentos por el cuerpo a través de las vías sanguíneas; radioterapia, en donde se emplean radiaciones de alta energía para matar las células cancerosas, y agentes antitumorales; y/o (iii) inmunoterapia, en donde el compuesto administrado estimula, realza o repara la función natural del sistema inmunológico contra el cáncer para reconocer y eliminar las células 20 cancerosas del cuerpo.

Como se ha explicado previamente, el método de la invención permite al experto en la materia predecir la respuesta clínica de un paciente que sufre de cáncer colorrectal a una terapia antitumoral. El término “terapia antitumoral” incluye tanto la terapia 25 antitumoral neoadyuvante como la terapia antitumoral adyuvante.

En la presente invención, se entiende por “terapia antitumoral neoadyuvante” a una terapia antitumoral administrada como primer paso para reducir el tamaño del tumor antes del tratamiento principal, que generalmente consiste en cirugía. La terapia 30 antitumoral neoadyuvante puede incluir quimioterapia, radioterapia, agentes antitumorales, inmunoterapia o combinaciones de las mismas.

Por tanto, en una realización particular, la terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante, preferiblemente es un tratamiento citotóxico y/o citostático que, en otra realización todavía más particular, se selecciona del grupo de quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia.

5

En la presente invención se entiende por “terapia antitumoral adyuvante” a una terapia antitumoral adicional administrada después del tratamiento principal para disminuir el riesgo de recurrencia. En general engloba a toda la terapia que se usa en conjunción con la cirugía con el objetivo de reducir la supervivencia de micrometástasis tras dicha cirugía. La terapia antitumoral adyuvante puede incluir quimioterapia, radioterapia, agentes antitumorales, inmunoterapia o combinaciones de las mismas.

El término “terapia antitumoral” incluye tanto terapia local como sistémica. La “terapia antitumoral local” afecta únicamente a las células de un tumor y al área cercana al mismo, como es el caso de la radioterapia; mientras que la “terapia antitumoral sistémica” utiliza sustancias que viajan por la corriente sanguínea y que alcanzan y afectan a las células de todo el cuerpo, como la quimioterapia, los agentes antitumorales y la inmunoterapia.

20 En una realización preferida de la invención la terapia antitumoral es terapia antitumoral sistémica.

Los agentes quimioterápicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes tales como, por ejemplo, ciclofosfamida, carmustina, daunorubicina, mecloretamina, clorambucilo, nimustina, melfalán y similares; antraciclinas, tales como, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, valrubicina y similares; compuestos de taxano, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y similares; inhibidores de la topoisomerasa tales como, por ejemplo, etopóxido, tenipóxido, tulipóxido, irinotecán y similares; análogos de nucleótidos tales como, por ejemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina, ftorafur (tegafur/uracilo) y similares; agentes de base de platino tales como, por ejemplo, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y similares;

agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, vincristina, leucovorina (o ácido folínico), lomustina, procarbazona y similares; moduladores hormonales tales como, por ejemplo, tamoxifeno, finasterida, inhibidores de la 5- $\alpha$ -reductasa y similares; alcaloides de la vinca tales como, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina y similares. Los agentes quimioterápicos adecuados se describen con más detalle en la bibliografía, tal como en The Merck Index en CD-ROM, 13<sup>a</sup> edición.

Estos agentes quimioterápicos pueden administrarse aisladamente o formando combinaciones en esquemas conocidos en la práctica clínica como FOLFOX (oxaliplatino-leucovorina-fluorouracilo), FOLFIRI (leucovorina-5-fluorouracilo-irinotecán), XELOX (capecitabina-oxaliplatino) o XELIRI (capecitabina-irinotecán). A estos esquemas se les pueden añadir agentes inmunoterápicos como bevacizumab o cetuximab.

En una realización particular del método de la invención, la terapia antitumoral se selecciona de 5-fluorouracilo, irinotecán, oxaliplatino, UFT-LV (tegafur/uracilo-leucovorina), radioterapia y combinaciones de los mismos, más preferiblemente dicha terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante.

En la presente invención se entiende por “agentes antitumorales” aquellos compuestos o agentes químicos, físicos o biológicos con propiedades antiproliferativas, antioncogénicas y/o carcinostáticas que pueden emplearse para inhibir el crecimiento, la proliferación y/o el desarrollo de tumores. Ejemplos de agentes antitumorales que pueden emplearse en la presente invención son (i) antimetabolitos, tales como antifolatos y análogos de purina; (ii) productos naturales, tales como antibióticos antitumorales e inhibidores mitóticos; (iii) hormonas y antagonistas de las mismas, tales como andrógenos y corticosteroides; y (iv) agentes biológicos, como vectores virales. Una relación de compuestos que pueden emplearse como agentes antitumorales se describe en la solicitud de patente WO2005/112973.

En la presente invención se entiende por “inmunoterapia” todas aquellas terapias dirigidas a estimular la respuesta inmune, que incluyen (i) la inmunoterapia activa, tal como la utilización de fármacos que aumentan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria del organismo, por ejemplo, la interleuquina 2, el factor de necrosis tumoral o el interferón; y (ii) la inmunoterapia pasiva, que incluye anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales como bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, panitumumab o erlotinib.

En la presente invención se entiende por “baja probabilidad de responder a un tratamiento” como la probabilidad de que el paciente muestre una respuesta desfavorable a la terapia antitumoral. Esta respuesta desfavorable puede incluir, pero no se limita a, persistencia o incremento de los síntomas, aumento de la duración de la enfermedad, estado patológico no estabilizado (específicamente deteriorado), progresión de la enfermedad, empeoramiento del estado patológico y recurrencia (tanto local como distante), tanto detectable como no detectable. También puede incluir la disminución de la supervivencia, comparado con la supervivencia esperada si no se aplica el tratamiento.

La primera etapa del método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una muestra del paciente en estudio antes de la administración de la terapia.

