

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 302**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2001 E 01994073 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1381691**

54 Título: **Método para determinar un régimen quimioterapéutico en base a la expresión ERCC1 y TS**

30 Prioridad:

01.12.2000 US 250358 P

04.12.2000 US 250471 P

11.06.2001 US 877178

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

10.09.2013

73 Titular/es:

**RESPONSE GENETICS, INC. (100.0%)
1640 MARENGO STREET, 6TH FLOOR
LOS ANGELES, CA 90033, US**

72 Inventor/es:

DANENBERG, KATHLEEN, D.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 422 302 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar un régimen quimioterapéutico en base a la expresión ERCC1 y TS

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de pronóstico que son útiles en medicina, especialmente en la quimioterapia contra el cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a la evaluación de la expresión génica de células tumorales en un paciente. La resistencia de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, especialmente los antimetabolitos y agentes que dañan el ADN a la manera de los agentes de platinación se ensaya examinando el ARNm expresado de genes implicados en la síntesis nucleotídica y la reparación del ADN en humanos.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer surge cuando una célula normal experimenta una transformación neoplásica y se convierte en una célula maligna. Las células transformadas (malignas) escapan a los controles fisiológicos normales que especifican el fenotipo celular y restringen la proliferación celular. Por lo tanto, las células transformadas en el cuerpo de un individuo proliferan, formando un tumor. Cuando se encuentra un tumor, el objetivo clínico es destruir las células malignas de modo selectivo mitigando al mismo tiempo cualquier daño que puedan haber causado a las células normales del individuo sometido a tratamiento.

La quimioterapia se basa en el uso de fármacos que son tóxicos selectivamente (citotóxicos) para las células cancerosas. Se han desarrollado varias clases generales de fármacos quimioterapéuticos, incluyendo fármacos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas, y otros procesos metabólicos vitales. Generalmente estos se denominan fármacos antimetabolitos. Otras clases de fármacos quimioterapéuticos ocasionan daño al ADN celular. Los fármacos de estas clases generalmente se denominan genotóxicos.

Sin embargo, a menudo sólo se puede evaluar con precisión la susceptibilidad de un neoplasma individual a un determinado fármaco quimioterapéutico, o combinación de fármacos, después de un período de prueba del tratamiento. El tiempo invertido en un período de prueba infructuoso tiene un riesgo significativo en el control clínico de los cánceres agresivos.

La reparación del daño al ADN celular es un importante proceso biológico realizado por una maquinaria enzimática de reparación del ADN de una célula. Las lesiones sin reparar en el genoma de una célula pueden impedir la replicación del ADN, afecta a la fidelidad de la replicación del ADN recién sintetizado y/o obstaculizar la expresión de genes necesarios para la supervivencia celular. Por lo tanto, los fármacos citotóxicos generalmente se consideran más tóxicos para las células que se están dividiendo activamente que intervienen en la síntesis del ADN que para las células inactivas no divisoras. Sin embargo, las células normales de muchos tejidos corporales están inactivas y pocas veces su consigna es introducirse de nuevo en ciclo celular y dividirse. Se proporciona más tiempo entre las rondas de división celular para la reparación del daño del ADN de las células normales causado por genotoxinas quimioterapéuticas. Como resultado, se obtiene cierta selectividad para la destrucción de células cancerosas. Muchos regímenes de tratamiento reflejan los intentos por mejorar la selectividad de las células cancerosas mediante la administración conjunta de fármacos quimioterapéuticos que pertenecen a dos o más de estas clases generales.

Dado que la quimioterapia eficaz en tumores sólidos con frecuencia requiere una combinación de agentes, la identificación y cuantificación de los determinantes de la resistencia o sensibilidad a cada fármaco individual se ha convertido en una herramienta importante para diseñar la quimioterapia de combinación individual.

Los fármacos anticancerosos genotóxicos usados ampliamente que han demostrado dañar el ADN celular son cisplatino (DDP) y carboplatino. Actualmente, el cisplatino y/o el carboplatino se usan en el tratamiento de neoplasias diversas seleccionadas de origen epitelial y mesenquimal, incluyendo carcinomas y sarcomas del tracto respiratorio, gastrointestinal y reproductor, del sistema nervioso central y de origen escamoso en la cabeza y el cuello. Actualmente, se prefiere el cisplatino en combinación con otros agentes para el control del carcinoma testicular y, en muchos casos, produce una remisión duradera (Loehrer y col., 1984, 100 Ann. Int. Med. 704). El cisplatino (DDP) altera la estructura del ADN a través de la formación de aductos intracatenarios. La resistencia a los agentes de platino, tales como DDP, se ha atribuido a una mejor tolerancia a los aductos de platino, un descenso de la acumulación de fármacos y a una mejor reparación del ADN.

