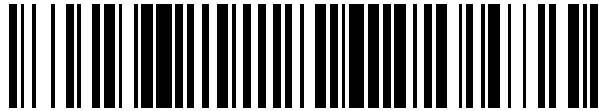


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 475**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08771019 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 2171086**

54 Título: **Métodos de diagnóstico y tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**15.06.2007 US 944157 P**  
**26.03.2008 US 39555**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.04.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTH FLORIDA (100.0%)**  
**3802 SPECTRUM BLVD., SUITE 100**  
**TAMPA, FL 33612-9220, US**

72 Inventor/es:

**BEPLER, GEROLD**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 401 475 T3**

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

**DESCRIPCION**

**MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica los beneficios de la Solicitud de Patente Provisional estadounidense números de serie 60/944, 157, presentada el 15 de junio de 2007, y 61/039, 555, presentada el 26 de marzo de 2008.

INVESTIGACIÓN O DESARROLLO FINANCIADO POR EL GOBIERNO FEDERAL

10 **[0002]** Esta invención se ha realizado con apoyo del gobierno con la subvención número RO1 CA102726 otorgada por el Instituto Nacional de Cáncer de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. El Gobierno tiene determinados derechos en la invención.

CAMPO TÉCNICO

15 **[0003]** Esta invención se refiere a métodos de diagnóstico y tratamiento del cáncer, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

ANTECEDENTES

20 **[0004]** El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer en los Estados Unidos. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el tipo más común de cáncer de pulmón, representando más del 80% de los cánceres de pulmón. Por lo general, crece y se propaga más lentamente que el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). Hay tres formas principales de CPCNP, que incluyen adenocarcinomas, que normalmente se encuentran en un área exterior del pulmón; carcinomas de células escamosas, que normalmente se encuentran en el centro del pulmón junto a un bronquio; y carcinomas de células grandes, que pueden ocurrir en cualquier parte del pulmón y tienden a crecer y propagarse más rápidamente que los  
25 otros dos tipos de CPCNP. Véase, por ejemplo, Travis et al., Cancer 75 (Suppl. 1):191-202 (1995).

30 **[0005]** El trabajo reciente ha demostrado que los genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y reparación del ADN son determinantes importantes del comportamiento fenotípico del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) de estadio inicial. Específicamente, la ribonucleótido reductasa M1 (RRM1), la subunidad reguladora de la ribonucleótido reductasa, y ERCC1, un componente de la nucleasa 5' implicado en la reparación por escisión de nucleótidos, son pronósticos de la evolución de los pacientes (Bepler et al, J Clin Oncol; 22:1878-1885 (2004); Simon et al, Chest 127(3):978-83 (2005); Olaussen et al, N Engl J Med 355:983-991 (2006); Zheng et al,  
35 N Engl J Med. 356:800-808 (2007)). Los niveles altos de ARNm y de expresión de

proteínas de esos genes están asociados con una supervivencia larga de los pacientes y una formación de metástasis reducida en modelos animales (Gautam et al., Oncogene 22:2135-2142 (2063)). Además, se ha descubierto que los niveles altos de RRM1 en animales transgénicos protegen contra la formación del tumor de pulmón inducido por carcinógeno (Gautam et al., Cancer Res. 66:6497-6502 (2006)).

**[0006]** Giovannetti et al, Molecular Pharmacology vol. 68, nº: 1, julio de 2005, páginas 110-118 revela que la sensibilidad a la gemcitabina está correlacionada con la expresión de RRM1 en cultivo celular y que se ha encontrado una correlación similar entre pemetrexed y la expresión de la timidilato sintasa (TS). La publicación sugiere que estos hallazgos pueden tener implicaciones en el diseño racional de los regímenes farmacológicos futuros que incorporen gemcitabina y pemetrexed.

**[0007]** Rosell et al, Oncology, vol. 18, nº: 13, suplemento 8, noviembre de 2004, páginas 17-76 indica que la evaluación de los niveles de expresión de ARNm de RRM1 y de TS podría seleccionar pacientes que se beneficien de combinaciones de gemcitabina o pemetrexed.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

**[0008]** De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto a un tratamiento que comprende la administración de gemcitabina y pemetrexed, siendo el método como se expone en la reivindicación independiente 1. Más características de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

**[0009]** La presente invención se basa en el descubrimiento de que los niveles de expresión de la timidilato sintasa (TS) son pronósticos de evolución en sujetos con CPCNP, por ejemplo, CPCNP de estadio inicial (estadio I). Además, el nivel de expresión de TS y de RRM1 está correlacionado con la respuesta al tratamiento preoperatorio con una combinación sin platino, concretamente gemcitabina y pemetrexed, en pacientes con CPCNP resecable quirúrgicamente.

**[0010]** Por lo tanto, se describen en este documento métodos de predicción de resultados en sujetos con CPCNP, por ejemplo, CPCNP de estadio inicial (estadio I).

**[0011]** También se describen métodos de selección de pacientes para tratamiento perioperatorio, por ejemplo, tratamiento pre- o postoperatorio, con agente antimetabolito sin platino, por ejemplo, gemcitabina y pemetrexed o uno de los dos. El método incluye la determinación de los niveles de expresión intratumoral de TS, o de TS y RRM1, y la selección de un paciente en función de los niveles de expresión.

**[0012]** En otro aspecto, la revelación proporciona métodos para seleccionar una quimioterapia apropiada para un sujeto. Los métodos incluyen la obtención de una

muestra de tumor del sujeto, la determinación de un nivel de expresión génica de la ribonucleótido reductasa M1 (RRM1) y la timidilato sintasa (TS) en la muestra del tumor y la selección de una quimioterapia apropiada en función de los niveles de expresión de RRM1 y de TS. Si los niveles de expresión de RRM1 y de TS son menores o igual que la mediana del nivel de expresión de RRM1 de una cohorte de referencia, se selecciona una quimioterapia que comprende gemcitabina y pemetrexed. En algunos modos de realización, los métodos también incluyen la administración de la quimioterapia apropiada seleccionada al sujeto. En algunos modos de realización, los métodos también pueden incluir la administración de un segundo agente quimioterapéutico al sujeto, por ejemplo, una anti-tubulina o agente que contiene platino.

**[0013]** En un aspecto adicional, la revelación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto con cáncer, por ejemplo, CPCNP; por ejemplo, CPCNP operable. El método incluye la selección de un sujeto en función de la presencia de niveles de expresión bajos de TS y de RRM1, y la administración al sujeto de una combinación de gemcitabina y pemetrexed, por ejemplo, en forma de cuatro tratamientos quincenales. En algunos modos de realización, los métodos también incluyen la determinación de los niveles de expresión intratumoral de TS o de TS y RRM1.

**[0014]** En otro aspecto, la revelación proporciona métodos para predecir la respuesta de un sujeto a un tratamiento, por ejemplo, un tratamiento pre-o postoperatorio, con un agente antimetabolito sin platino, por ejemplo, gemcitabina y pemetrexed o uno de los dos. En otro aspecto, la revelación proporciona métodos para predecir la respuesta de un sujeto a un tratamiento que comprende la administración de gemcitabina y pemetrexed. Los métodos incluyen la obtención de una muestra de tumor del sujeto, la determinación de un nivel de expresión génica de la ribonucleótido reductasa M1 (RRM1) y la timidilato sintasa (TS) en la muestra de tumor, y la predicción de la respuesta del sujeto al tratamiento en función del nivel de expresión génica de RRM1 y de TS en la muestra de tumor. Los niveles de expresión bajos de TS y de RRM1 indican que es probable que el sujeto tenga una respuesta positiva al tratamiento.

**[0015]** En otro aspecto más, la revelación proporciona métodos para proporcionar un pronóstico para un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de pulmón de células no pequeñas. Los métodos incluyen la obtención de una muestra de tumor del sujeto, la determinación de un nivel de proteína timidilato sintasa (TS) citoplasmática en la muestra de tumor y la comparación del nivel de proteína TS citoplasmática de la muestra con un nivel de referencia de proteína TS citoplasmática. Un nivel alto de proteína TS citoplasmática de la muestra en comparación con el nivel de referencia es

indicativo de un pronóstico bueno y un nivel bajo de proteína TS citoplasmática en comparación con el nivel de referencia es indicativo de un pronóstico malo. En algunos modos de realización, el nivel de proteína TS citoplasmática se determina mediante un método de análisis cuantitativo in situ, por ejemplo, el AQUA (análisis cuantitativo automatizado) como se describe en este documento.

**[0016]** En otro aspecto, la revelación proporciona métodos para determinar o controlar la eficacia de un tratamiento, por ejemplo, un tratamiento pre-o postoperatorio, con un agente antimetabolito sin platino, por ejemplo, gemcitabina y pemetrexed o uno de los dos. Los métodos incluyen la determinación de un nivel de TS y/o de RRM1, antes del tratamiento para establecer un nivel de partida, y la determinación de uno o más niveles de TS y/o de RRM1, después de que se haya iniciado el tratamiento. Un cambio en los niveles del gen medido es indicativo de la eficacia del tratamiento, por ejemplo, un aumento en la expresión de TS y/o de RRM1 indica que el tratamiento es eficaz. El método también puede incluir la toma de una decisión de tratamiento basada en cambios en los niveles de TS y/o de RRM1.

**[0017]** En otro aspecto, la revelación proporciona kits que incluyen un reactivo para examinar la expresión de RRM1 y de TS en una muestra de tejido de un paciente y una hoja de instrucciones. En algunos modos de realización, los reactivos para examinar la expresión de RRM1 y de TS comprenden partes previamente medidas de un reactivo seleccionado del grupo seleccionado de cebadores oligo-dT, cebadores directos que hibridan con RRM1 o ADNc de TS, cebadores inversos que hibridan con RRM1 o ADNc de TS, transcriptasas inversas, ADN polimerasas, tampones y nucleótidos. En algunos modos de realización, los reactivos para examinar la expresión de TS y de RRM1 comprenden partes previamente medidas de anticuerpos anti-RRM1 y anti-TS y tampones para realizar un ensayo de Western blot o de inmunohistoquímica. En algunos modos de realización, los kits también incluyen un reactivo para procesar una muestra de tejido de un paciente.

**[0018]** Un "trastorno proliferativo", es un trastorno caracterizado por irregularidades en la división celular. Un cáncer (por ejemplo, un glioma, cáncer de próstata, melanoma, carcinoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de mama, cáncer de colon o sarcoma) es un ejemplo de un trastorno proliferativo. Las células características de trastornos proliferativos (es decir, "células neoplásicas" o "células tumorales") tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizado por un crecimiento proliferativo inapropiado de poblaciones de células. Una célula neoplásica o una célula tumoral es una célula que prolifera a una velocidad anormalmente alta. Un nuevo crecimiento que comprende células neoplásicas es un

neoplasma, conocido también como un "tumor". Un tumor es un crecimiento anormal de tejido, formando normalmente una masa distinta, que crece por proliferación celular más rápidamente que el tejido normal. Un tumor puede mostrar una falta total o parcial de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Tal como se utiliza en este documento, un tumor pretende abarcar tumores hematopoyéticos, así como tumores sólidos.

**[0019]** Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos se pueden clasificar en líneas generales en tres tipos principales. Los tumores malignos que surgen de las estructuras epiteliales se denominan carcinomas, los tumores malignos que se originan en tejidos conectivos como músculo, cartílago, grasa o hueso se denominan sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmunológico se denominan leucemias y linfomas. Otros tumores incluyen, sin carácter limitativo, neurofibromatosis.

**[0020]** Los trastornos proliferativos incluyen todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos con transformación maligna, independientemente del tipo histopatológico o estadio de invasión. Los cánceres incluyen tumores malignos en diversos sistemas orgánicos, tales como el pulmón, mama, tiroides, linfoides, gastrointestinal y tracto genitourinario, así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. Los carcinomas incluyen tumores malignos en tejidos epiteliales o endocrinos, tales como carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas del sistema, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino y melanomas. Otros carcinomas incluyen los que se forman a partir de tejido del cuello de útero, pulmón, cabeza y cuello, colon y ovario. Los cánceres del sistema nervioso central incluyen gliomas (incluyendo astrocitomas, oligodendrogliomas mixtos, glioblastoma multiforme, ependimoma y oligodendroglioma), meningiomas, tumores pituitarios, hemangioblastomas, neuromas acústicos, tumores de la glándula pineal, tumores de la médula espinal, tumores hematopoyéticos y linfomas del sistema nervioso central. Los cánceres que afectan al tejido conectivo, como grasa, músculo, vasos sanguíneos, tejidos profundos de la piel, nervios, huesos y cartílago, se denominan sarcomas. Los sarcomas incluyen, por

ejemplo, liposarcomas, leiomiomas, rhabdomiomas, sarcomas sinoviales, angiosarcomas, fibrosarcomas, neurofibrosarcomas, tumores del estroma gastrointestinal (GIST por sus siglas en inglés), tumores desmoides, sarcomas de Ewing, osteosarcomas y condrosarcomas.

5 **[0021]** Los métodos descritos en este documento son particularmente relevantes para el tratamiento de seres humanos que tienen un tumor maligno epitelial, tal como un cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de ovario. Los tumores malignos epiteliales son cánceres que afectan a los tejidos epiteliales.