El término “muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra biológica que puede obtenerse de un paciente. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen muestras de biopsia, tejido, célula o fluido (sangre, suero, plasma, saliva, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, heces, orina, lágrimas, moco, sudor, leche, extractos cerebrales y similares). En una realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de tejido tumoral, más preferiblemente una muestra de tejido tumoral colorrectal de un paciente que sufre cáncer colorrectal. Dicha muestra puede obtenerse por métodos convencionales, tales como biopsia, usando procedimientos conocidos en el estado de la técnica por el experto en la ciencia

médica. Métodos para obtener la muestra de la biopsia incluyen la resección quirúrgica de una masa de tejido o la microdissección u otros métodos de separación celular conocidos. Las células tumorales pueden obtenerse adicionalmente por citología de aspiración mediante la punción con una aguja fina conectada a una  
5 jeringa. Para simplificar la conservación y la manipulación de las muestras, éstas pueden fijarse en formalina y embeberse en parafina, o congelarse primero y después embeberse en un medio criosolidificable, tal como OCT-Compound, a través de la inmersión en un medio altamente criogénico que permita la congelación rápida.

10 La cuantificación de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* puede realizarse a partir del ARN mensajero resultante de la transcripción de dichos genes (ARNm) o de un fragmento de dicho ARNm. Alternativamente, la cuantificación del nivel de expresión de dichos genes también puede realizarse a partir de su ADN complementario (ADNc) o de un  
15 fragmento de dichos ADNc. En una realización particular de la presente invención, la determinación de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* se lleva a cabo mediante la medida de los niveles del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes.

20 Para medir los niveles de ARNm de los genes de la invención, la muestra biológica puede tratarse físicamente o mecánicamente para disrupcionar el tejido o las estructuras celulares y liberar los componentes intracelulares a una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para un posterior análisis. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra por procedimientos conocidos por el experto en la  
25 materia y comercialmente disponibles. El ARN se extrae posteriormente de las muestras congeladas o frescas por cualquiera de los métodos habituales, por ejemplo, los descritos en Sambrook, J., *et al.*, 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, debe evitarse la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

30

El nivel de expresión puede determinarse usando ARNm obtenido de una muestra de tejido fijada en formalina y embebida en parafina. El ARNm puede aislarse de una muestra patológica almacenada o de una muestra de biopsia que primero se desparafina.

Un método para desparafinar la muestra es lavar la muestra parafinada con un disolvente orgánico, tal como xileno. Las muestras desparafinadas pueden rehidratarse con una solución acuosa de un alcohol inferior. Alcoholes inferiores adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, propanoles y butanoles. Las muestras  
 5 desparafinadas pueden rehidratarse, por ejemplo, mediante sucesivos lavados con soluciones alcohólicas de alcoholes inferiores de concentración decreciente. Alternativamente, la muestra puede desparafinarse y rehidratarse simultáneamente. Después la muestra se lisa y se extrae el ARN. También puede obtenerse ARN de muestras de tejido tumoral fresco.

10

Técnicas adecuadas que pueden utilizarse en la presente invención para estudiar el perfil de expresión génica son, por ejemplo, RT-PCR, SAGE, Taqman o microarrays. Los niveles de expresión del ARNm pueden determinarse mediante transcripción inversa (RT) del ARNm seguida de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa  
 15 (PCR) y cuantificación del producto de la amplificación del ADNc. En una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles del ARNm de los genes de interés se realiza mediante una PCR cuantitativa múltiple. La detección puede realizarse en muestras individuales o en microarrays de tejidos.

20 El experto en la materia apreciará que el método de la invención puede ponerse en práctica usando tanto niveles absolutos de expresión de los genes como niveles relativos. Así, en la presente invención, la expresión “niveles de expresión” se usa para referirse tanto a niveles absolutos como a niveles relativos de expresión de un ARNm.

25 La expresión “niveles absolutos de expresión” se refiere a la cantidad de ARNm de interés total que aparece en una muestra. Dicho valor puede venir dado por la concentración de ARNm, expresada en unidades de masa de ARNm por unidad de volumen (p. ej. en ng/ml de muestra), en número de moléculas de ARN por unidad de volumen (p.ej., en pmol ARN /ml de muestra), en unidades de masa de ARNm por  
 30 unidad de masa de ARN total (pg ARNm específico / mg de ARN total) o en número de moléculas de ARN por unidad de masa de ARNm total (p.ej., en pmol ARN / mg de ARN total).

La expresión “niveles relativos de expresión” se refiere a la relación entre los niveles de expresión del ARNm objeto de estudio y de un ARNm de referencia, es decir, se define la concentración de ARNm de forma normalizada con respecto a dicho ARNm de referencia.

5

Para normalizar los valores de expresión de ARNm entre las diferentes muestras es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras a analizar con la expresión de un ARN control. Como “ARN control” en la presente invención se entiende ARN cuyos niveles de expresión no cambian o cambian sólo en cantidades limitadas en las células tumorales con respecto a células no-tumorales. Preferiblemente, el ARN control es ARNm derivado de genes que se expresan de manera constitutiva, que son aquellos que siempre están activos o que se transcriben de manera constante, y que codifican para proteínas que están constitutivamente expresadas y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Genes constitutivos preferidos que pueden utilizarse en la presente invención incluyen  $\beta$ -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosomal 18-S, ciclofilina, GAPDH, PSMB4 y actina. En una realización preferida, el ARN control es ARNm de los genes GAPDH, B2M y/o PSMB4.

20 En una realización de la invención, la cuantificación de la expresión génica relativa se calcula según el método Ct comparativo usando GAPDH, B2M y PSMB4 como control endógeno y controles de ARN comercial como calibradores. Los resultados finales se determinan según la fórmula  $2^{-(\Delta\text{Ct de la muestra} - \Delta\text{Ct del calibrador})}$ , donde los valores  $\Delta\text{CT}$  del calibrador y de la muestra se calculan restando el valor CT del gen en estudio del valor del gen control. El resultado final obtenido para cada gen en esta etapa es un valor absoluto de expresión.

El perfil génico cuya expresión se analiza en el método de la presente invención está formado por 6 genes: *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*.

30

El gen *ALOX15* (UniGene Hs.73809) codifica para la enzima lipooxigenasa 15 (Seiler, A., *et al.* 2008, Cell Metab, 8: 237-48); el gen *CTNNB1* (UniGene Hs.476018) codifica para la proteína beta-catenina (Fodde, R., *et al.* 2001, Nat Rev

Cancer, 1: 55-67); el gen *MAPK14* (UniGene Hs.485233) codifica para la enzima proteína quinasa 14 activada por mitógeno, también conocida como MAP quinasa p38 (Fang, J.Y., Richardson, B.C. 2005, Lancet Oncol, 6: 322-7); el gen *NOS2A* o *NOS2* (UniGene Hs.709191) codifica para la proteína óxido nítrico sintasa 2  
5 inducible (Cook, T., *et al.* 2004, Cancer Res, 64: 8015-21); el gen *PTGES2* (UniGene Hs.495219) codifica para la proteína prostaglandina E sintasa 2 (Hull, M.A. *et al.* 2004, Mol Cancer Ther, 3: 1031-9); y el gen *PTGS2*, también conocido como *COX-2* (UniGene Hs.196384), codifica para el enzima prostaglandina endoperóxido sintasa 2 (o ciclooxigenasa 2) (Greenhough, A., *et al.* 2009,  
10 Carcinogenesis, 30: 377-86).