El oxaliplatino, otro agente quimioterapéutico a base de platino que lleva un anillo de 1,2-diaminociclohexano ha demostrado eficacia anticancerosa *in vitro* e *in vivo*. Se considera que este voluminoso grupo vehículo lleva a los aductos de platino-ADN, que son más citotóxicos que los aductos formados a partir de otros agentes de platino y más eficaces en el bloqueo de la replicación del ADN. Los últimos datos han demostrado que la deficiencia en el sistema de reparación de desemparejamientos (MMR), así como el aumento de la capacidad del complejo de replicación para sintetizar ADN más allá del sitio de daño del ADN (mejora de la derivación de replicación) causa la

resistencia al cisplatino, pero no al oxaliplatino (Raymond y col., *Semin Oncol* 25, Supl. 5: 4-12, 1998).

La reparación por escisión de aductos voluminosos de ADN, tales como los formados por los agentes de platino, parece ser mediada por genes implicados en el reconocimiento y escisión del daño del ADN. Cleaver y col., *Carcinogenesis* 11: 875-882 (1990); Hoeijmakers y col., *Cancer Cells* 2: 311-320 (1990); Shivji y col., *Cell* 69: 367-374 (1992). En efecto, las células que tienen un defecto genético en uno o más elementos de la maquinaria enzimática de reparación del ADN son sumamente sensibles al cisplatino. Fraval y col. (1978), 51 *Mutat. Res.* 121, Becky Brubaker (1973), 116 *J. Bacteriol.* 1247.

El gen de complementación cruzada para la reparación por escisión (*ERCC1*) es esencial en la reparación de los aductos de ADN. Se ha clonado el gen *ERCC1* humano. Westerveld y col., *Nature* (Londres) 310: 425-428 (1984); Tanaka y col., *Nature* 348: 73-76 (1990); (Nº de acceso XM_009432, SEQ ID NO: 10). Varios estudios que usan líneas celulares mutantes humanas y de hámster, que son defectuosas en este gen, y los estudios en tejidos tumorales humanos, indican que el producto codificado por *ERCC1* está implicado en la reparación por escisión de los aductos de platino-ADN. Dabholkar y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1512-1517 (1992); Dijt y col., *Cancer Res.* 48: 6058-6062 (1988); Hansson y col., *Nucleic Acids Res.* 18: 35-40 (1990).

Cuando se transfiere a células CHO deficientes para la reparación del ADN, el *ERCC1* confiere resistencia celular a la quimioterapia a base de platino por su capacidad para reparar los aductos de platino-ADN. Hansson y col., *Nucleic Acids Res.* 18: 35-40 (1990). Los modelos de reparación por escisión aceptados en la actualidad sugieren que la etapa de reconocimiento de daño/escisión es limitante, en cuanto a la velocidad, para el proceso de reparación por escisión.

Se han examinado los niveles relativos de expresión de los genes de reparación por escisión, tales como *ERCC1*, en células malignas de pacientes cancerosos que reciben terapia a base de platino. Dabholkar y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 84: 1512-1517 (1992). Se ha indicado que la sobreexpresión de *ERCC1* en pacientes de cáncer gástrico tiene un impacto negativo sobre la respuesta tumoral y la supervivencia final cuando se trata con el régimen quimioterapéutico combinado a base de platino y a base de antimetabolitos (cisplatino/fluorouracilo), (Metzger y col., *J Clin Oncol* 16: 309, 1998). Por lo tanto, los niveles intratumorales de expresión de *ERCC1* pueden constituir un importante factor pronóstico para determinar si una quimioterapia a base de platino, sola o en combinación con una terapia con antimetabolitos, sería eficaz o no en el tratamiento de pacientes con cáncer.