10 **[0022]** Un "sujeto" como se describe en este documento puede ser cualquier sujeto que tenga un trastorno proliferativo. Por ejemplo, el sujeto puede ser cualquier mamífero, tal como un ser humano, incluyendo un paciente humano de cáncer. Ejemplos de mamíferos no humanos incluyen un primate no humano (por ejemplo, un mono o simio), un ratón, rata, cabra, vaca, toro, cerdo, caballo, oveja, jabalí, nutria  
15 marina, gato y perro. Los métodos descritos en este documento se pueden realizar en cualquier sujeto de cualquier edad, incluyendo un feto (por ejemplo, en el útero), bebé, niño, adolescente, adulto o anciano humano. En algunos modos de realización, el sujeto tiene un tumor maligno epitelial: un cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de mama; cáncer colorrectal; cáncer de  
20 cabeza y cuello o cáncer de ovario.

**[0023]** Un "antimetabolito" como se usa en este documento es una sustancia química con una estructura similar a una sustancia (un metabolito) requerida para las reacciones bioquímicas normales, pero lo suficientemente diferente como para interferir en las funciones normales de las células. Los antimetabolitos incluyen  
25 análogos de la purina y la pirimidina que interfieren en la síntesis del ADN. Ejemplos de antimetabolito incluyen, por ejemplo, aminopterina, 2-clorodeoxiadenosina, arabinósido de citosina (Ara C), citarabina, fludarabina, fluorouracilo (5-FU) (y sus derivados, que incluyen capecitabina y tegafur), gemcitabina, metopterina, metotrexato, pemetrexed, raltitrexed, trimetrexato, 6-mercaptopurina y 6-tioguanina.

30 **[0024]** Una "antitubulina" como se utiliza en este documento se refiere a un agente quimioterapéutico que bloquea la división celular por la inhibición del huso mitótico. Los agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, los taxanos paclitaxel y docetaxel, y los alcaloides de vinca vinorelbina, vincristina, vinblastina, vinflunina y vindesina.

**[0025]** Un "agente que contiene platino" como se usa en este documento incluye  
35 agentes quimioterapéuticos que contienen platino. Los agentes que contienen platino se entrecruzan con el ADN alquilado, lo que da lugar a la inhibición de la síntesis y

transcripción del ADN. Los agentes que contienen platino pueden actuar en cualquier ciclo celular y, por consiguiente, matar células neoplásicas, así como células que se dividen de forma sana. Los agentes que contienen platino incluyen, por ejemplo, cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

5 **[0026]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Los métodos y el material se describen en este documento para su uso en su presente invención; también se pueden utilizar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la  
10 técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

**[0027]** Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y figuras detalladas, y a partir de las reivindicaciones.

15 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0028]**

La figura 1 es un Western blot de líneas celulares que muestran la expresión de TS. Se prepararon extractos citosólicos y nucleares a partir de las líneas celulares H23 y H23-CT-R1. Éstos se separaron en geles de poliacrilamida, se  
20 transfirieron a membranas y se sondaron con anticuerpos dirigidos a TS, Oct-1 (una proteína nuclear) y GAPDH (una proteína citosólica). Se encontró una banda de 38 kD representando a TS en el citoplasma.

Las figuras 2A y 2B son curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier, estimadas por la expresión de TS. 2A, la supervivencia de 160 pacientes mediante la expresión de la proteína in situ. Las líneas de color gris claro representan los pacientes con expresión de marcadores >57,02 (N=120; mediana=81,3 meses, IC 95% 62,9-99,6) y las líneas de color gris oscuro representan la expresión ≤57,02 (N=40; mediana=51,7 meses, IC 95% 21.5-81,9). El valor *p* no ajustado fue de 0,0013. 2B la supervivencia del mismo  
25 grupo de pacientes incluyendo el segundo mejor punto de corte. Las líneas de color gris claro representan los pacientes con expresión de marcadores ≥129,33 (N=18; mediana no alcanzada), el gris medio representa los pacientes con expresión de marcadores desde 57,58 a 124,27 (N=82; mediana de 80,8 meses) y las líneas de color gris oscuro representan la expresión ≥57,02  
30 (N=40; mediana=51,7 meses). El valor *p* no ajustado fue de 0,002.

La figura 3A es un gráfico de barras que muestra la respuesta al tratamiento



medida de forma radiográfica. La respuesta osciló desde un aumento del 95 % hasta una disminución del 100% del tamaño de las lesiones medibles.

Las figuras 3B-E son gráficos de barras que muestran la respuesta radiográfica de la enfermedad y la expresión génica del ARNm. 3B, RRM1; 3C,

5 RRM2; 3D, TS; 3E, dihidrofolato reductasa (DHFR).

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de las estimaciones de supervivencia global y supervivencia sin enfermedad de Kaplan-Meier. La curva negra (línea superior) denota la supervivencia global (OS por sus siglas en inglés) y la curva gris (línea inferior) indica la supervivencia sin enfermedad (DFS por sus siglas en inglés). Las marcas de visto indican los casos

10

censurados. La figura 5 es un gráfico que ilustra los niveles de ARNm de pre-y postratamiento de los genes RRM1 y TS en 10 pacientes.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 **[0029]** Un objetivo importante de los esfuerzos actuales en la investigación del CPCNP es aumentar la eficacia de la terapia sistémica perioperatoria en pacientes con una resección quirúrgica completa a través de la incorporación de parámetros moleculares en decisiones terapéuticas clínicas. Como se describe en este documento, los niveles de expresión intratumorales del gen timidilato sintasa (TS) están correlacionados

20

con los resultados clínicos; y los niveles de TS y de ribonucleótido reductasa M1 (RRM1) están correlacionados con la respuesta del tumor al tratamiento con fármacos antimetabolitos sin platino.

#### **Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)**

25 **[0030]** Los métodos de diagnóstico del CPCNP son conocidos en la técnica. Los procedimientos de diagnóstico deben ser personalizados para el paciente individual y pueden incluir:

– Revisión de radiografías antiguas de tórax para excluir lesiones benignas de larga duración o para determinar la velocidad de una lesión maligna.

– Citología de esputo

30

– Broncoscopia, biopsia de lesiones endobronquiales, cepillados y lavados, citología de esputo postbroncoscopia.

– Mediastinoscopia para excluir metástasis inoperables en los ganglios linfáticos mediastinales.

– Biopsia percutánea con aguja fina

35

– Biopsia por escisión o con aguja de los depósitos secundarios de fácil

acceso. La verificación histológica o citológica del diagnóstico debe ser obtenida.

**[0031]** La estadificación también se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el sistema de clasificación TNM (Tumor/Nodo/Metástasis) de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) aceptado internacionalmente, tal como se describe en Mountain, Chest 111:1710-17 (1997); Pisters and Gail, J. Thoracic Oncol 2(7):583-584 (2007), Rami-Porta et al, J. Thoracic Oncol. 2 (7):593-602 (2007); Rusch et al, J. Thoracic Oncol. 2(7) :603-612 (2007); Postumus et al, J. Thoracic Oncol. 2(8):686-693 (2007); Groome et al, J. Thoracic Oncol. 2(8):694-705 (2007); Goldstraw et al, J. Thoracic Oncol. 2(8); 706-714 (2007). En resumen, "T", describe el tamaño del tumor y si ha invadido el tejido cercano, "N", describe cualquier ganglio linfático que esté involucrado y "M" describe la metástasis (propagación del cáncer de una parte del cuerpo a otra). De acuerdo con la escala TNM, el estadio 0 indica el carcinoma in situ, que es la presencia de un cáncer sólo en la capa de células en la cual empezó. Los estadios I, II, III, y IV indican el empeoramiento progresivo de los estadios de la enfermedad. Los estadios superiores indican una enfermedad más extendida como se evidencia por el tamaño más grande del tumor y/o la propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos y/u órganos adyacentes al tumor primario. En el estadio IV, el tumor se ha diseminado a por lo menos un otro órgano.

## 20 **Métodos de pronóstico**

**[0032]** Como se describe en este documento, los niveles de proteína TS, por ejemplo, proteína citoplasmática TS, se pueden utilizar para determinar un pronóstico, por ejemplo, para determinar la probabilidad de supervivencia durante un período prolongado. En estos métodos, se toma del sujeto una muestra que comprende células tumorales y se determinan los niveles de proteína TS mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en este documento. Por ejemplo, se pueden determinar sus niveles de expresión de proteína mediante un método de análisis cuantitativo in situ de expresión de proteínas, por ejemplo, mediante un análisis cuantitativo automatizado (AQUA), véase, por ejemplo, Camp et al., Nat. Med. 8:1323.-1327 (2002). La comparación de los niveles de TS en las células tumorales de la muestra con un nivel de referencia indica la evolución probable del sujeto. En algunos modos de realización, la comparación se realiza con un percentil(es) de punto de corte determinado por la expresión de la proteína TS en una cohorte de referencia como se describe en este documento. En algunos modos de realización, el punto de corte de referencia es un nivel de expresión que está alrededor del 89º percentil. Los sujetos por encima de ese punto de corte, por ejemplo, en el

11% más alto de los niveles de expresión, tienen una mayor probabilidad de supervivencia y los sujetos por debajo de ese punto de corte tienen un peor pronóstico. En algunos modos de realización, se utilizan dos puntos de corte de referencia, en un grupo inferior del 25%, grupo intermedio del 64% y grupo superior del 11%. Los sujetos que están dentro del 25% más bajo tienen el riesgo mayor de resultados adversos (muerte), los sujetos en el 64% medio tienen un nivel de riesgo medio y los sujetos en el 11% más alto tienen un riesgo más bajo. Véase, por ejemplo, el ejemplo y las figuras 2A-B. En algunos modos de realización, se toma una decisión en cuanto a la agresividad con la que tratar a un sujeto a partir de la información de pronóstico proporcionada por estos métodos. Por ejemplo, un sujeto con un riesgo más alto de resultados adversos se trata de manera más agresiva o con administración de modalidades de tratamiento adicionales, por ejemplo, radiación u otros agentes quimioterapéuticos como se describe en este documento.

#### **Métodos para determinar la terapia de cáncer**

15 **[0033]** Los métodos de determinación o selección de una terapia de cáncer adecuada incluyen la obtención o proporción de una muestra del tumor de un paciente y la determinación del nivel de expresión de RRM1 o de TS del paciente. Si los niveles intratumorales de RRM1 y de TS son bajos, se puede determinar que es apropiada una quimioterapia que contenga una combinación de gemcitabina y pemetrexed. Si los niveles intratumorales de RRM1 y/o de TS son altos, se puede determinar que es apropiada una quimioterapia que carezca de gemcitabina y pemetrexed.

20 **[0034]** Los niveles de expresión “bajos” y “altos” son valores relativos y están basados en una comparación con los de una cohorte de referencia. Una “cohorte de referencia”, como se usa en este documento, es una muestra de población con cáncer de la cual se recogen los datos de la expresión de RRM1 y/o de TS. El nivel de expresión de una cohorte de referencia se determina midiendo los niveles de expresión del gen intratumoral en la muestra de población (véase, por ejemplo, Rosell et al, Clin Cancer Res 10:1318-25, 2004; Lord et al, Clin Cancer Res. 8:2286-2291, 2002; Bepler et al, J Clin Oncol 22:1878-85, 2004; y Simon et al, Chest 127:978-83, 2005). Normalmente, un tumor muestra niveles “bajos” de RRM1 si el nivel de expresión es igual o menor que el nivel medio de expresión de RRM1 de la cohorte de referencia y el tumor muestra niveles “altos” de RRM1 si el nivel de expresión es mayor que el nivel medio de expresión de RRM1 de la cohorte de referencia. Del mismo modo, un tumor muestra niveles “bajos” de TS si el nivel de expresión es igual o menor que el nivel medio de expresión de TS de la cohorte de referencia. Los niveles de expresión “bajos” y “altos” son relativos y se pueden establecer con cada grupo nuevo de

referencia. En una alternativa, el nivel de expresión determinado para predecir la respuesta de un sujeto a una quimioterapia puede ser igual o menor que el nivel de expresión del tercio más bajo, o cuartil más bajo de una cohorte de referencia, o se puede determinar el nivel de expresión de predicción para que sea un nivel igual o mayor que el nivel de expresión del tercio más alto, o cuartil más alto, de una cohorte de referencia.

*Muestras tumorales*

**[0035]** Se puede utilizar cualquier método para obtener una muestra de tumor, como una biopsia (por ejemplo, biopsia con aguja gruesa) y se puede incrustar el tejido en OCT® (compuesto de corte óptimo de tejido) para procesamiento. Por ejemplo, el tejido en OCT® puede ser procesado como secciones congeladas. Las células tumorales se pueden recoger, por ejemplo mediante microdissección por captura láser (LCM por sus siglas en inglés), y se puede examinar la expresión génica mediante, por ejemplo, la transcripción inversa junto con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR por sus siglas en inglés) o el análisis de Northern blot para medir los niveles de ARN, o mediante Western blot, para medir los niveles de proteína. En un enfoque ilustrativo, se examina el nivel de expresión de RRM1 o de TS mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El nivel de expresión de estos genes también se puede determinar mediante técnicas de inmunohistoquímica, por ejemplo, en muestras fijadas, por ejemplo, fijadas con formalina.