El experto en la materia entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de dichos genes no afectan a la detección de la expresión de los mismos y, por lo tanto, las variantes de estos genes generadas por mutaciones de su secuencia de  
15 nucleótidos caen dentro del ámbito de la presente invención.

Una vez que se ha determinado un valor de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNBN1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una muestra, la etapa (ii) de la invención consiste en calcular un factor predictivo en base a los niveles de expresión  
20 de dichos genes.

En la presente invención se entiende por “factor predictivo” o “factor pronóstico” a un factor que se obtiene del conjunto de los valores de expresión de los seis genes. Este factor predictivo o pronóstico puede calcularse mediante la suma de los valores  
25 de expresión obtenidos para cada gen en la etapa (i). Opcionalmente, los valores de expresión obtenidos para cada gen en la etapa (i) pueden corregirse mediante un coeficiente de corrección y calcular, posteriormente, una puntuación resultante del conjunto de los seis genes. Los métodos estadísticos para calcular dichos coeficientes de corrección son conocidos por el experto en la materia. En uno de los métodos  
30 estadísticos que puede utilizarse en la invención se usa el análisis factorial, mediante el que se generan 3 componentes para cada gen, asignándose a cada componente un coeficiente de corrección. El valor absoluto de expresión obtenido para cada gen en la etapa (i) puede multiplicarse por cada uno de los tres coeficientes de corrección.

La suma de los valores corregidos obtenidos para cada uno de los genes en el componente 1 genera el factor 1. Para obtener el factor 2 se suman los valores corregidos para cada uno de los genes en el componente 2. Y, finalmente, la suma de los valores corregidos de cada uno de los genes en el componente 3 genera el factor 3. Dichos factores pueden combinarse mediante la siguiente fórmula para obtener el factor predictivo o pronóstico (puntuación) del conjunto de los 6 genes.

Factor predictivo o pronóstico (puntuación) = raíz cuadrada (factor 1<sup>2</sup> + factor 2<sup>2</sup> + factor 3<sup>2</sup>)

10

En una realización preferida de la invención el factor predictivo o pronóstico se calcula mediante la suma de los niveles de expresión de los genes, opcionalmente corregidos usando un coeficiente para cada gen.

15 Finalmente, la etapa (iii) de la invención consiste en comparar el valor del factor predictivo obtenido en la etapa (ii) con un valor de referencia. La colección de muestras de las que deriva el valor de referencia está constituida preferiblemente por pacientes que sufren el mismo tipo de cáncer, es decir, cáncer colorrectal, o una mezcla de tejidos colorrectales de individuos normales no afectados de cáncer colorrectal.

25 El valor de referencia puede determinarse mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo, determinando la media de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* medidos en tejido tumoral procedente de muestras de biopsias de pacientes que sufren de cáncer colorrectal que responden o no a la terapia antitumoral, o en tejido colorrectal normal. Alternativamente, el valor de referencia podría corresponder al valor de la media de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* medidos en una muestra de ARN obtenida mezclando 30 cantidades iguales de ARN de cada una de las muestras tumorales obtenidas de biopsias de los pacientes que sufren cáncer colorrectal y que responden o no a una terapia antitumoral. El valor de referencia también puede obtenerse de genes que se expresan de forma constitutiva procedentes del mismo paciente.

En una realización preferida de la invención el valor de referencia se calcula a partir de los valores de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una población de muestras de pacientes que no responden a la  
5 terapia antitumoral, más preferiblemente el valor de referencia es la media de estos valores.

Una vez establecido el valor de referencia, el valor del factor predictivo obtenido en la etapa (ii) puede compararse con este valor de referencia y, por lo tanto, permite  
10 detectar alteraciones en el valor del factor predictivo con respecto al valor de referencia.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “alteración del valor del factor predictivo con respecto al valor de referencia” cualquier variación del factor  
15 predictivo por encima o por debajo del valor de referencia. Una variación del factor predictivo por encima del valor de referencia puede ser de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más comparado con el valor de referencia. Por otra parte, una variación del factor predictivo por debajo del valor de referencia  
20 puede ser de al menos 0,9 veces, 0,75 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,02 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos comparado con el valor de referencia.

Una vez que se ha realizado dicha comparación, el método de la invención permite  
25 hacer una predicción de si el paciente mostrará una mejor o peor respuesta a la terapia antitumoral. Más concretamente, en el método de la invención una alteración del valor del factor predictivo con respecto al valor del factor de referencia es indicativa de una peor respuesta a la terapia antitumoral o de que el paciente tiene una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral.

30

En una realización particular, cuando el valor del factor predictivo es superior al valor de referencia, es indicativo de una mejor respuesta clínica a la terapia antitumoral. En otra realización de la invención, cuando el valor del factor predictivo

es superior al valor de referencia, es indicativo de una peor respuesta clínica a la terapia antitumoral.

En otra realización de la invención, cuando el valor del factor predictivo es inferior a  
5 la media de los pacientes no-respondedores, es indicativo de una peor respuesta clínica a la terapia antitumoral.

Los términos “mejor” o “peor” respuesta, tal como se usan en el presente documento, referidos a la respuesta clínica, se refieren a un paciente que muestra una respuesta  
10 favorable o desfavorable a la terapia antitumoral.

La expresión “baja probabilidad de responder a un tratamiento” ya se ha definido anteriormente. Como es bien sabido por el experto en la materia, la evaluación de la probabilidad, aunque sería lo preferible, habitualmente no es correcta para el 100%  
15 de los pacientes que se analizan. El término, sin embargo, requiere que una proporción estadísticamente significativa de pacientes puedan identificarse como poseedores de una predisposición a no responder a una terapia antitumoral. Para determinar si una proporción es estadísticamente significativa pueden utilizarse varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas por el experto en la  
20 materia, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor p, la prueba t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Para más detalles, consultar Dowdy & Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Intervalos de confianza preferidos son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%. Los valores p  
25 son, preferiblemente, 0,2, 0,1, 0,05.