Los compuestos quimioterapéuticos citotóxicos antimetabólicos incluyen fármacos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos vitales. Por ejemplo, el 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco de uso muy generalizado para el tratamiento de numerosos tipos de cánceres diferentes, incluyendo los principales cánceres, tales como, por ejemplo, los del tracto GI y de mama (Moertel, C.G. *New Engl. J. Med.*, 330: 1136-1142, 1994). El 5-FU como agente único fue, durante más de 40 años, el tratamiento convencional de primera línea para el cáncer colorrectal, aunque recientemente se ha introducido la combinación de 5-FU y CPT-11 como terapia alternativa de primera línea para el cáncer colorrectal avanzado (Saltz y col., *Irinotecan Study Group, New England Journal of Medicine* 343: 905-14, 2000). La combinación de 5-FU y oxaliplatino ha producido elevadas tasas de respuesta en los cánceres colorrectales (Raymond y col., *Semin. Oncol.* 25: 4-12, 1998). Por lo tanto, es probable que el 5-FU se use durante muchos años en el tratamiento del cáncer, ya que sigue siendo el componente central de los regímenes quimioterapéuticos actuales. Además, se sigue empleando la terapia con 5-FU como agente único para pacientes en los que la terapia de combinación con CPT-11 u oxaliplatino puede ser excesivamente tóxica.

El 5-FU es típico de la mayoría de los fármacos anticancerosos por el hecho de que sólo una minoría de pacientes experimentan una respuesta favorable a la terapia. Grandes pruebas clínicas aleatorias han demostrado que las tasas de respuesta total de los tumores al 5-FU como agente único para pacientes con cáncer colorrectal con metástasis se encuentra en el intervalo del 15-20% (Moertel, C.G. *New Engl. J. Med.*, 330: 1136-1142, 1994). En combinación con otros quimioterapéuticos que se han mencionado anteriormente, las tasas de respuesta de los tumores a los regímenes a base de 5-FU han aumentado a casi el 40%. No obstante, la mayoría de pacientes tratados no obtienen beneficios manifiestos por haber recibido quimioterapia a base de 5-FU, y se ven sometidos a un considerable grado de riesgo, malestar y gasto. Como no existía ningún medio fiable para anticipar el grado de respuesta del tumor de un individuo con anterioridad al tratamiento, la práctica clínica convencional ha consistido en someter a todos los pacientes a tratamientos a base de 5-FU, reconociendo plenamente que la mayoría sufrirá consecuencias insatisfactorias.

El mecanismo de acción y la ruta metabólica del 5-FU se han estudiado intensamente con el paso de los años a fin de identificar los determinantes bioquímicos más importantes de la actividad antitumoral del fármaco. La meta final era mejorar la eficacia clínica del 5-FU mediante a) la modulación de su metabolismo intracelular y su bioquímica y b) la medición de los determinantes de la respuesta en los tumores de los pacientes antes de la terapia a fin de pronosticar qué pacientes responderían mejor (o no responderían) al fármaco.

Los primeros estudios en el área de la predicción de la respuesta tumoral a la terapia a base de 5-FU se centraron en su enzima diana, la timidilato sintasa (TS) en el cáncer colorrectal. La TS también se ha clonado (Kaneda y col.,

J. Biol. Chem. 265 (33), 20277-20284 (1990); Acceso N° NM_001071, con la SEQ ID NO: 11). Leichman y col. (Leichman y col., J. Clin. Oncol., 15: 3223-3229, 1997) realizaron un ensayo clínico prospectivo para correlacionar la respuesta tumoral al 5-FU con la expresión del gen *TS* como se determinó por RT-PCR en biopsias anteriores al tratamiento de cánceres colorrectales. Este estudio mostró: 1) un gran intervalo de 50 veces los niveles de expresión del gen *TS* entre estos tumores, y 2) niveles asombrosamente diferentes de la expresión del gen *TS* entre los tumores que respondían y los que no respondían. El intervalo de niveles de *TS* de los grupos de respuesta ($0,5-4,1 \times 10^{-3}$, con respecto a un control interno) era más estrecho que el de los grupos que no respondían ($1,6-23,0 \times 10^{-3}$, con respecto a un control interno). Los investigadores determinaron un nivel de umbral de "corte de no respuesta" resultante de la expresión *TS* anterior, por encima del cual sólo había individuos que no respondían. Por lo tanto, los pacientes con expresión de *TS* por encima de este umbral de "corte de no respuesta" podían identificarse positivamente como no respondedores con anterioridad a la terapia. La clasificación de "sin respuesta" incluía a todas las respuestas terapéuticas con reducción tumoral al <50%, dando como resultado el crecimiento progresivo un aumento del tumor de >25% y tumores no progresivos con reducción al <50%, sin cambio o un aumento de <25%. Estos tumores tuvieron los niveles más elevados de *TS*. Por lo tanto, la elevada expresión de *TS* identifica a los tumores especialmente resistentes. Los niveles de expresión de *TS* por encima de un umbral determinado identificaron un subconjunto de tumores que no respondían al 5-FU, en tanto que los niveles de expresión de *TS* inferiores a este número predecían una tasa de respuesta apreciablemente más elevada.