*Cohorte de referencia*

**[0036]** Las muestras de una cohorte de referencia se toman de sujetos de la misma especie (por ejemplo, seres humanos) y los tumores de una cohorte de referencia son preferiblemente del mismo tipo (por ejemplo, tumores de un CPCNP). Por ejemplo, todos los tumores de una cohorte de referencia pueden ser, por ejemplo, carcinomas, tumores hematopoyéticos, tumores cerebrales o sarcomas. En algunos modos de realización, todos los tumores de una cohorte de referencia pueden ser, por ejemplo, de un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello o un cáncer de ovario. Los miembros individuales de una cohorte de referencia también pueden compartir otras similitudes, como similitudes del estadio de la enfermedad, regímenes de tratamiento previos, estilo de vida (por ejemplo, fumadores o no fumadores, sobrepeso o bajo peso), u otros datos demográficos (por ejemplo, edad, predisposición genética). Por ejemplo, además de tener el mismo tipo de tumor, los pacientes de una cohorte de referencia no pueden haber recibido cualquier quimioterapia sistémica anterior. Una cohorte de referencia debe incluir datos de análisis de expresión génica de muestras de tumores de al menos 10 sujetos,

por ejemplo, de 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80,90, 100, 120, 140, 160, 180, o 200 o más sujetos.

*Determinación de niveles de expresión génica y de proteínas*

5 **[0037]** Los niveles de expresión génica de una cohorte de referencia pueden ser determinados por cualquier método, como por RT-PCR cuantitativa, análisis Northern blot, análisis Western blot o inmunohistoquímica. Los niveles de expresión de una muestra de tumor de un sujeto de prueba se determinan de la misma manera que los niveles de expresión de la cohorte de referencia.

10 **[0038]** Las secuencias útiles de los presentes métodos, cuando se practican en seres humanos, incluyen, sin carácter limitativo, las siguientes:

- Secuencias RRM1: GenelD: 6240 - human RRM1 - NM\_001033.3 and NP\_001024.1; gene = NC\_000011.8 Reference assembly, Range 4072500-41 16682: NT\_009237.17, Range 2903165-2947347

15 - Secuencias TS: GenelD: 7298 - human TS NM\_001071.2 and NP\_001062.1; gene=NC\_00018.8 Reference assembly - Range 647651-663492; NT\_010859.14, Range 647651-663492

**[0039]** Cuando es conveniente determinar los niveles de proteína, por ejemplo, mediante Western Blot, se pueden utilizar los siguientes anticuerpos. Otros también pueden ser útiles.

20 - anti~RRM1 disponible en el mercado a través de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Novas Biologicals, Proteintech Group, Inc., y Abnova Corporation, entre otros.

- anti TS disponible en el mercado a través de Abeam, Serotec, Acris Antibodies GmbH, Invitrogen, Lab Vision, Millipore Corporation, Novus Biologicals, ProSci, Inc., Rockland Immunochemicals, Inc. y Santa Cruz Biotechnology, Inc., entre otros.

25 *Selección de un régimen terapéutico*

**[0040]** Se pueden tomar muestras del tumor para analizar los niveles de expresión de TS o de RRM1 o de ambos y se puede determinar una quimioterapia apropiada a partir de los niveles de expresión observados. La quimioterapia puede incluir un agente único o múltiples agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, dos, tres o más agentes quimioterapéuticos).

30 **[0041]** En un ejemplo, se determinan los niveles de expresión intratumoral de tanto RRM1 como de TS y se determina un agente quimioterapéutico apropiado a partir del nivel de expresión de ambos genes. Por ejemplo, si se determina que ambos niveles de expresión de RRM1 y de TS son bajos, se puede seleccionar una quimioterapia apropiada que incluye una combinación de gemcitabina y pemetrexed. Si se determina

35

que los niveles de RRM1 son bajos y se determina que los niveles de TS son altos, se puede determinar una quimioterapia apropiada que incluya gemcitabina y excluya pemetrexed y se puede incluir un segundo agente opcional, como una antitubulina o un agente alquilante. Dicha composición quimioterapéutica podría incluir un agente que contenga platino. Si se determina que los niveles de RRM1 son altos y se determina que los niveles de TS son bajos, una quimioterapia adecuada no debería incluir gemcitabina, pero puede incluir pemetrexed y un segundo agente opcional, como una antitubulina o un agente alquilante. Si se determina que los niveles de RRM1 y de TS son altos, se puede determinar una quimioterapia adecuada que incluya una antitubulina. La quimioterapia no debería incluir un antimetabolito.

#### *Tratamientos adicionales*

**[0042]** En general, los sujetos diagnosticados con CPCNP son tratados con resección quirúrgica, radiación y quimioterapias adyuvantes y/o neoadyuvantes, véase, por ejemplo, Kris et al, *Oncologist* 10 (Suppl.2):23-29 (2005). El estándar actual de cuidado para el tratamiento de CPCNP es la resección quirúrgica, cuando es viable, seguida de quimioterapia adyuvante en estadios II y III, véase Allen and Jahanzeb, *J. Natl. Compr.Cane.Netw.* 6(3):285-293. También se utilizan enfoques trimodales que implican la adición concurrente o secuencial de radioterapia. Por lo tanto, los métodos descritos en este documento pueden incluir el uso de cualquier modalidad de tratamiento adicional, por ejemplo, resección quirúrgica y/o radiación.

**[0043]** Otros agentes quimioterapéuticos también se pueden administrar con la combinación de antimetabolito, por ejemplo, antitubulina o agentes que contienen platino. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, L-asparaginasa, bicalatamida, bleomicina, camptotecina (CPT-11), carminomicina, ciclofosfamida, arabinósido de citosina, dacarbazina, dactinomicina, doxorubicina, daunorubicina, ecteinascidina 743, estramustina, etopósido, fosfato de etopósido, epotilona, flutamida, FK506, hexametil melamina, idatrexato, leflunomida, leuprolida, leurosidina, leurosina, melfalán, mitomicina C, micofenolato de mofetilo, plicamicina, podofilotoxina, porfiromicina, ranpimasa, rapamicina, topotecán, tenipósido y tiotepa.

#### *Posología y Administración*

**[0044]** Una quimioterapia, por ejemplo, la terapia de combinación de pemetrexed/gemcitabina seleccionada para el sujeto en función de los niveles de expresión de RRM1 y/o de TS como se describe en este documento, se puede administrar a un sujeto mediante regímenes de dosificación convencionales.

**[0045]** La quimioterapia puede administrarse mediante métodos estándar, incluyendo por vía oral, tales como en forma de pastilla, por vía intravenosa, con inyección en una

cavidad del cuerpo (por ejemplo, la vejiga), por vía intramuscular o por vía intratecal. Un régimen de quimioterapia se puede administrar como un régimen continuo, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía oral o en una cavidad corporal. Un régimen de quimioterapia puede administrarse en un ciclo que incluye el día o días en que se administra el fármaco seguido de un período de descanso y recuperación. El período de recuperación puede durar una, dos, tres o cuatro semanas o más, y entonces el ciclo se puede repetir. Un tratamiento de quimioterapia puede incluir al menos dos a doce ciclos (por ejemplo, tres, cuatro, cinco, seis, siete, diez o doce ciclos).

**[0046]** Los datos de expresión génica obtenidos a partir de los métodos presentados en este documento pueden ser combinados con información del historial clínico de un paciente, incluyendo datos demográficos, estado vital, educación, historial de abuso de alcohol, tabaco y drogas, historial médico y tratamiento documentado para ajustar las conclusiones relativas al pronóstico de una enfermedad proliferativa después de la administración de una quimioterapia diseñada como se describe anteriormente.

**[0047]** Después de la administración de una quimioterapia de acuerdo con los niveles de expresión intratumoral de RRM1 o de TS, se puede controlar al paciente para analizar una respuesta a la terapia. Por ejemplo, las medidas del tumor se pueden tomar antes y después de la administración de la quimioterapia para controlar la progresión de la enfermedad. Si el tamaño del tumor disminuye, se puede determinar que la enfermedad está en remisión o revirtiendo hacia la remisión. Una disminución parcial del tamaño del tumor puede indicar una enfermedad en remisión parcial, y si el tumor desaparece por completo, se puede decir que la enfermedad está en remisión completa. Si el tamaño del tumor aumenta, se puede determinar que la enfermedad está progresando. Si el tamaño del tumor no cambia después de la administración de la quimioterapia, la enfermedad puede clasificarse como estable.

**[0048]** Un sujeto también puede ser evaluado de acuerdo a su condición física, con especial atención a factores tales como pérdida de peso, derrame pleural y otros síntomas relacionados con el cáncer. Por ejemplo, los síntomas del cáncer de pulmón, incluyendo el carcinoma pulmonar de células pequeñas y no pequeñas, incluyen tos persistente, esputo manchado de sangre, dolor en el pecho y neumonía o bronquitis recurrente. La evaluación se puede utilizar para adaptar la dosis y el régimen de administración de la terapia de combinación de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

#### **Métodos de predicción de eficacia y métodos de cribado**

**[0049]** También se describen métodos para evaluar o predecir la eficacia de una composición que contiene un agente quimioterapéutico. Los métodos emplean por lo

menos dos líneas de células y una composición que contiene uno o más agentes quimioterapéuticos. Las líneas de células difieren en su nivel de expresión de RRM1 y/o de TS. Por ejemplo, una línea de células expresa un nivel menor de RRM1 que una línea de células de control estándar, o una línea de células expresa un nivel mayor de RRM1 que una línea de células de un control estándar. La línea de células de expresión mayor expresa preferiblemente al menos alrededor de un 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 200% o 300% más de RRM1 y/o de TS que una línea de células de expresión menor.

**[0050]** Cualquier manera de provocar una expresión aumentada o disminuida de RRM1 y/o de TS se puede utilizar. Por ejemplo, una línea celular que expresa un nivel más bajo de RRM1 y/o de TS puede ser diseñada para expresar un ARNsi o ARN antisentido que provoca el nivel de expresión más bajo. De forma alternativa, la expresión de RRM1 y/o de TS se puede colocar bajo control de un promotor regulable, como un promotor de respuesta a tetraciclina, IPTG o ecdisona. La expresión de RRM1 y/o de TS puede ser menor que la expresión en una cepa madre, o la expresión puede estar completamente ausente antes de la inducción. Las células que expresan niveles altos de RRM1 y/o de TS pueden contener un gen RRM1 y/o TS bajo control de un promotor constitutivo que expresa RRM1 y/o TS a un nivel más alto que el promotor de RRM1 y/o de TS endógeno, o RRM1 y/o TS puede estar expresado a partir de un promotor inducible, como un promotor de respuesta a tetraciclina o IPTG, de tal manera que la inducción conduce la expresión a un nivel mayor que el de la cepa madre. Una secuencia exógena que conduce un nivel más alto de expresión de RRM1 y/o de TS o dirige un nivel de expresión más bajo puede ser integrada de forma estable en el genoma de la cepa madre o puede ser transfectada temporalmente a la cepa madre.

**[0051]** Las células que expresan niveles altos y bajos de RRM1 y/o de TS se ponen en contacto con un agente quimioterapéutico o una combinación de agentes quimioterapéuticos candidatos (por ejemplo, 2, 3 o 4 agentes quimioterapéuticos) y las células se controlan para detectar un aumento de la sensibilidad o de la resistencia al agente o agentes quimioterapéuticos en comparación con una cepa de control. Un agente, o combinación de agentes, que causa un aumento de la sensibilidad en comparación con una línea celular se puede identificar como un agente terapéutico candidato para un paciente que tiene un tumor que expresa el nivel correspondiente de RRM1 y/o de TS.

**[0052]** En otro ejemplo, si las células que expresan niveles bajos de TS (es decir, niveles más bajos que una cepa madre de control) son más sensibles a un agente



quimioterapéutico que las células de la cepa de control, el agente es un agente terapéutico candidato para el tratamiento de un paciente con un tumor que expresa niveles bajos de TS. Si las células que expresan niveles altos de TS (es decir, niveles más altos que una cepa madre de control) son más sensibles a un agente quimioterapéutico que las células de la cepa de control, el agente es un agente terapéutico candidato para el tratamiento de un paciente con un tumor que expresa niveles altos de TS.

**[0053]** Los métodos descritos en este documento se pueden utilizar en ensayos de cribado para identificar agentes que son candidatos al tratamiento de tumores que expresan niveles altos o bajos de RRM1 y/o de TS. Las líneas celulares como las descritas anteriormente pueden ponerse en contacto con un panel de agentes (por ejemplo, fármacos de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos o polipéptidos) para identificar los agentes que causan un aumento de la sensibilidad de células que expresan niveles bajos o altos de RRM1 y/o de TS.

**[0054]** Los agentes identificados en los métodos de cribado anteriores, o agentes o combinaciones de agentes identificados por los métodos anteriores como quimioterapias candidatas pueden ser probados en modelos animales antes de ser probados en seres humanos. Por ejemplo, las terapias pueden ser probadas para analizar la capacidad de reducir el tamaño del tumor en modelos de ratones o primates, antes de ser probadas en seres humanos.

#### **Kits**

**[0055]** Los reactivos, herramientas y/o instrucciones para realizar los métodos descritos en este documento se pueden proporcionar en un kit. Por ejemplo, el kit puede contener reactivos, herramientas e instrucciones para determinar un tratamiento adecuado para un paciente de cáncer. Dicho kit puede incluir reactivos para la recogida de una muestra de tejido de un paciente, como por medio de biopsia, y reactivos para el procesamiento del tejido. El kit también puede incluir uno o más reactivos para realizar un análisis de la expresión génica, tales como reactivos para la realización de la RT-PCR, análisis de Northern blot, de Western blot o inmunohistoquímica para determinar los niveles de expresión de RRM1 y/o de TS en una muestra de tumor de un humano. Por ejemplo, los cebadores para la realización de la RT-PCR, las sondas para la realización de análisis de Northern blot, y/o anticuerpos para la realización de análisis de Western blot y de inmunohistoquímica pueden ser incluidos en dichos kits. Los tampones adecuados para los ensayos también se pueden incluir. Los reactivos de detección requeridos para cualquiera de esos ensayos también se pueden incluir.