El método de la invención, al identificar a aquellos pacientes que tienen una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral neoadyuvante, permite descartar a los pacientes no-respondedores y someterlos directamente a cirugía sin más demora  
30 y evitando, al mismo tiempo, los efectos secundarios asociados a la administración de dicha terapia.

Por otra parte, dicho método también es útil para identificar a aquellos pacientes que tienen una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral adyuvante, lo que permite evaluar la relación beneficio-riesgo y descartar a aquellos pacientes que no van a responder para evitar efectos secundarios innecesarios.

5

Los pacientes que más se pueden beneficiar de esta predicción son aquellos en los que no exista una indicación clara de neoadyuvancia o adyuvancia, como los pacientes de riesgo intermedio y con estadificación T2N1, T3N0, y también los  
 10 pacientes ancianos en los que existe una dudosa relación beneficio/riesgo. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el método se aplica a pacientes que se seleccionan del grupo de (i) un paciente que tiene un cáncer colorrectal en estadio T2N1 o T3N0 y; (ii) un paciente anciano.

15 En el contexto de la presente invención se consideran “pacientes ancianos” a aquellos pacientes de edad avanzada que sufren cáncer colorrectal. La edad a partir de la cual un paciente puede considerarse anciano varía en función de la especie. En general, un paciente anciano muestra algún signo de envejecimiento tal como, aumento en la incidencia de enfermedades, disminución de la masa muscular,  
 20 pérdida de movilidad, disminución de la capacidad de los sentidos (vista, olfato, oído), deterioro cognitivo, disminución de la capacidad de regeneración de los tejidos, alteraciones del comportamiento, etc. En el contexto de la presente invención, cuando los pacientes son seres humanos, se consideran pacientes ancianos aquellos con edad igual o superior a 65 años que sufren cáncer colorrectal.

25 KITS DE LA INVENCION Y SUS USOS

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a una terapia antitumoral que comprende reactivos adecuados para la detección de los niveles de expresión de los genes  
 30 *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*. En una realización particular la terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit como el definido anteriormente para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a la terapia antitumoral, preferiblemente a la terapia antitumoral neoadyuvante.

- 5 El término “kit”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de reactivos adecuados para la detección de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* junto con uno o más tipos de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, contenedores, envases adecuados para su venta comercial,  
10 sustratos a los que los reactivos están unidos, componentes de hardware electrónicos, etc.)

En la presente invención, se entiende como “reactivo adecuado para la detección de los niveles de expresión de los genes”, a cualquier compuesto o composición que  
15 puede usarse para detectar los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* y, opcionalmente, reactivos para detectar uno o más genes constitutivos. Este conjunto de reactivos puede incluir, sin limitarse a, ácidos nucleicos capaces de hibridarse específicamente con cada uno de los genes, sondas, etc.

20 Ácidos nucleicos capaces de hibridarse específicamente con cada uno de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* son, por ejemplo, uno o más pares de cebadores u oligonucleótidos para la amplificación específica de los fragmentos del ARNm (o de su correspondiente ADNc) de dichos genes y/o una o más sondas para la identificación de dichos genes.

25

Como entenderá el experto en la materia, los oligonucleótidos y sondas del kit de la invención pueden usarse en todas las técnicas de determinación de perfiles de expresión génica (RT-PCR, SAGE, TaqMan, PCR a tiempo real, PCR cuantitativa múltiple, etc.).

30

En una realización preferida de la invención, los reactivos adecuados para la detección de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* son oligonucleótidos y sondas.

Dichos reactivos, específicamente las sondas, pueden fijarse a un soporte sólido, tal como una membrana, un plástico o un vidrio, tratado opcionalmente para facilitar la fijación de dichas sondas al soporte. Dicho soporte sólido comprende, al menos, un  
5 conjunto de sondas que se hibridan específicamente con los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*, y que pueden usarse para la detección de los niveles de expresión mediante tecnología de arrays.

Los kits de la invención comprenden adicionalmente reactivos para detectar un ARNm  
10 codificado por un gen constitutivo. La disponibilidad de dichos reactivos adicionales permite la normalización de las medidas realizadas en diferentes muestras (por ejemplo, la muestra a analizar y la muestra control) para excluir que las diferencias en la expresión de los biomarcadores sean debidas a diferente cantidad de ARNm total en la muestra, más que a diferencias reales en los niveles relativos de expresión. Los genes  
15 constitutivos, en la presente invención, son genes que siempre están activos o que se transcriben de manera constante y que codifican para proteínas que están constitutivamente expresadas y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Genes constitutivos preferidos que pueden utilizarse en la presente invención incluyen  $\beta$ -2-microglobulina (B2M), ubiquitina, proteína ribosomal 18-S, ciclofilina, GAPDH,  
20 PSMB4 y actina. En una realización preferida, el ARN control es ARNm de los genes GAPDH, B2M y/o PSMB4.

Todas las realizaciones particulares del método de la presente invención son aplicables a los kits de la invención y a sus usos.

25

El siguiente ejemplo es meramente ilustrativo y no se debe considerar como limitativo de la invención.

## EJEMPLO

30

### I. MATERIAL Y MÉTODOS

#### Pacientes

Se seleccionaron 53 pacientes, mayoritariamente con estadios II y III de adenocarcinoma de recto por debajo de 10 cm de margen anal, que recibieron dos o más ciclos de quimioterapia y 50.4 Gy de radioterapia antes de la cirugía. Los pacientes fueron reclutados retrospectivamente y las variables clínico-patológicas registradas (Tabla 1).