**[0056]** Los kits presentados en este documento también pueden incluir una hoja de instrucciones que describe cómo llevar a cabo los ensayos para medir la expresión génica. La hoja de instrucciones también pueden incluir instrucciones para determinar una cohorte de referencia, incluyendo cómo determinar los niveles de expresión de RRM1 y/o de TS en la cohorte de referencia y cómo reunir los datos de expresión para establecer una referencia para su comparación con un sujeto de prueba. La hoja de instrucciones también puede incluir instrucciones para analizar la expresión génica en un sujeto de prueba y para comparar el nivel de expresión con la expresión de la cohorte de referencia para determinar posteriormente la quimioterapia apropiada para el paciente de prueba. Los métodos para determinar la quimioterapia apropiada se han descrito anteriormente y pueden estar descritos en detalle en la hoja de instrucciones.

**[0057]** En otro ejemplo, un kit presentado en la invención puede contener reactivos, herramientas e instrucciones para predecir la eficacia de un agente quimioterapéutico candidato en función de los niveles de expresión de RRM1 o de TS. Dicho kit puede incluir vectores para la modulación de los niveles de expresión de RRM1 o de TS en una célula y reactivos para el control del fenotipo celular, tales como reactivos para detectar la apoptosis. Los reactivos para determinar los niveles de expresión de RRM1 y de TS en las muestras de tejido también se pueden incluir como se ha descrito anteriormente.

**[0058]** El material informativo incluido en los kits puede ser descriptivo, educativo, de marketing u otro material que se refiera a los métodos descritos en este documento y/o al uso de los reactivos para los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, el material informativo del kit puede contener información de contacto, por ejemplo, dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustancial sobre la realización de un análisis de expresión génica y la interpretación de los resultados, especialmente ya que se refieren a la probabilidad de que un ser humano tenga una respuesta positiva a una quimioterapia específica.

**[0059]** Un kit puede contener recipientes separados, separadores o compartimentos para los reactivos y material informativo. Un recipiente puede ser marcado para su uso para la determinación de los niveles de expresión génica de RRM1 y de TS y la determinación subsiguiente de una quimioterapia apropiada para el ser humano.

**[0060]** El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto impreso, dibujo y/o fotografía, por ejemplo, una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en

otros formatos, como Braille, material en soporte informático, grabación de vídeo o grabación de audio. Naturalmente, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

EJEMPLOS

- 5 **[0061]** La invención se describe más extensamente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Expresión de la proteína timidilato sintasa (TS) in situ

**[0062]** La timidilato sintasa (TS) cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) en (desoxi)timidina monofosfato (TMP), que requiere la oxidación de  
 10 tetrahidrofolato a dihidrofolato. TMP es posteriormente fosforilado a TTP, que se requiere para la síntesis y reparación del ADN. 5-fluorouracilo (5FU) inhibe la síntesis de TMP y es un agente quimioterapéutico eficaz (Washtien, Mol Pharmacol 1934; 25:171-77; Moertel et al, N Engl J Med 1990; 322:352-58; Heidelberger et al, Nature 1957; 179(4561):663-6). Los altos niveles tumorales de TS se han asociado a la  
 15 resistencia a la quimioterapia basada en 5-FU, particularmente en pacientes con carcinoma colorrectal (CRC) y carcinoma gástrico (Johnston et al, Cancer Res 1995; 55 (7):1407-12; Leichman et al, J Clin Oncol 1997; 15(10):3223-9; Shirota et al, J Clin Oncol 2001; 19 (23):4298-304).

**[0063]** Ya que TS está aguas abajo de la ribonucleótido reductasa y es crucial para la  
 20 formación de uno de los desoxinucleótidos necesarios para la síntesis y reparación del ADN, el presente estudio se realizó para determinar si la expresión de TS a nivel de proteínas y de ARNm es pronóstico de la evolución de los pacientes con CPCNP de estadio I completamente resecado que no recibieron quimioterapia o radiación adicional y si la expresión de TS in situ está correlacionada con la expresión de  
 25 ERCC1 y RRM1.

**[0064]** Las dos poblaciones utilizadas en estos estudios consistieron en pacientes que se sometieron a una resección completa de CPCNP en el Moffitt Cáncer Center entre 1991 y 2001 y se ha descrito en otra parte (Zheng et al, N Engl J Med 2007; 356:800-08). En resumen, los pacientes tenían que tener enfermedad de estadio patológico IA  
 30 o IB; adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células grandes; sin quimioterapia o radiación perioperatoria, sin cáncer de pulmón previo y sin radiación previa en el pecho. Se identificaron 187 pacientes con tejido tumoral suficiente para la construcción de micromatrices de tejidos que componían la población para la evaluación de la expresión génica a nivel de proteína (tabla 1), 92  
 35 pacientes con tejido tumoral fresco congelado componían la población para la evaluación de la expresión génica a niveles de ARNm (tabla 2). Treinta y dos

pacientes con valores de expresión génica a niveles de proteína y de ARNm se superponían entre las dos poblaciones. El seguimiento recomendado fue de tres visitas mensuales durante dos años, seis visitas mensuales durante tres años y, después, visitas anuales. Para la supervivencia global, el tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte fue registrado y verificado mediante registros de estadísticas vitales.

**[0065]** El anticuerpo monoclonal TS utilizado para el estudio estaba disponible en el mercado a través de Lab Vision Corporation (orden # MS-471-P, lote # 471P504B). Se generó en ratones por medio de TS humano recombinante como antígeno. El anticuerpo eliminó una banda dominante de aproximadamente 38 kD, la masa molecular esperada de TS, con localización citoplasmática en Western blots de lisados de línea celular de cáncer de pulmón H23 (Fig. 1). El Western blot se realizó de la manera siguiente. Extractos citoplasmáticos y nucleares de cultivos permanentes modificados genéticamente de la línea celular NCI-H23 se prepararon por medio de una kit de fraccionamiento nuclear/de citosol (BioVision, Mountain View, CA). Los extractos de proteínas (50 µg) se separaron por medio de geles de tris-glicina Novex 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa pura (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas se incubaron con anticuerpo TS (clon de ratón TS-106, 1:200, Lab Vision Corp.), antisuero Oct-I (# 3342-100, 1:1000, BioVision, Mountain View, CA) y antisuero CAPDH (# sc-20357, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a 4°C durante la noche. Las bandas de proteína se visualizaron con anticuerpo secundario de peroxidasa de rábano picante de IgG anti-conejo y anti-ratón o anti-cabra (1:1000; Santa Cruz) y sustrato de quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL). El gen doméstico GAPDH se utilizó como control de carga igual.

**[0066]** Se utilizó un microscopio confocal para determinar la localización subcelular de la proteína TS, de la siguiente manera. Se cultivaron líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón (H23, H125, H292, H322, A549) y líneas celulares de carcinoma de colon (H498, H508, H747, SNU-C2A, SNUC4) directamente en portaobjetos para cámara Lab-Tek. Las células adherentes se lavaron en tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés), se fijaron por incubación durante 20 min, en paraformaldehído 4% en PBS, y se lavaron en PBS. Se permeabilizaron durante 1 hora en Triton-X100/PBS 0,25% y se lavaron en PBS. Los anticuerpos TS (1:100) se diluyeron en tampón de unión (1% BSA/0.1NP40/PBS%), se añadieron a las cámaras y se incubaron durante 1 hora. Después de lavarlos en PBS, los portaobjetos se incubaron durante 45 min. con diluciones 1:500 de IgG anti-ratón Alexa Fluor 555 (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR). Los portaobjetos se lavaron con PBS y se

5 cubrieron con reactivo antifade ProLong Gold con DAPI (Molecular Probes, Invitrogen). Como controles negativos, se realizó el mismo procedimiento sin anticuerpo primario. Las muestras fueron vistas con un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 con un objetivo de inmersión en agua de 63x / L20NA. Los núcleos fueron visualizados con DAPL. Las imágenes fueron producidas con detector fotomultiplicador dual y la suite de software 3.2.0.115 versión LSM 5.

10 **[0067]** Los resultados indicaron que se confirmó la localización citoplasmática predominante de TS en 5 líneas celulares de cáncer de pulmón (Fig. 2A); sin embargo, la expresión nuclear de TS se observó en todos, y la menor fue en H23 y la mayor, en A549. En contraste, en 5 líneas celulares derivadas de carcinoma de colon, la expresión de TS fue predominantemente nuclear.

15 **[0068]** Para crear micromatrices de tejidos, se recogieron muestras de tumor de forma prospectiva, se fijaron en formalina tamponada neutra (10% v/v) y se incrustaron por completo en parafina. Se realizó una tinción hematoxilina-eosina en secciones de tejido completas y se marcaron áreas tumorales representativas. Se perforaron núcleos de tejido de un diámetro de 0,6 mm y se dispusieron en un bloque receptor utilizando un arrayer tisular (Beecher Instrument, Silver Spring, MD). Se cortaron secciones de 5 µm de espesor, se transfirieron a portaobjetos recubiertos adhesivos de 4x (Instrumedies, NJ) y se expusieron a luz UV durante 30 segundos para mejorar la adherencia.

20 **[0069]** La expresión de la proteína TS in situ se determinó mediante AQUA en el citoplasma del tumor en dos réplicas de micromatrices de tejidos que abarcaban un total de 187 pacientes con CPCNP completamente resecado que no habían recibido quimioterapia o radiación perioperatoria.

25 **[0070]** La inmunohistoquímica (IHC por sus siglas en inglés) basada en la inmunofluorescencia combinada con análisis cuantitativo automatizado (AQUA) se utilizó para evaluar la expresión in situ de las moléculas diana. 13 antígenos fueron recuperados por medio del tratamiento por horno microondas durante 15 minutos en 0,01 mol/L de citrato de sodio a pH 6,0. Los portaobjetos fueron bloqueados durante 30 minutos con 0,3% de albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) y después fueron incubados durante la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (clon de ratón TS-106, 1:30, # MS-471-P, Lab Vision Corp., Fremont, CA). Para la identificación de células de carcinoma, se utilizó un antisuero para citoqueratina (pancitoqueratina antihumana de conejo AE1/AE3, 1:200, # Z0622, Cytomation Dako). Los portaobjetos se lavaron y se incubaron con dos anticuerpos secundarios diferentes durante 1 hora (Envision® calificado de anti-ratón de

polímero HRP, # K4007, y anticonejo de cabra Alexa 555, # A21429, 1:200, Dako Cytomation). Para la amplificación de fluorescencia, los portaobjetos fueron expuestos a Cy5-tiramida (1:50) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se montaron con reactivo Prolong Gold antifade con solución DAPI (4'6'diamidino-2-fenilindole). Los portaobjetos finales de micromatriz de tejido se escanearon con SpotGrabber y los datos de imagen se analizaron con AQUA (PM-2000, HistoRx, New Haven, Connecticut). La puntuación AQUA más baja posible es 0 y la más alta es 255.

**[0071]** Los resultados se muestran en la figura 2B. Los datos de expresión de TS se obtuvieron en 160/187 (86%) pacientes. Los datos de expresión duplicados no estaban disponibles para 27 muestras porque los puntos estaban ausentes en la sección o se habían lavado durante el procesamiento. Los valores medios oscilaron desde 5,8 hasta 238,6 (en una escala de 0 - 255) con una mediana de 98,4 y una media de 98,3 (desviación estándar de 53,0). Los datos estaban cerca de una distribución normal, y no se realizó una transformación de datos para su normalización. Hubo una correlación significativa en la expresión de TS entre las matrices de réplica ( $r=0,599$ ,  $p \leq 0,001$ ).

**[0072]** No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la expresión de la proteína TS y el estadio tumoral, la histología, el estado funcional, la ausencia o presencia de pérdida de peso, el hábito de fumar o el sexo (tabla 1). Los diámetros unidimensionales del tumor en esta cohorte de pacientes oscilaron de 0,5 a 10,8 cm y no se correlacionaron significativamente con la expresión de TS ( $r=0,051$ ,  $p=0,52$ ). No hubo correlación significativa con los niveles de proteína RRM1 y ERCC1 presentados anteriormente ( $r=0,13$  y  $\sim 0,07$  respectivamente,  $p > 0,1$ ) (Zheng et al, N Engl J Med 2007; 356:800-08).

**Tabla 1: Características del paciente, expresión de la proteína TS y supervivencia**

	Características del paciente			TS mediante AQUA		
	N (187)	Mediana de supervivencia global [meses]	valor $p$ de log rank	Mediana	N (160)	valor $p$ de Kruskal Wallis
<b>Estadio</b>						
IA	85	100,5	,019	99,6	71	,818
IB	102	62,2		97,3	89	

<b>Histología</b>						
Adeno	78	72,0	,061	98,4	67	,427
BAC	18	87,4		84,6	17	
Escamosa	68	101,8		101,5	55	
Célula grande	23	41,8		93,3	21	
<b>Estado funcional</b>						
0	128	79,0	,034	99,8	109	,191
1	48	52,7		90,4	41	
<b>Pérdida de peso &gt;5% en 3 meses</b>						
ausente	159	74,9	,823	94,3	133	,278
presente	14	81,3		102,9	14	
<b>Hábito de fumar</b>						
Nunca	11	NA*	,077	101,2	8	,326
Ex fumador	113	77,9		94,4	98	
Activo	49	61,4		105,0	41	
<b>Sexo</b>						
Mujeres	86	81,3	,143	103,6	73	,284
Hombres	101	69,4		91,6	87	
*NA, no alcanzado						

**[0073]** Con el método log-rank máximo para la determinación del punto de corte óptimo, la diferencia de supervivencia global más significativa se observó si los pacientes con niveles de  $\leq 57,02$  se separaron de aquellos con niveles de  $> 57,02$ , que eran el 25º percentil (40/160 pacientes) de la expresión de TS (Fig. 3A). La mediana de supervivencia del grupo con TS baja fue de 51,7 meses y fue de 81,3 meses para aquellos del grupo con TS alta ( $p=0,0013$ ). Esta diferencia en la supervivencia continuó siendo significativa después de ajustar el valor  $p$  a múltiples aspectos ( $p=0,034$ ).

10 **[0074]** En el modelo multivariado final, que incluye la expresión de la proteína TS y el estadio del tumor (tabla 2), TS continuó estando significativamente asociada con la supervivencia global ( $p$  0,0013,  $p$  ajustada=0,032). El índice de riesgo de muerte fue de 0,45 para la expresión de la proteína TS alta frente a la baja.

**Tabla 2: Modelo de regresión de Cox**

Variable	N	Índice de riesgo univariado (IC* 95%)	valor $p$ univariado	Índice de riesgo multivariado ** (IC 95%)	valor $p$ multivariado
Grupo TS (baja = referencia)	160	0,46 (0,28 – 0,75)	0,040**	0,45 (0,28 – 0,73)	0,032***
Estadio (IA = referencia)	160	1,72 (1,06 – 2,76)	0,029	1,76 (1,08 – 2,87)	0,022
Sexo (mujeres = referencia)	160	1,23 (0,77 – 1,96)	0,393		
Expresión de ERCC1	160	0,994 (0,986 – 1,002)	0,130		
Expresión de RRM1	160	0,988 (0,975 – 1,002)	0,095		
Estado funcional (0 = referencia)	150	1,46 (0,87 – 2,44)	0,156		

\*IC. intervalo de confianza  
 \*\*, basado en 160 pacientes, ya que se eliminaron los estados funcionales del análisis multivariado final  
 \*\*\*, valor  $p$  ajustado para representar la selección de punto de corte óptimo

**[0075]** Además del análisis de supervivencia previsto, se realizaron exámenes exploratorios de la asociación de la expresión de TS y la supervivencia. La expresión de TS se incluyó en un análisis de regresión de Cox como una variable continua y dio lugar a un valor  $p$  bajo tanto no ajustado ( $p=0,0061$ ) como ajustado al estadio tumoral ( $p=0,002$ ). También se encontró un segundo punto de corte para la expresión de la proteína TS, con una puntuación AQUA de 129,33 (89° percentil). La inclusión de este punto de corte en el análisis de la supervivencia dio lugar a una clasificación de los pacientes en tres grupos de supervivencia (Fig. 3B). La mediana de supervivencia en el grupo con TS más alta fue >120 meses, fue de 80,9 meses en el grupo con TS media y de 51,7 meses en el grupo con TS más baja ( $p=0,002$ ).

**[0076]** Un dicotomización de los datos de expresión de TS utilizando la mediana de la muestra de 98,4 como un punto de corte reveló una mediana de supervivencia global de 81,3 meses para los pacientes con expresión de TS alta y 62,2 meses para aquellos con la expresión de TS baja ( $p=0,071$ ).

**[0077]** El análisis estadístico de este ejemplo se realizó como sigue. Los valores medios de las puntuaciones de AQUA de dos lecturas repetidas se calcularon y se



trataron como variables continuas independientes. El promedio de expresión de ARNm de TS se calculó a partir de las lecturas por triplicado y se trató como una variable continua independiente. El principal objetivo fue evaluar la asociación entre la expresión de la proteína TS in situ y la supervivencia global. Para ello, la expresión de TS no se clasificó en categorías alta y baja a priori. En cambio, el método logrank máximo se utilizó para la determinación de un punto de corte óptimo y ajustó los valores  $p$  a múltiples aspectos (Miller y Siegmund, Biometrics 1982, 38, 1011-1016; Hilsenbeck and Clark, Stat Med 1996; 15(1):103-12). Se consideraron los puntos de corte dentro del 80% central de la expresión de la proteína TS ordenada. La asociación entre supervivencia y expresión de TS baja y alta se resumió en una curva de supervivencia de Kaplan-Meier utilizando el percentil(es) de punto de corte determinado por la expresión de la proteína TS. Se realizó un análisis de regresión de Cox multivariado mediante la eliminación hacia atrás con una importancia nivel-estadio de 0,15 para evaluar el impacto de la expresión de la proteína TS en la supervivencia a la vez que se ajustó a las posibles covariables de estadio del tumor, estado funcional, sexo, expresión de la proteína RRM1 y expresión de la proteína ERCCI. La expresión de las proteínas RRM1 y ERCC1 se incluyeron como variables continuas. Ya que la división dicotómica de la expresión de la proteína TS se obtuvo mediante selección óptima, se ajustó su valor  $p$  de regresión de Cox. El método logrank máximo para la determinación de punto de corte óptimo también se utilizó para examinar la asociación de la expresión de ARNm de TS y la supervivencia global.

**[0078]** Las asociaciones entre variables continuas se analizaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Las asociaciones entre variables continuas y discretas se analizaron mediante el test de Wilcoxon o el test de Kruskal-Wallis en función del número de grupos discretos. El test logrank se utilizó para evaluar las diferencias de supervivencia entre grupos demográficos y clínicos.

**[0079]** Mediante un enfoque estadístico riguroso para explicar las múltiples pruebas, los resultados demuestran que el aumento de la expresión citoplásmica de TS se asoció con una supervivencia prolongada. Dos análisis exploratorios apoyaron este hallazgo. En primer lugar, si hubiéramos elegido a priori buscar una disminución del riesgo de muerte con el aumento de los niveles de TS del análisis de regresión de Cox, se habría obtenido un resultado estadísticamente significativo ( $p=0,006$ ). En segundo lugar, el riesgo de muerte cambia dramáticamente en dos niveles distintos de expresión de TS, 57,02 y 129,33. Este modelo de supervivencia dividió a los pacientes en un grupo inferior 25%, un grupo medio 64% y un grupo superior 11%.

Ejemplo 2 - Expresión de mRNA de TS

[0080] La expresión de ARNm de TS se determinó en muestras de tumor fresco congelado de 92 pacientes con CPCNP de estadio 1 completamente resecado de la manera siguiente. Las muestras de tumor fresco congelado se habían recogido de forma prospectiva en 92 pacientes que cumplían los mismos criterios de selección como se describe en el ejemplo 1 (tabla 3).

**Tabla 3: Características del paciente, expresión de ARNm de TS y supervivencia**

	Características del paciente			TS mediante RTPCR		
	N (92)	Mediana de supervivencia global [meses]	valor <i>p</i> de log rank	Mediana	N (85)	valor <i>p</i> de Kruskal Wallis
<b>Estadio</b>						
IA	39	NA*	,671	3,42	37	,642
IB	53	74,9		3,65	48	
<b>Histología</b>						
Adeno	41	62,2	,642	2,25	39	,002
BAC	7	87,4		0,50	6	
Escamosa	33	NR		4,73	30	
Célula grande	11	69,4		5,08	10	
<b>Estado funcional</b>						
0	52	80,4	,771	3,47	52	,853
1-2	33	62,1		3,87	26	
<b>Pérdida de peso &gt;5% en 3 meses</b>						
ausente	75	80,4	,020	3,52	69	,703
presente	6	34,1		5,60	6	
<b>Hábito de fumar</b>						
Nunca	6	31,2	,898	4,53	4	,057
Ex fumador	55	74,9		2,26	51	
Activo	27	88,2		5,16	26	
<b>Sexo</b>						
Mujeres	39	88,2	,605	4,04	35	,652
Hombres	53	74,9		2,33	50	
* NA, no alcanzado						

**[0081]** Se aisló ARN de las muestras de tumor con >60% de células que formaban el tumor y se generó ADNc mediante oligo-DT y cebadores aleatorios con transcriptasa inversa (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Valencia, CA). Aproximadamente el 5 ng de muestra de ADNc se utilizó por triplicado para el análisis de la expresión de TS con tecnología en tiempo real (ABI 7900HT, Foster City, CA). La cantidad relativa de ARNm de TS en una muestra se determinó comparando el ciclo umbral con la curva estándar, y la cantidad estandarizada se determinó después dividiendo la cantidad de TS (ABI, HS00426591-ml, tamaño de amplicón de 87 pb) entre la cantidad de 18SrRNA (ABI, # 4319413E).

**[0082]** Los datos se obtuvieron de 85 pacientes (92%) y la expresión osciló desde 0,2 hasta 104,3 con una mediana de 3,5 y una media de 6,7 (desviación estándar de 12,9). Los niveles de ARNm no se asociaron significativamente con el estadio tumoral, el estado funcional, el estado, ausencia o presencia de pérdida de peso, el hábito de fumar o el sexo (tabla 3). Sin embargo, fueron significativamente diferentes entre los subtipos histológicos; los niveles fueron más bajos en adenocarcinomas en comparación con los carcinomas de células escamosas y grandes (tabla 3). Los diámetros tumorales unidimensionales de esta cohorte de pacientes oscilaron entre 1,4 y 10,8 cm y no se correlacionaron con la expresión de TS ( $r=0,165$ ,  $p=0,218$ ).

**[0083]** El método log-rank máximo se utilizó para la determinación del punto de corte óptimo y no se encontró punto de corte estadísticamente significativo para la expresión de ARNm de TS después de ajustarlo a múltiples aspectos ( $p$  ajustada  $> 1,0$ ).

**[0084]** Treinta y dos pacientes fueron comunes a ambos conjuntos de datos y, por lo tanto, tenían valores de expresión de TS a niveles tanto de proteína como de ARNm. Hubo una correlación casi de cero entre los niveles ( $r=0,028$ ,  $p=0,877$ ).

**[0085]** El análisis estadístico se realizó como se describe en el ejemplo 1.

**[0086]** Estos resultados, que no lograron detectar una asociación entre la expresión de la proteína TS y de ARNm por medio de métodos específicamente desarrollados para análisis cuantitativo, concuerdan con un informe más reciente que demuestra una falta de correlación entre los niveles de proteína y de ARNm en cánceres de pulmón para la mayoría de los genes (Chen et al, Mol Cell Proteómica 2002; 1(4):304-13).

Ejemplo 3 - Eficacia clínica y marcadores moleculares predictivos de Gemcitabina y Pemetrexed neoadyuvantes en cáncer de pulmón resecable de células no pequeñas

**[0087]** La incorporación de quimioterapia con platino en el tratamiento del cáncer de pulmón resecable de células no pequeñas (CPCNP) se ha convertido en el estándar de cuidado para los pacientes con enfermedad metastásica en los ganglios linfáticos Ni o N2 (The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. N Engl J

Med 2004; 350:351-360; Winton et al, N Engl. J Med 2005; 352:2589-2597; Douillard et al, Lancet Oncol 2006; 7:719-727). El tratamiento neoadyuvante da lugar a tasas de respuesta de aproximadamente 33-64% (Depierre et al., J Clin Oncol 2002; 20:247-253; Scagliotti, Proc Am Soc Clin Oncol 2005; 23:626s; Gilligan et al., Lancet 2007; 5 369:1929-1937; Pisters et al, Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25:389s) y la terapia adyuvante aumenta la supervivencia global absoluta en aproximadamente un 5-15% (The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. N Engl J Med 2004; ,350:351-360; Winton et al., N Engl J Med 2005; 352:2589-2597; Douillard et al., Lancet Oncol 2006; 7:719-727). Sin embargo, el enfoque de tratamiento de todos los 10 pacientes con un régimen que contiene platino puede haber llegado a un nivel estable en cuanto a su eficacia. Además, hay una toxicidad significativa asociada a este enfoque que incluye una mortalidad relacionada con el tratamiento de aproximadamente un 1-2% (The International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group. N Engl J Med 2004; 350:351-360; Pisters et al., Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 15 25:389s). La incorporación de las características moleculares del tumor en las decisiones terapéuticas puede mejorar la eficacia y reducir la toxicidad.

**[0088]** Este ejemplo describe un ensayo de una sola institución de gemcitabina y pemetrexed neoadyuvante en pacientes con CPCNP reseccable con el objetivo de describir la eficacia clínica y la tolerancia del régimen elegido y de investigar la utilidad 20 predictiva de la expresión de ARNm de los genes implicados en el metabolismo de estos fármacos en la eficacia terapéutica.

**[0089]** Quimioterapia de inducción y toxicidad: Un total de 52 pacientes que reunían las condiciones necesarias, 26 hombres y 26 mujeres, entre las edades de 41 a 83 años (media de 67 años), recibieron al menos una dosis de quimioterapia. Participaron 25 entre abril de 2004 y abril de 2006 y sus características se describen en la tabla 4.

**[0090]** La estadificación clínica se determinó mediante examen físico, tomografía computarizada de tórax y abdomen superior (TC), tomografía por emisión de positrones FDG (PET, por sus siglas en inglés) de todo el cuerpo, imagen por resonancia magnética del cerebro (IRM), broncoscopia y mediastinoscopia. Para reunir 30 las condiciones, fueron necesarios la confirmación histológica del CPCNP; un estadio 1B-III A y III B seleccionado (2 lesiones en un lóbulo, T4), una edad >18 años, un estado funcional (PS) de 0-1, enfermedad medible por Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST por sus siglas en inglés) y ningún tratamiento previo para el cáncer de pulmón. Estos criterios fueron cumplidos por 52 pacientes.