**Tabla 1: Pacientes y características tumorales**

	Número total de pacientes N=53 N (%)
<b>Edad media (rango)</b>	64 (37-80)
<b>Sexo</b>	
Mujeres	25 (47,2)
Varones	28 (52,8)
<b>Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncologic Group)</b>	
0	19 (42,2)
1	25 (55,6)
2	1 (2,2)
indeterminado	8
<b>Clasificación pre-QRT clínica del tumor (T)</b>	
uT2	3 (7,1)
uT3	36 (85,8)
uT4	3 (7,1)
indeterminado	11
<b>Clasificación pre-QRT clínica nodal (N)</b>	
Negativa	21 (43,7)
Positiva	27 (56,2)
indeterminado	5 (10,4)
<b>Estadio clínico</b>	
I	1 (2,4)

II	14 (33,3)
III	27 (64,3)
indeterminado	11
<b>Clasificación post-QRT patológica del tumor (pT)</b>	
T1	3 (7,1)
T2	10 (23,8)
T3	28 (66,7)
T4	1 (2,4)
indeterminado	11
<b>Número de ganglios aislados (pN) promedio (rango)</b>	0 (0-8)
<b>Estadio patológico</b>	
0	10 (18,9)
1	12 (22,6)
2a	17 (32,1)
2b	2 (3,8)
3a	1 (1,8)
3b	5 (9,4)
3c	6 (11,4)
<b>Número de ganglios aislados (pN) total promedio (rango)</b>	8 (0-27)
<b>Número de ganglios negativos (pN1) promedio (rango)</b>	7 (0-21)
<b>Grado</b>	
No respuesta (NR)	15 (28,3)
Buena respuesta	28 (52,8)
Respuesta completa	10 (18,9)
<b>CEA promedio (rango)</b>	2,8 (0,6-39,1)
<b>Linfocitos</b>	
Moderado-leve	27 (50,9)
No	26 (49,1)

<b>Monocitos</b>	
No	37 (69,8)
Sí	16 (30,2)
<b>Quimioterapia previa</b>	
5-fluorouracilo	8 (15,1)
irinotecan	1 (1,9)
oxaliplatino	27 (50,9)
UFT-LV	17 (32,1)
<b>Número de ciclos promedio de radioterapia previa (rango)</b>	3 (1-11)
<b>Quimioterapia adyuvante</b>	
5-fluorouracilo	2 (3,8)
irinotecan	6 (11,3)
oxaliplatino-raltitrexed	16 (30,2)
UFT-LV	16 (30,2)
No	13 (24,5)
<b>Número de ciclos promedio de radioterapia adyuvante (rango)</b>	6 (2-8)
<b>Distancia promedio al margen anal (rango)</b>	
≤ 6 cm	33 (62,3)
> 6 cm	20 (37,7)
<b>Puntuación promedio (rango)</b>	0,63 (0,42-5,19)

UFT-LV: uracilo/tegafur-leucovorina

5 En el análisis estadístico se incluyeron los 53 pacientes y se estudió la muestra pretratamiento. Se obtuvieron consentimientos informados en todos los casos, y el estudio fue previamente aprobado por los correspondientes comités de ética del hospital.

### Seguimiento

Los pacientes se siguieron a intervalos de tres meses durante dos años, después cada seis meses durante tres años, y más tarde anualmente. Las evaluaciones consistieron en un examen físico, hemograma y bioquímica. La colonoscopia, la ecografía y la tomografía computerizada se realizaron según unas guías estándar  
5 ([http://www.asco.org/asco/downloads/Colon\\_Cancer\\_Tool\\_11-1-05.xls](http://www.asco.org/asco/downloads/Colon_Cancer_Tool_11-1-05.xls)). Siempre que fue posible, se recomendó una confirmación histopatológica de recurrencia.

### **Respuesta y grado de regresión tumoral (GRT)**

El GRT se determinó mediante el examen histopatológico de los especímenes quirúrgicos, según la cantidad de células tumorales viables y la fibrosis acompañante  
10 producida por el tratamiento, de acuerdo al sistema propuesto por Dworak (Dworak, O. *et al.*, 1997 Int J Colorectal Dis, 12: 19-23).

La respuesta a la quimiorradioterapia se clasificó en tres grupos basándose en el GRT:  
15 no respuesta tumoral (NR) que incluyó los GRT 0 y 1, buena respuesta (GRT 2 y 3) y respuesta tumoral completa (GRT 4), dado que se pueden establecer estos tres grupos con supervivencias diferenciadas. Los grados de regresión se definen como GRT 0 y 1 (no regresión o menos del 25% de la masa tumoral); GRT 2 y 3 (regresión mayor del 25% de la masa tumoral con al menos algunas células tumorales viables); y GRT 4  
20 (respuesta completa patológica, no células tumorales viables).

### **Preparación de las muestras**

Para el análisis de arrays de baja densidad mediante PCR cuantitativa múltiple se utilizaron las muestras tumorales de los 53 pacientes del estudio, que tenían historia  
25 clínico-patológica completa. Las muestras embebidas en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron analizadas por un patólogo. Se requirió un enriquecimiento en células tumorales superior al 75% y, cuando fue preciso, se realizó una posterior macrodissección con cuchilla de seguridad. El ARN se extrajo de 5-10 secciones de cinco micras a partir de las muestras parafinadas utilizando técnicas  
30 estándar.

### **PCR cuantitativa múltiple**

La totalidad del contenido en ARN se midió y verificó espectrofotométricamente y electrofotométricamente. La transcripción inversa se realizó a partir de 200 ng de ARN total usando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las reacciones de PCR cuantitativa múltiple se realizaron en placas de 384 pocillos mediante el sistema de PCR cuantitativa múltiple en muestras de 50 µl con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 50 µl de ADNc correspondientes a 50 ng de ARN total por canal de tarjeta microfluídica. La expresión de cada gen se midió en triplicado, y se normalizó en relación a tres genes de referencia (GAPDH, B2M y PMSB4).

10

### **Análisis estadístico**

*Estadística descriptiva.* En el caso de variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas de aparición de cada modalidad de la variable y las frecuencias relativas expresadas en porcentajes. Para las variables cuantitativas se calcularon las medidas de tendencia central media o mediana. Como medidas de dispersión se utilizó la desviación típica y el recorrido de la variable.

15

*Estadística inferencial.* Para variables cualitativas se aplicó el test de chi al cuadrado con la corrección de Yate, y en el caso de Tablas de 2x2 la prueba exacta de Fisher. Antes de proceder a la aplicación de test de hipótesis para variables cuantitativas se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) para estudiar el tipo de distribución que seguía la variable (normal, no normal). Para aquellas variables donde la prueba KS indicara que seguía una distribución normal se aplicaron pruebas paramétricas (t de Student) y en caso contrario test no paramétricos (Wilcoxon, U de Mann-Whitney). El método de Kaplan-Meier fue empleado para estimar la supervivencia global.

20

25

### *Normalización de $C_t$*

Como paso previo al análisis de los datos procedentes de la PCR cuantitativa se procedió a la normalización de los mismos. Para ello se utilizaron dos modelos, que han sido evaluados posteriormente: a) normalizar con tres genes y b) normalizar con 12 genes. Debido a la variabilidad obtenida con la normalización tipo b) se decidió aplicar el primer método. En todos los casos se normalizó por la media de cada gen calculada en toda la serie de pacientes.