35 **[0091]** La quimioterapia preoperatoria con gemcitabina 1500 mg/m<sup>2</sup> seguida de pemetrexed 500 mg/m<sup>2</sup> se administró en los días 1, 15, 29 y 43. Las dosis posteriores

de quimioterapia fueron retrasadas o reducidas a cause de su toxicidad si fue apropiado. Los pacientes recibieron folato oral en una dosis diaria de 350-1.000ug y vitamina B12 subcutánea en una dosis de 1.000ug cada 9 semanas comenzando una semana antes de la quimioterapia. Todas las toxicidades fueron clasificadas de acuerdo con los criterios de toxicidad comunes (CTC, versión 3.0).

**[0092]** Después de la quimioterapia, se repitieron las TC y PET entre los días 50 y 63. La respuesta radiográfica se expresó como una variable continua al calcular el porcentaje de cambio en la suma de todos los diámetros de tumor más grandes comparando las TC post-tratamiento y pre-tratamiento ( $1 - [\text{suma post lesiones} / \text{suma pre lesiones}] \times 100$ ) y también mediante RECIST como mejor respuesta global.

**[0093]** Los pacientes con enfermedad resecable recibieron toracotomía entre los días 64 y 77. La cirugía recomendada fue lobectomía o neumonectomía con disección de ganglios linfáticos mediastinales. Se desaconsejó la segmentectomía o resección en cuña. Los pacientes con enfermedad no resecable y aquellos con resecciones incompletas fueron tratados a discreción de su médico. Todos los pacientes fueron seguidos en intervalos de 3 meses y durante 2 años con una TC.

**[0094]** Cuarenta y dos pacientes recibieron toda la quimioterapia prevista a tiempo y sin reducción de dosis. Tres pacientes tuvieron retrasos de dosis sin reducciones de dosis. Las razones fueron una celulitis de las extremidades inferiores de grado 3, una trombocitopenia de grado 2 y una elevación de las enzimas hepáticas de grado 3. Siete pacientes recibieron menos de las 4 terapias quincenales previstas. Tres pacientes recibieron sólo el primer ciclo debido a fiebre neutropénica de grado 3 con insuficiencia renal, una reacción febril a los fármacos de grado 3 y un paciente solicitó una intervención quirúrgica inmediata sin haber experimentado efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Tres pacientes sólo recibieron los ciclos I y 2. Las razones fueron flebitis en extremidad inferior de grado 3 en un paciente y fatiga de grado 3 en dos. Un paciente murió después del ciclo 3 a causa de una neumonía de etiología probablemente viral; sin embargo, no se podría excluir una etiología posiblemente relacionada con el tratamiento.

**Tabla 4: Características del paciente, respuesta a la enfermedad y supervivencia**

	Tasa de respuesta a la radiografía <sup>1</sup>	Tasa de respuesta a la patología <sup>2</sup>	Mediana de supervivencia general	Mediana de supervivencia sin enfermedad <sup>3</sup>
<b>Todos los pacientes</b> N=52	35% (17/49)	30% (13/43)	>28,0 m	>21,1 m
<b>Edad</b> mediana (rango) 67 y (41-83)				
< 67 y N=26	38% (9/24)	25% (6/24)	>28,0 m	>21,1 m
≥ 67 y N=26	32% (8/25)	33% (7/21)	>28,0 m <i>p</i> =0,86	21,0 m <i>p</i> =0,40
<b>Sexo</b>				
mujeres N=26	32% (8/25)	27% (6/22)	>28,0 m	21,1 m
hombres N=26	38% (9/25)	33% (7/21)	>28,0 m <i>p</i> =0,78	>21,1 m <i>p</i> =0,90
<b>Estado funcional</b>				
cero N=31	36% (10/28)	36% (10/28)	>28,0 m	>21,1 m
uno N=21	33% (7/21)	20% (3/15)	16,8 m <i>p</i> =0,005	>21,1 m <i>p</i> =0,70
<b>Pérdida de peso<sup>4</sup></b>				
ausente N=47	34% (15/44)	31% (12/39)	>28,0 m	>21,1 m
presente N=5	40% (2/5)	25% (1/4)	16,1m <i>p</i> =0,04	9,1 m <i>p</i> =0,30
<b>Hábito de fumar<sup>5</sup></b>				
Activo N=23	30% (6/20)	21% (4/19)	>28,0	21,1 m
Ex fumador (>1y) N=27	41% (11/27)	36% (8/22)	>28,0 m <i>p</i> =0,35	>21,1 m <i>p</i> =0,70
Nunca N=2	NA <sup>6</sup> (0/2)	NA (1/2)		
<b>Histopatología<sup>7</sup></b>				
escamosa N=19	39% (7/18)	22% (4/18)	>28,0 m	>21,1 m
no escamosa N=33	32% (10/31)	36% (9/25)	>28,0 m <i>p</i> =0,99	>21,1 m <i>p</i> =0,91
<b>Estadio</b>				
I N=16	31% (5/16)	27% (4/15)	>28,0 m	20,7 m
II N=18	38% (6/16)	29% (4/14)	>28,0 m <i>p</i> 0,77	>21,1 m <i>p</i> =0,58
III <sup>8</sup> N=18	35% (6/17)	36% (5/14)	>28,0 m	>21,1 m

<b>Resección de tumor</b>						
completa	N=40	37% (14/38)	33% (13/39)	>28,0 m		>21,1 m
incomp./no realizada	N=12	27% (3/11)	0% (0/4)	12,9 m	p=0,22	NA p=NA
<b>Respuesta a la quimioterapia<sup>9</sup></b>						
CR/PR	N=17	NA (17/17)	38% (6/16)	27,4 m		18,2 m
SD	N=29	NA (0/29)	24% (6/25)	>28,0 m	p=0,67	>21,1 m p=0,24
PD	N=3	NA (0/3)	0% (0/1)	>28,0 m		

Leyenda de la tabla 4:

<sup>1</sup>no evaluado en tres pacientes; <sup>2</sup>no evaluado en nueve pacientes; <sup>3</sup>en los 40 pacientes con resección de tumor completa; <sup>4</sup>igual o mayor que 5% durante los tres meses anteriores al diagnóstico; <sup>5</sup>se definió a un fumador que nunca ha fumado como una persona que había fumado menos de un total de 100 cigarrillos; <sup>6</sup>NA, no aplicable; <sup>7</sup>21 pacientes tuvieron adenocarcinoma incluyendo 5 con características bronquioloalveolares, 12 tenían otros subtipos de CPCNP incluyendo 2 carcinomas adenoescamosos, 2 carcinomas adeno~ y escamosos mixtos, y 1 carcinoma de células grandes con características neuroendocrinas sugestivas; <sup>8</sup>dos T4N0, T4 debido a dos nódulos tumorales separados en un lóbulo único del pulmón; <sup>9</sup>las categorías de respuesta de enfermedad patológica pPR y pNR no fueron significativamente asociadas con supervivencia global OS (índice de riesgo de pPR vs. pNR = 1,1, p = 0,90) o supervivencia sin enfermedad DFS (índice de riesgo de pPR vs. pNR = 0,87, p = 0,78)

**[0095] Respuesta radiográfica a la quimioterapia:** Fue posible una evaluación de la respuesta radiológica en 49 pacientes. La mejor respuesta general fue una remisión completa (CR) en 1 (2% 95% IC: 01-10,9% paciente, fue una remisión parcial (PR) en 16 (33%; 95% IC: 20.0-47.5%), enfermedad estable (SD) en 29 (59%; 95% CI: 44,2-73,0%) y enfermedad progresiva (PD) en 3 (6%; 95% CI: 1,3-16,9%) pacientes. La respuesta osciló entre un aumento del 95% y una disminución del 100% del tamaño de las lesiones medibles (figura 3A). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la respuesta radiográfica de la enfermedad y los parámetros clínicos de edad (p=0,62), sexo (p=0,96), estado funcional (p=0,94), pérdida de peso (p=0,88), hábito de fumar (p=0,85), histología del tumor (p=0,95) y estadio (p 0,31) (tabla 4).

**[0096] Respuesta patológica a la quimioterapia:** una evaluación de la respuesta patológica se realizó mediante la determinación de la proporción de material necrótico y/o fibrótico en la evaluación microscópica de luz de muestras de resección quirúrgica tintadas con hematoxilina-eosina. Esto fue posible en 43 pacientes, y osciló entre 0-90%. Ninguno de los pacientes tuvo una CR patológica (≥ 95% de necrosis/fibrosis),

13 (30%) tuvieron una PR patológica (50-94% de necrosis/fibrosis y 30 (70%) no tuvieron respuesta patológica (pNR). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la respuesta patológica de la enfermedad y los parámetros clínicos de edad ( $p=0,39$ ), sexo ( $p=0,65$ ), estado funcional ( $p=0,18$ ), pérdida de peso ( $p=0,69$ ), hábito de fumar ( $p=0,96$ ), histología del tumor ( $p=0,43$ ) y estadio ( $p=0,66$ ). Aunque se encontró correlación entre respuesta radiográfica y patológica (rho de Spearman=0,23, es decir, una mejor respuesta clínica fue asociada a una mayor proporción de necrosis y fibrosis), no fue estadísticamente significativa ( $p=0,14$ ).

10 **[0097] Tratamiento quirúrgico:** Se realizó una toracotomía a 46 pacientes y dio lugar a una resección completa en 40 pacientes. A treinta y dos pacientes se les practicó una lobectomía, a 2 se les practicó una bilobectomía, a 8 se les practicó una neumonectomía, a 2 se les practicó una resección en cuña y a 2 no se les practicó resección de tumor. En la resección quirúrgica, 17 pacientes bajaron de estadio, 17 no sufrieron cambios y 12 subieron de estadio en comparación con la estadificación inicial. Un paciente murió 2,7 meses después de una lobectomía completa central y superior derecha por un carcinoma de células escamosas T2N1 de una fístula broncopleuraleal.

15 **[0098] Supervivencia:** A 8 de febrero de 2008, habían ocurrido 20 sucesos y 32 pacientes estaban vivos (5 con una recurrencia y 5 con una resección incompleta). La mediana de supervivencia global fue de >28,0 meses y la mediana de supervivencia sin enfermedad de los pacientes con una resección quirúrgica completa fue de >21,1 meses (figura 4). Las tasas de supervivencia global a 12 meses y 24 meses fueron de 84,6% (95% IC: 71,6-92,0%) y de 71,0% (95% IC: 56,5-81,4%) y las tasas de supervivencia sin enfermedad correspondientes fueron de 67,5% (95% IC: 50,7-79,7%) y 53,0% (95% IC: 36,0-67,4%), respectivamente. La respuesta radiográfica o patológica a la quimioterapia no se asoció significativamente con la supervivencia global o a la supervivencia sin enfermedad (tabla 4).

25 **[0099] Variables farmacogenómicas predictoras de la respuesta de la enfermedad:** Muestras de pre-tratamiento de tumores de cantidad y calidad suficientes para el análisis de la expresión génica mediante RTPCR en tiempo real estuvieron disponibles en 10 y muestras de post-tratamiento en 35 pacientes. Se evaluó si la terapia con gemcitabina y pemetrexed alteraría los niveles de ARNm de RRMI y de TS.

30 **[0100]** Las muestras tumorales fueron recogidas antes y después de la terapia como muestras congeladas. El procedimiento operativo estándar para la recolección incluyó un registro del tiempo desde la biopsia o resección hasta la congelación y el tiempo



transcurrido fue de 30 min o menos en todos los casos. Las muestras congeladas fueron incrustadas en OCT y cortadas en secciones de 5-7  $\mu\text{m}$ .

**[0101]** Las células tumorales se recogieron mediante microdissección por captura láser (LCM por sus siglas en inglés), utilizando el sistema Arcturus. El ARN total fue extraído por medio de un método comercial (Arcturus, Mountain View, CA) y se generó ADNc con oligo-dT y cebadores aleatorios. El análisis de PCR cuantitativo en tiempo real se realizó por triplicado por muestra (7900HT, ABI, Foster City, CA). La sonda y los cebadores de RRMI fueron los descritos previamente (Bepler et al, J Clin Oncol 2004; 22:01 878-1885). Se utilizaron cebadores y sondas disponibles en el mercado para el análisis de la expresión de todos los otros genes diana (tabla 5). La cantidad relativa de ARNm de RRMI y de TS en una muestra se determinó comparando el ciclo umbral con una curva estándar como se ha descrito (Bepler et al, J Clin Oncol 2004; 22:1878-1885) Para los genes restantes, la cuantificación relativa se realizó mediante la comparación de las muestras de ensayo con una muestra de calibrador único en un ensayo de tarjeta fluídica. Se incluyeron controles negativos sin una plantilla de ADNc en todos los experimentos.

**[0102]** Hubo una correlación significativa entre los niveles pre-y post-tratamiento de ambos genes ( $\rho$  de Spearman=0,786,  $p=0,025$ ) que sugiere que los niveles de expresión génica de quimioterapia son representativos de los niveles de pretratamiento. Sin embargo, los niveles de expresión génica parecen aumentar con el tratamiento (figura 5). Todos los análisis posteriores se realizaron en las 35 muestras de post-tratamiento. Los rangos de expresión y otras características de marcadores para todos los 14 genes están resumidos en la tabla 5. Los niveles de ARNm de RRMI estaban significativamente correlacionados con la respuesta de la enfermedad ( $\rho=0,649$ ,  $p<0,001$ ); es decir, los niveles bajos fueron predictivos de la reducción del tamaño del tumor y los niveles altos, del crecimiento del tumor (figura 3B). De los 18 pacientes con expresión de RRMI igual o por debajo de la mediana de 1,68, a 10 se les practicó una PR o CR, mientras que sólo 2 de los 17 con expresión de RRMI alta respondieron. Los niveles de ARNm de TS se correlacionaron asimismo con la respuesta de la enfermedad ( $\rho=0,454$ ,  $p=0,006$ ) (figura 3C); sin embargo, después de usar un ajuste de Bonferroni para multiplicidad de análisis de datos, el valor  $p$  fue superior al nivel de 0,0036. De los 18 pacientes con expresión de TS igual o por debajo de la mediana de 3,40, 7 recibieron una PR o CR, mientras que sólo 5 de los 17 con expresión de TS alta respondieron.

**[0103]** Sorprendentemente, los niveles de expresión de todos los otros genes no estuvieron significativamente correlacionados con la respuesta de la enfermedad

(figuras 3D y E), aunque también se consideran dianas de la terapéutica administrada. Los primeros siete genes enumerados en la tabla 5 están en la vía metabólica de la gemcitabina, mientras los siete últimos de la tabla 5 están involucrados en el metabolismo de pemetrexed, y sólo RRM1 y TS mostraron una correlación significativa (véase la columna más a la derecha de la tabla 5).

**Tabla 5: ARNm. Características de expresión génica y asociación con la respuesta radiográfica de la enfermedad**

	Nombre del gen	ID del conjunto de sonda	N	Min	Max	Mediana	Media	rho de Spearman	Valor p
Respuesta clínica			49	95% (aumento)	-100% (disminución)	-19%	-19%		
RRM1	subunidad reguladora de ribonucleótido reductasa	*	35	0,37	7,93	1,68	2,72	0,649	≤0,001
RRM2a	subunidad catalítica de ribonucleótido reductasa	Hs00367247-ml	32	0,00	5,42	0,90	1,38	-0,017	0,924
RRM2b	subunidad catalítica de ribonucleótido reductasa inducible de P53	Hs00153082-ml	32	0,00	12,24	1,34	1,99	0,276	0,125
DCK	deoxicitina quinasa	Hs00176127-ml	32	0,46	40,39	3,82	5,52	0,130	0,476
CDA	citidina deaminasa	Hs00156401-ml	32	0,00	118,66	2,42	10,27	0,028	0,878
ENT1 (SLC29A1)	transportador equilibrativo de nucleósidos 1	Hs00191940-ml	32	0,00	21,42	1,30	2,18	0,162	0,374
5'-NT (NT5CIA)	5'-nucleotidasa citosólica	Hs00261369-ml	32	0,00	170843,81	0,00	10,89	-0,081	0,657
TS	timidilato sintasa	Hs00426591-ml	35	0,32	18,31	3,40	4,46	0,454	0,006
DHFR	Dihidrofolato reductasa	Hs00758822-sl	32	0,00	9,83	0,85	1,29	0,166	0,362
GARFT	fosforribosil glicinamida formil	Hs00531926-ml	32	0,17	21,93	1,19	2,28	0,002	0,988
FPGS	folilpoliglutamato sintasa	Hs00191956-ml	32	0,36	32,75	2,23	3,50	0,222	0,220
EN12 (SLC29A2)	transportador equilibrativo de nucleósidos 2	Hs00155426-ml	32	0,11	41,30	5,16	7,76	0,125	0,494
RFC1 (SLC19A1)	portador de folato reducido	Hs00161870-ml	32	0,01	33,47	0,12	2,23	0,096	0,600
γ-GH	gamma-glutamil hidrolasa	Hs00608257-ml	32	0,07	33,52	2,47	5,75	-0,015	0,934

	Nombre del gen	ID del conjunto de sonda	N	Min	Max	Mediana	Media	rho de Spearman	Valor p
Respuesta clínica			49	95% (aumento)	-100% (disminución)	-19%	-19%		
* 5'-FAM-TTTGC TCTTT GGATT CCGGA TCTCT TCA-TAMRA-3'									

**Resultados**

**[0104]** La eficacia pre-operatoria de una combinación sin platino, es decir, gemcitabina y pemetrexed, se investigó en pacientes con CPCNP resecable quirúrgicamente. La razón de esta combinación fue que ambos agentes son antimetabolitos con mecanismos de acción relativamente bien conocidos, ambos se toleran bien y son eficaces y ya se han integrado en el cuidado del paciente. Los estudios neoadyuvantes de estadio III aleatorios anteriores que utilizaron quimioterapia basada en platino habían presentado tasas de respuesta del 33%,5 41%,7 49%,6 y 64%,4. Aproximadamente el 75% de los pacientes recibieron toda la quimioterapia prevista y la mortalidad relacionada con la quimioterapia fue de aproximadamente un 2%. Estas tasas de respuesta parecen más altas que la tasa de respuesta del 35%; sin embargo, 18/52 pacientes de este estudio tenían enfermedad de estadio III, mientras que dos de los ensayos a los que se hace referencia no incluían pacientes en estadio III, 5,7 y la proporción de pacientes en estadio III de los otros dos ensayos fue de 7%6 y 47%4, respectivamente. En dos ensayos neoadyuvantes aleatorios anteriores con terapia basada en platino en pacientes con enfermedad en estadio III, las tasas de respuesta presentadas fueron del 53% (16/30) 16 y 35% (9/26) (Roth et al., J Natl Cancer Inst 1994;. 86:673-680). La tasa de respuesta esperada se estableció a priori en un 50%; una meta que no se logró. Por lo tanto, la combinación de gemcitabina y pemetrexed es poco probable que sea superior a las combinaciones que contienen platino si se administra a un grupo no seleccionado de pacientes con CPCNP resecable.

**[0105]** El ochenta y siete por ciento (45/52) de los pacientes del ensayo recibieron los 4 ciclos de tratamiento previstos. Cinco pacientes recibieron menos de 4 ciclos debido a toxicidades de grado 3 relacionadas con el tratamiento y, de esos, cuatro recibieron cirugía con una resección completa. Un paciente falleció antes de la cirugía a causa de una neumonitis presuntamente viral. Así, la combinación de pemetrexed y gemcitabina se tolera bien y se administra en cuatro tratamientos quincenales a una proporción de pacientes que es al menos igual a la proporción de pacientes que pueden recibir una combinación que contiene platino.

**[0106]** Estos estudios farmacogenómicos indican que la magnitud de la respuesta del tumor a la gemcitabina y pemetrexed se asocia con la expresión tumoral de los genes

RRM1 y TS. Los pacientes cuyos tumores expresan estos genes en niveles bajos son más propensos a experimentar una reducción del tamaño del tumor en comparación con aquellos con niveles altos de expresión génica. Esta asociación fue significativa para el gen RRM1, pero no logró llegar a un nivel de importancia de 0,0036 para TS.

5 Ya que un total de 14 genes fueron evaluados en estos pacientes, el nivel de importancia se ajustó de acuerdo con Bonferroni. Este enfoque es conservador para el ajuste de la multiplicidad de análisis de datos y la mayoría de las investigaciones correlativas se llevan a cabo bajo condiciones menos rigurosas. De ese modo, el coeficiente de correlación de (-)0,454 visto para la asociación entre la expresión de TS  
10 y la respuesta al tratamiento es notable y requiere una mayor exploración.

**[0107]** En resumen, las investigaciones clínicas correlativas descritas amplian la relación conocida anteriormente entre la expresión de RRM1 y la eficacia de la gemcitabina para la combinación de gemcitabina y pemetrexed. También proporcionan pruebas razonables para una asociación entre la expresión de TS y la eficacia de esa  
15 combinación. En un grupo no seleccionado de pacientes con CPCNP resecable, gemcitabina y pemetrexed proporcionan una tasa de respuesta radiográfica objetiva del 35% con buena tolerabilidad.

**Referencias adicionales**

**[0108]**

20 Bepler et al ., J Clin Oncol 2004;22:1878-85.  
Bepler et al., J Clin Oncol 2006; 24:4731-4737  
Camp et al, Nat Med 2002;8:1323-27.  
Ceppi et al., Cancer 2006; 107:1589-96.  
Chen et al., N Engl J Med 2007; 356:11-20  
25 Coombes et al., Nat Med 2007; 13:1276-1278  
Edler D et al., Clin Cancer Res 2000;6(2):488-92.  
Gautam and Bepler, Cancer Res 2006;66:6497-502.  
Gautam et al., Oncogene 2003;22:2135-42.  
Kato et al., N Engl J Med 2004;350(17):1713-21.  
30 Olausson et al., N Engl J Med 2006;355:983-91.  
Potti et al., N Engl J Med 2006; 355:570-580  
Potti et al., Nat Med 2006; 12:1294-1300  
Rimm, Nat Biotechnol 2006;24(8):914-6.  
Rosell et al., N Engl J Med 1994; 330:153-158  
35 Simon et al., Chest 2005;127(3):978-83,

Zhou et al., Cancer Research 1995:55(6):1328-33.

OTROS MODOS DE REALIZACIÓN

**[0109]** Se debe entender que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención.

5

10

15

20

25

30

## Reivindicaciones

1. Un método para predecir la respuesta de un sujeto a un tratamiento que comprende la administración de gemcitabina y pemetrexed, el método comprendiendo;
  - a. la determinación de un nivel de expresión génica de ribonucleótido reductasa M1 (RRM1) y timidilato sintasa (TS) en una muestra del tumor del sujeto; y
  - b. la predicción de la respuesta del sujeto al tratamiento en función del nivel de expresión génica de RRM1 y de TS en la muestra de tumor; en la cual si el nivel de la expresión génica de RRM1 es menor o igual a un nivel de referencia de expresión génica de RRM1; y si el nivel de expresión génica de TS es menor que o igual a un nivel de referencia de expresión génica de TS; es probable que el sujeto tenga una respuesta positiva al tratamiento.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto tiene un tumor maligno epitelial.
3. El método de la reivindicación 1, en el cual el sujeto tiene un cáncer de pulmón, un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello o un cáncer de ovario.
4. El método de la reivindicación 3, en el cual el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
5. El método de la reivindicación 1, en el cual el nivel de referencia de expresión génica de RRM1 es un nivel de la mediana de la expresión génica de RRM1.
6. El método de la reivindicación 1, en el cual el nivel de referencia de expresión génica de TS es un nivel de la mediana de la expresión génica de TS.