30

*Análisis factorial*

Con el fin de reducir dimensiones en la matriz de datos, se utilizó el análisis factorial utilizando los datos normalizados y aplicando el método varimax para rotar los ejes o  
5 componentes. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

	Componente		
	1	2	3
ALOX15-Hs00609608_m1	,011	-,014	,997
CTNNB1-Hs00170025_m1	,940	,186	,010
MAPK14-Hs00176247_m1	,930	,310	,042
NOS2A-Hs00167248_m1	,128	,937	-,054
PTGES2-Hs00228159_m1	,958	,064	-,033
PTGS2-Hs00153133_m1	,564	,577	,102

**Tabla 2. Matriz de componentes rotados.** Para obtener esta tabla se utilizó un método de extracción (análisis de componentes principales) y un método de rotación  
10 (normalización Varimax con Kaiser). La rotación convergió en cuatro iteraciones.

*Análisis de conglomerados jerárquicos*

Para evaluar la posible existencia de grupos que permitan caracterizar grupos de  
pacientes, se realizaron dos análisis de conglomerados jerárquicos: uno por pacientes y  
15 otro por genes normalizados. Se utilizó el método del vecino más próximo y la distancia euclídea al cuadrado como medida.

*Predicción de clase y validación*

Se utilizó un método de predicción de clase para determinar si los patrones de expresión  
20 génica podrían ser empleados para predecir la respuesta. Se desarrolló una función multivariante basada en la expresión génica que predice con precisión la clase de miembro (respondedor/no respondedor) en una muestra de prueba, sobre la base de expresión de genes clave.

25

**II. RESULTADOS**

**Datos clínicos y patológicos**

Los datos histopatológicos de los 53 pacientes incluidos en este estudio se ilustran en la Tabla 1.

**5 PCR cuantitativa múltiple y supervivencia**

El estudio de la expresión génica en relación a la supervivencia de los pacientes permitió identificar un perfil de 6 genes con relación estadísticamente significativa con la supervivencia global  $p=0,009$ , aunque no se logró la significación estadística cuando se comparó con la supervivencia libre de enfermedad (Figura 1).

10

**PCR cuantitativa múltiple y respuesta tumoral a la quimiorradioterapia**

Los tres grados de respuesta denominados no respuesta, buena respuesta y respuesta completa se distribuyeron en 15 (28,3%), 28 (52,8%) y 10 (18,9%), respectivamente. El GRT se relacionó con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de los pacientes, observándose una clara tendencia a la recidiva a menor GRT. El perfil de 6 genes encontrado permitió clasificar a los pacientes en los tres grupos de respuesta de una manera estadísticamente significativa ( $p=0,02$ , Figura 2).

**III. DISCUSIÓN**

20

Los resultados de este estudio han permitido identificar un perfil de 6 genes con valor predictivo de respuesta al tratamiento en el cáncer colorrectal y que permite discriminar significativamente entre los grados de respuesta patológica clasificados como no-respuesta (grados de regresión GRT 0 y 1), buena respuesta (grados de regresión GRT 2 y 3) y respuesta completa (grados de regresión GRT 4).

La predicción de la respuesta al tratamiento permite adecuar los tratamientos y actuar de forma más o menos agresiva. Los pacientes que más se pueden beneficiar de esta predicción son aquellos en los que no exista una indicación clara de neoadyuvancia o adyuvancia, en virtud de las incertidumbres clínicas (pacientes de riesgo intermedio, como los casos de enfermedad T2N1 y T3N0; aquellos con deficiente estadificación clínica, especialmente frecuente en relación a la estadificación nodal, pacientes ancianos con dudosa relación beneficio/riesgo, etc.).

La no-respuesta a la terapia antitumoral se predice con una elevada sensibilidad, del 80%. De nuevo esta predicción es de enorme interés, pues dada la muy escasa probabilidad de beneficio, estos enfermos deberían salir del protocolo habitual de  
5 tratamiento preoperatorio y ser intervenidos directamente, evitando demoras innecesarias en el tratamiento local, que dan oportunidad al mayor riesgo de estos enfermos de desarrollar metástasis a distancia y complicaciones locales como obstrucción intestinal. Adicionalmente, se evitaría en estos pacientes la exposición a la considerable toxicidad de la quimiorradioterapia.

10

La presente invención presenta ventajas frente a otras huellas genómicas conocidas en el estado de la técnica que predicen la respuesta a la terapia antitumoral neoadyuvante en pacientes de cáncer colorrectal, ya que el método de la invención utiliza un menor número de genes, y por primera vez permite comparar la expresión  
15 de las colecciones de genes con la supervivencia de los pacientes.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para la predicción de la respuesta clínica a una terapia antitumoral en un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal o para la identificación de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal que presenta baja probabilidad de responder a un tratamiento con una terapia antitumoral que comprende
- 5
- (i) determinar los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*,  
10 *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una muestra de dicho paciente antes de la administración de la terapia,
- (ii) calcular un factor predictivo en base a los niveles de expresión de dichos genes y
- (iii) comparar el valor del factor predictivo obtenido en la etapa (ii) con un  
15 valor de referencia
- en donde una alteración del valor del factor predictivo con respecto al valor de referencia es indicativa de una peor respuesta clínica a la terapia antitumoral o de que el paciente tiene una baja probabilidad de responder a la terapia antitumoral.
- 20
2. Un método según la reivindicación 1 en donde el factor predictivo se calcula mediante la suma de los niveles de expresión de los genes, opcionalmente corregidos usando un coeficiente para cada gen.
- 25
3. Un método según la reivindicación 2 en donde el valor de referencia se calcula a partir de los valores de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* en una población de muestras de pacientes respondedores y no respondedores a la terapia antitumoral.
- 30
4. Un método según la reivindicación 3 en donde el valor de referencia es la media de los valores obtenidos a partir de la población de muestras de pacientes que no responden a la terapia antitumoral.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la respuesta clínica se selecciona de riesgo de recaída, supervivencia global y muerte por enfermedad
- 5 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la respuesta clínica es supervivencia global.
7. Un método según las reivindicaciones 1 a 6 en donde la terapia antitumoral se selecciona del grupo de quimioterapia, radioterapia y quimiorradioterapia.
- 10 8. Un método según las reivindicaciones 1 a 7 en donde la terapia antitumoral es terapia antitumoral sistémica.
9. Un método según las reivindicaciones 1 a 8 en donde la terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante.
- 15 10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde la determinación de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2* se lleva a cabo mediante la medida de los niveles del ARN mensajero (ARNm de dichos genes).
- 20 11. Un método según las reivindicaciones 1 a 10 en donde el paciente se selecciona del grupo de
- (i) un paciente que tiene un cáncer colorrectal en estadio T2N1 o T3N0
- 25 (ii) paciente anciano
12. Un kit para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a una terapia antitumoral que comprende reactivos adecuados para la detección de los niveles de expresión de los genes *ALOX15*, *CTNNB1*, *MAPK14*, *NOS2A*, *PTGES2* y *PTGS2*.
- 30 13. Un kit según la reivindicación 12 en donde la terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante.

14. Uso de un kit según la reivindicación 12 para predecir la respuesta de un paciente que sufre cáncer colorrectal a una terapia antitumoral.
- 5 15. Uso de un kit según la reivindicación 14 en donde la terapia antitumoral es una terapia antitumoral neoadyuvante.

### Supervivencia

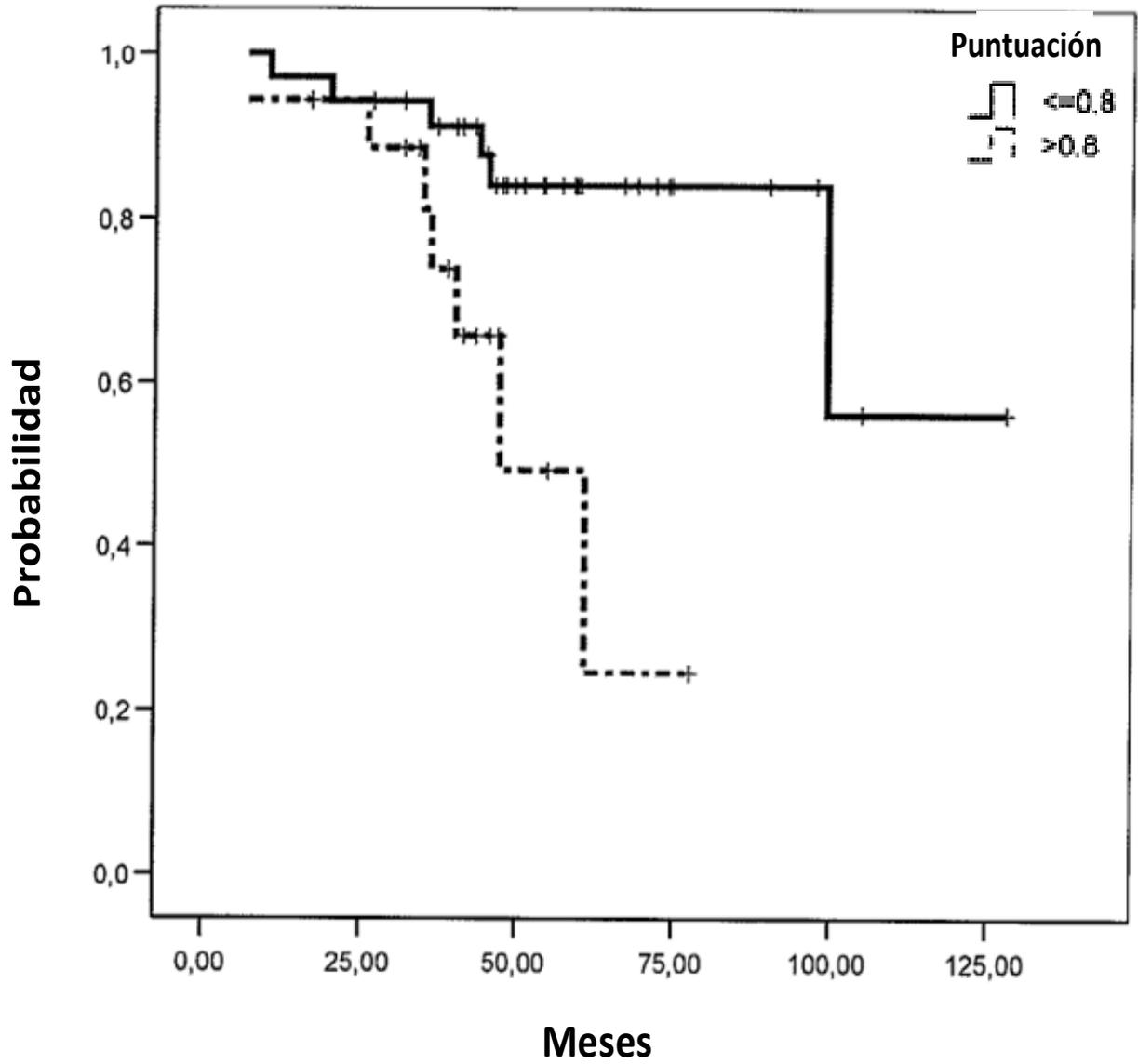


FIGURA 1

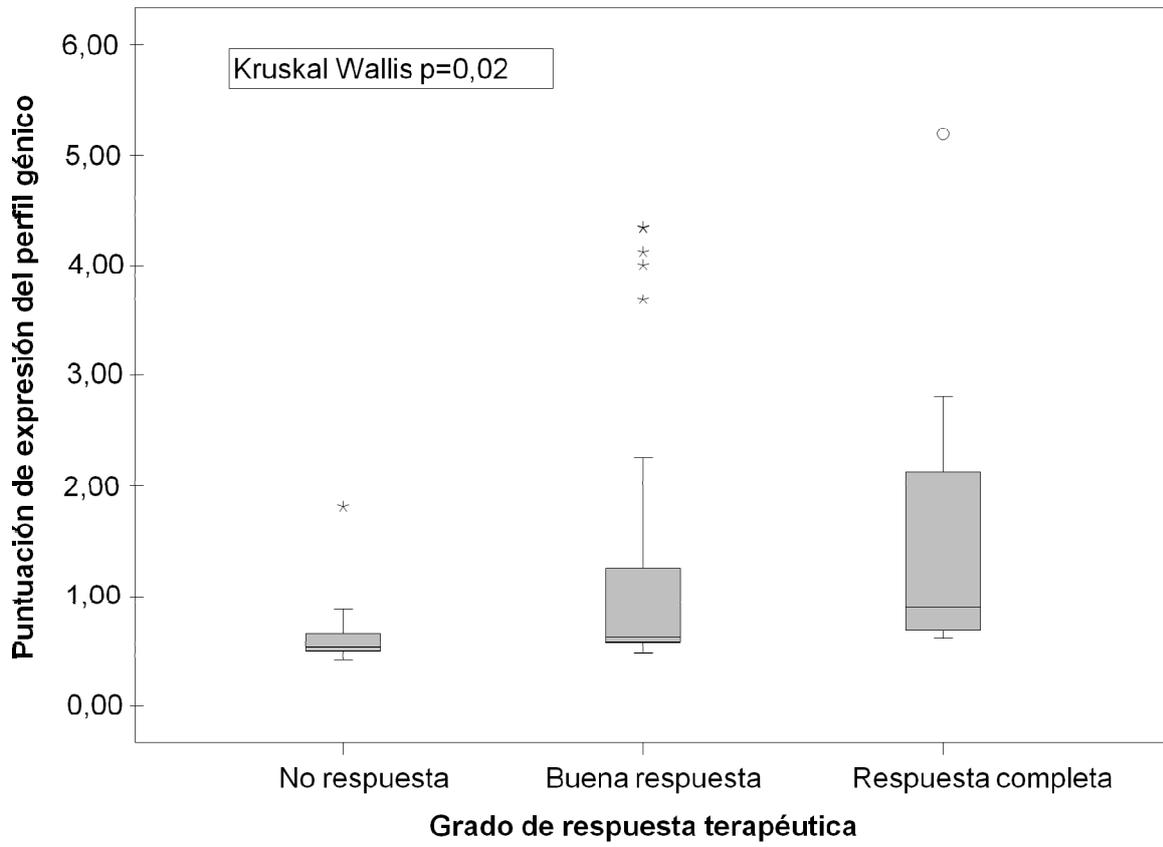


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130863

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.05.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SPITZNER, M. et al. A gene expression signature for chemoradio sensitivity of colorectal cancer cells. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. 04.11.2010. Págs.1184-1192. ISSN 0360-3016 (print). doi:10.1016/j.ijrobp.2010.06.023.	1-15
A	DEL RÍO, M. et al. Gene expressionsignature in advanced colorectal cancer patientsselect drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. Journal of Clinical Oncology. 01.03.2007. Vol. 25(7). Págs. 773-780.ISSN 0732-183X (print). doi:10.1200/JCO.2006.07.4187.	1-15
A	ES 2332557 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID) 08.02.2010, todo el documento.	1-15
A	OGINO, S. et al. Cyclooxygenase-2expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. Clinical Cancer Research. 15.12.2008. Vol. 14(24). Págs.8221-8227. ISSN 1078-0432 (Print) doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1841.	1-15
A	US 2009275057 A1 (LINKE et al.) 05.11.2009, todo el documento.	1-15
A	BRETtingham-MOORE, K. H. et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neo adjuvant chemoradio therapyin rectal adenocarcinoma. Clinical Cancer Research. 11.01.2011. Vol. 17(9). Págs. 3039-3047. ISSN1557-3265 (electronic). doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2915.	1-15
A	CARDOSO, J. et al. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. Biochimica et Biophysica Acta. (2007). Vol. 1775(1). Págs.103-137. ISSN 0304-419X (print). doi:10.1016/j.bbcan.2006.08.004.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.09.2012

Examinador  
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-15	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**Consideraciones:**

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SPITZNER, M. et al. A gene expression signature for chemoradio sensitivity of colorectal cancer cells. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics. Págs.1184-1192. ISSN 0360-3016 (print). doi:10.1016/j.ijrobp.2010.06.023.	04.11.2010
D02	DEL RÍO, M. et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. Journal of Clinical Oncology. Vol. 25(7). Págs. 773-780. ISSN 0732-183X (print). doi:10.1200/JCO.2006.07.4187.	01.03.2007
D03	ES 2332557 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID)	08.02.2010