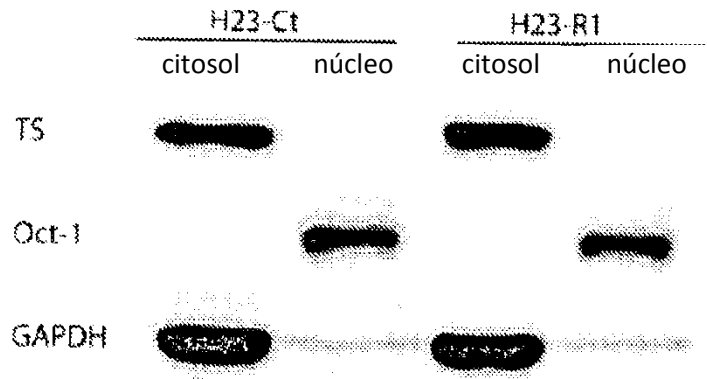


FIG. 1

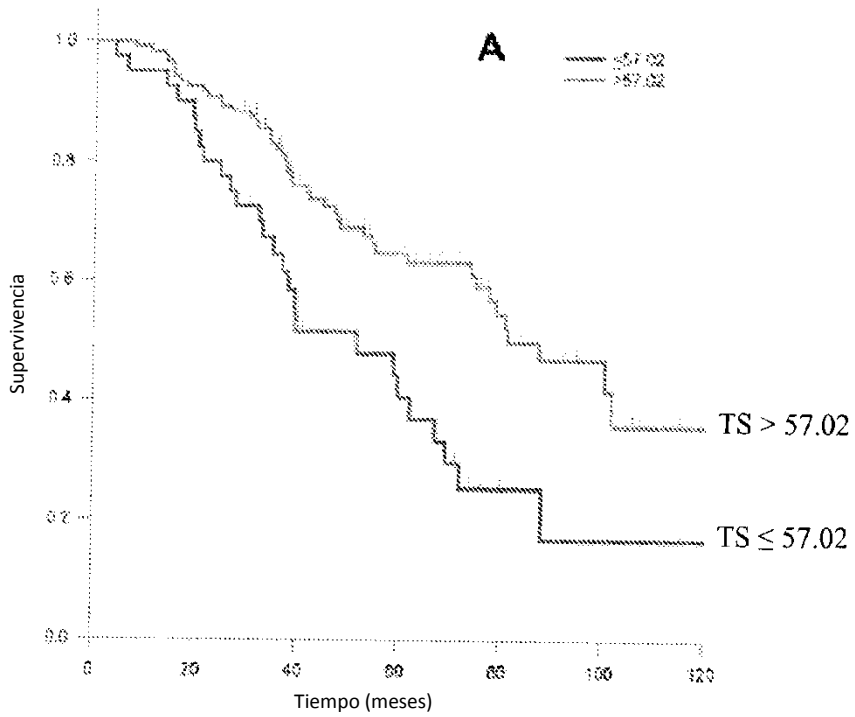


FIG. 2A

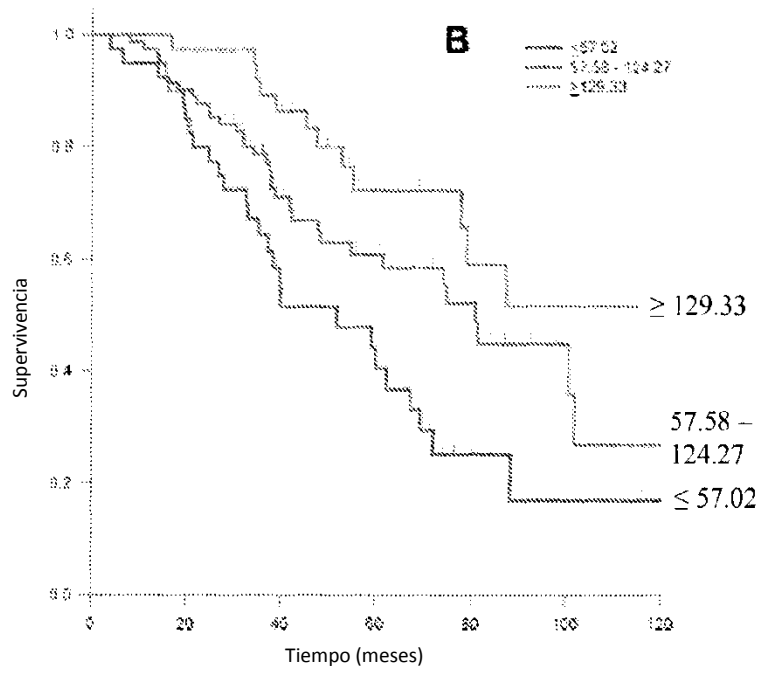


FIG. 2B

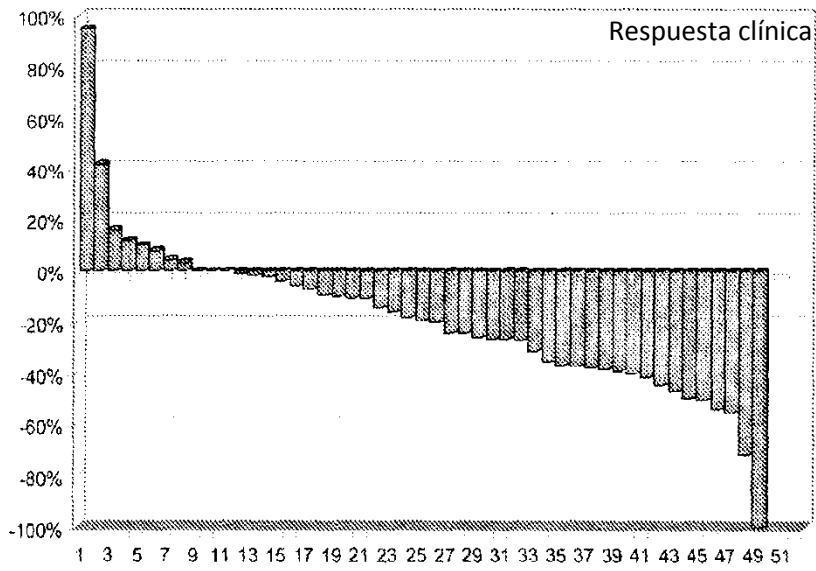


FIG. 3A



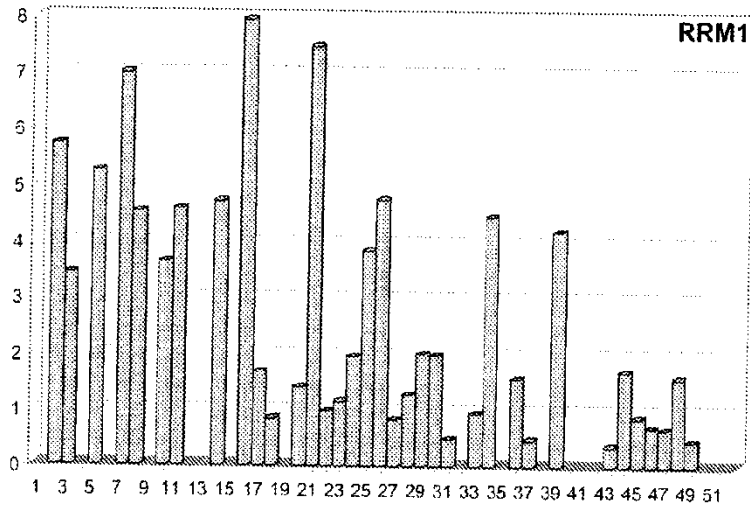


FIG. 3B

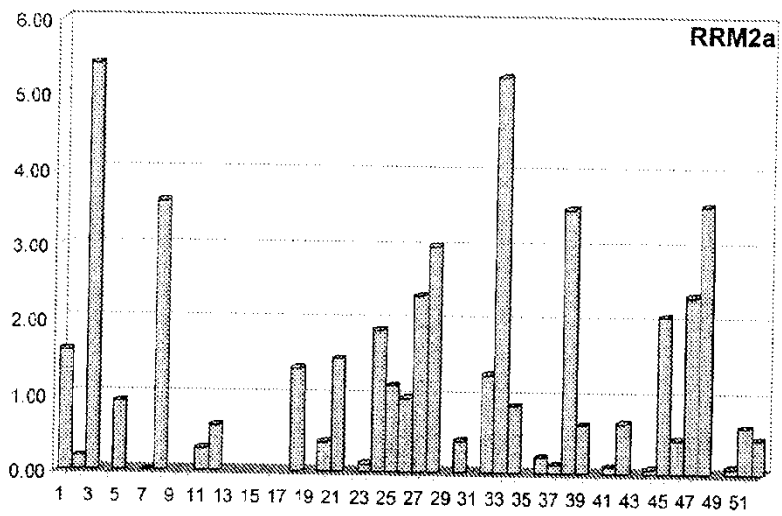


FIG. 3C

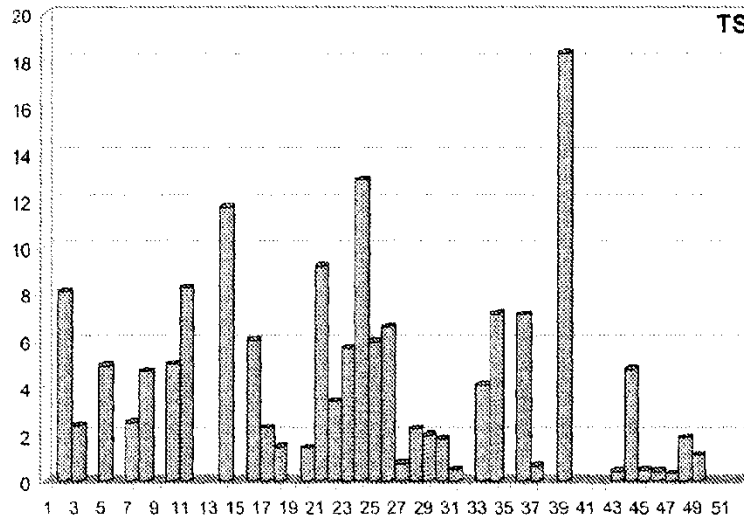


FIG. 3D

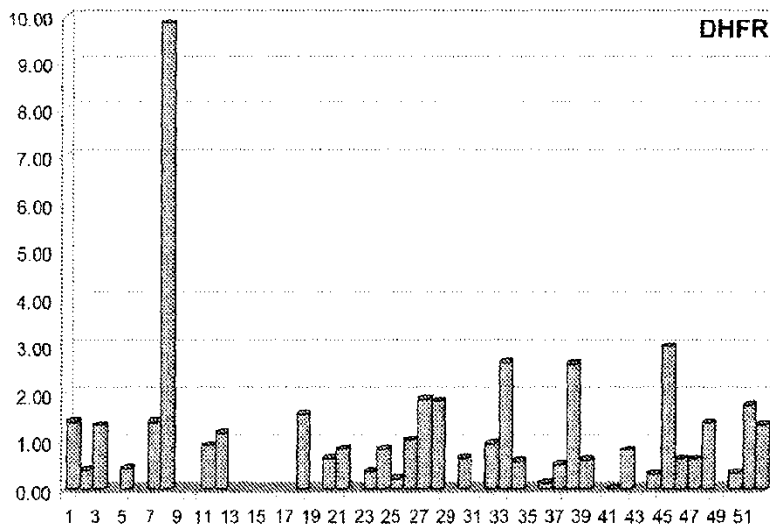


FIG. 3E

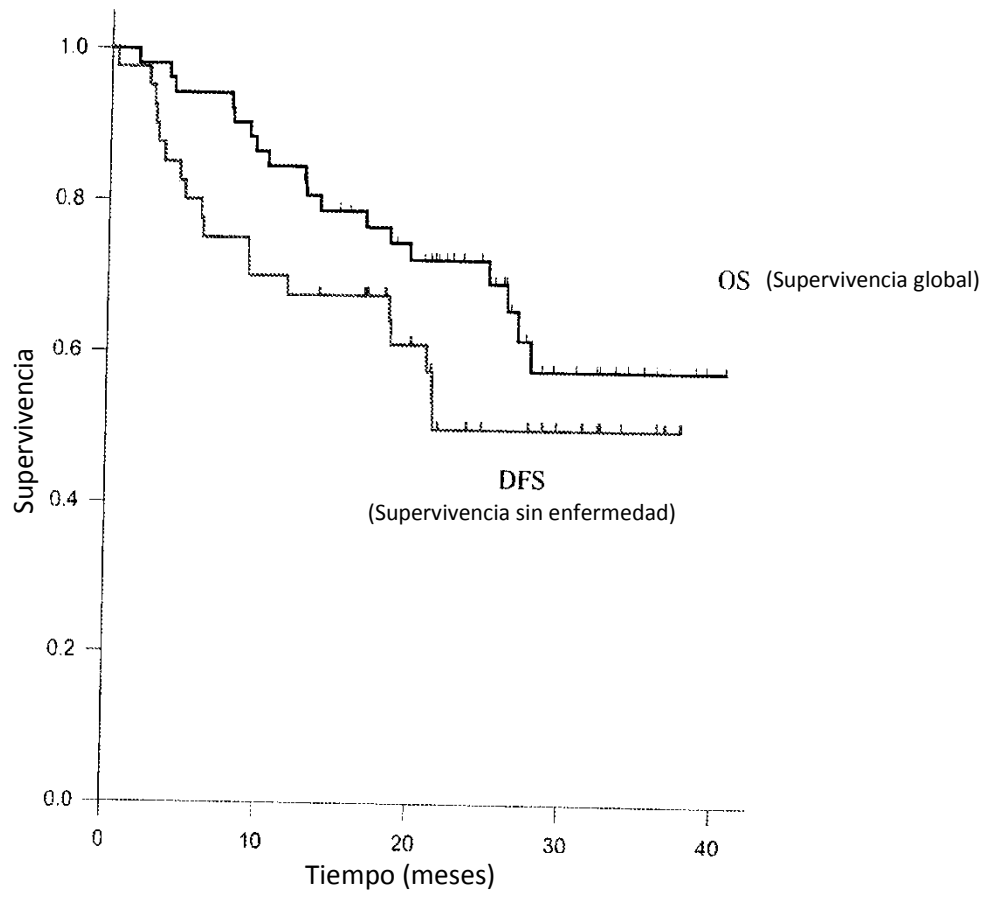


FIG. 4

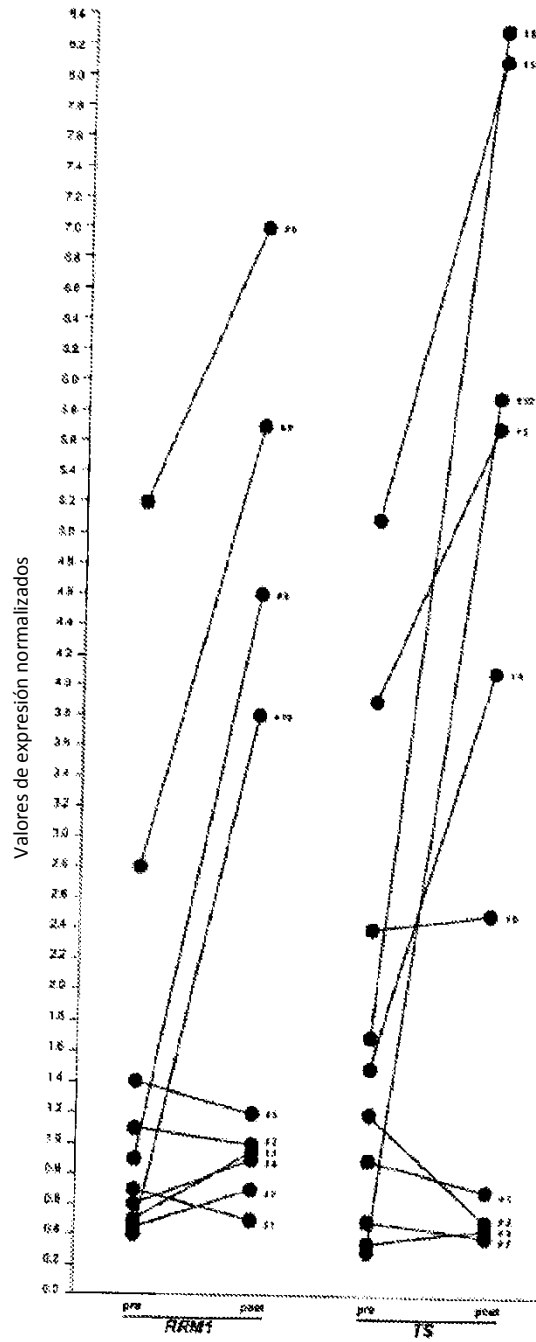


FIG. 5