D04	OGINO, S. et al. Cyclooxygenase-2expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. Clinical Cancer Research. Vol. 14(24). Págs.8221-8227. ISSN 1078-0432 (Print) doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1841.	15.12.2008
D05	US 2009275057 A1 (LINKE et al.)	05.11.2009
D06	BRETTINGHAM-MOORE, K. H. et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neo adjuvant chemoradio therapy in rectal adenocarcinoma. Clinical Cancer Research. Vol. 17(9). Págs. 3039-3047. ISSN1557-3265 (electronic). doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2915	11.01.2011
D07	CARDOSO, J. et al. Expression and genomic profiling of colorectal cancer. Biochimica et Biophysica Acta. (2007). Vol. 1775(1). Págs.103-137. ISSN 0304-419X (print). doi:10.1016/j.bbcan.2006.08.004	00.01.2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La invención se refiere a un método in vitro para predecir la respuesta clínica a una terapia antitumoral de un paciente diagnosticado de cáncer colorrectal (CRC), basado en el análisis de los niveles de expresión del grupo de genes formado por ALOX15, CTNNB1, MAPK14, NOS2A, PTGES2 y PTGS2. También se refiere a un kit para la puesta en práctica del método.

D01 divulga una huella genómica para el análisis de la sensibilidad a la quimioterapia de células de CRC. Se mencionan dos de los genes de la invención (MAPK14 y CTNNB1), pero no se describen formando parte del mismo grupo de marcadores ni se divulga el resto de los componentes de la huella genómica de la invención.

D02 predice la respuesta a la quimioterapia en CRC utilizando un grupo de 14 genes, ninguno de los cuales coincide con los de la invención.

D03 divulga métodos de pronóstico de la evolución del CRC tras la administración de una terapia y de evaluación de sus efectos, midiendo los niveles de expresión de 13 genes. Ninguno de los genes descritos coincide con los de la invención.

El estado de la técnica demuestra que los genes que forman parte de la huella genómica de la invención están relacionados con el CRC y en muchos casos se utilizan como marcadores de pronóstico de la enfermedad o como indicadores de la fase en la que se encuentra (ver D04-D07). Sin embargo, ninguno de los documentos citados divulga el grupo de genes del método de la invención, ni su uso para predecir la respuesta a la quimioterapia.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-15 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6 LP)

Puesto que no existe sugerencia o indicación en el estado de la técnica constituido por los documentos D01-D07 para modificar o adaptar las huellas genómicas que describen, ni se aprecia posibilidad para que el experto en la materia los combine en el sentido de la invención, se considera que las reivindicaciones 1-15 también cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8 LP).