De forma interesante, Papamichael y col., llegaron a la conclusión de que el oxaliplatino mejora la ruta anabólica para el 5-FU en el tratamiento de combinación. Br. J. Cancer, 78 (Supl. 2), 98 pág. 12, 1998; Oncologist 1999; 4(6): 478-87. Esto puede reafirmar la eficacia del tratamiento de quimioterapia de combinación con 5-FU y oxaliplatino en el cáncer. Además, ya que se sabe que la quimioterapia a base de 5-FU y a base de platino depende de los niveles de expresión de *TS* y *ERCC1*, respectivamente, es particularmente importante hacer una determinación precisa de la expresión de *ERCC1* y la expresión de *TS* de muestras de tejidos tumorales obtenidas de los pacientes para pronosticar una quimioterapia a base de 5-FU y a base de platino.

La mayoría de las muestras patológicas obtenidas de pacientes se fijan y se embeben en parafina (FPE) de la manera habitual para permitir el análisis histológico y el posterior almacenamiento de archivos. Por lo tanto, la mayoría de las muestras de tejidos de biopsia no son útiles para el análisis de la expresión génica ya que dichos estudios requieren una elevada integridad del ARN de manera que se pueda hacer una medición precisa de la expresión génica. En la actualidad, los niveles de expresión génica sólo pueden controlarse cualitativamente en dichas muestras fijas y embebidas usando tinción inmunohistoquímica para controlar los niveles de expresión de proteínas.

Hasta ahora, los estudios cuantitativos de la expresión génica, incluyendo los de expresión de *ERCC1* y *TS*, se han limitado a la amplificación de ARN por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a partir de tejido fresco o congelado. La patente de Estados Unidos N° 5.705.336 de Reed y col., desvela un método para cuantificar el ARNm de *ERCC1* de tejidos tumorales ováricos y determinar si el tejido es sensible a la quimioterapia a base de platino. Como en Leichman y col., Reed y col., cuantifican ARNm a partir de biopsias de tumores congelados.

El uso de tejido congelado por los profesionales de salud como se describe por Leichman y col. y Reed y col., presenta inconvenientes sustanciales. La transferencia rápida de biopsias para evitar la degradación del ARNm posterior es la inquietud principal al planificar cualquier ensayo cuantitativo de marcadores genéticos a base de ARN. El profesional de la salud que realiza la biopsia debe entregar muy rápidamente la muestra de tejido a una instalación equipada para realizar un protocolo de extracción de ARN de inmediato al recibir la muestra de tejido. Si no se dispone de tal instalación, el clínico debe congelar rápidamente la mezcla a fin de impedir la degradación del ARNm. Para que la instalación de diagnóstico realice un protocolo de extracción de ARN útil antes de la degradación del tejido y el ARN, la muestra de tejido debe mantenerse congelada hasta su llegada a la instalación de diagnóstico, independientemente de la distancia a la que éste se encuentre. El mantenimiento de la integridad del tejido congelado durante el transporte usando transportadores especializados equipados con nitrógeno líquido y hielo seco conlleva un coste considerable.

Las biopsias de rutina generalmente comprenden una mezcla heterogénea de tejido estromal y tumoral. A diferencia del tejido fresco o congelado, las muestras de tejidos para biopsia FPE se microdisecionan y se separan fácilmente en tejido estromal y tumoral y, por lo tanto, ofrecen una ventaja con respecto al uso de tejido fresco o congelado. Sin embargo, el aislamiento de ARN de tejido fijado, y especialmente de tejido fijado y embebido en parafina, da como resultado un ARN sumamente degradado, lo que generalmente no se considera aplicable generalmente a los estudios de expresión génica.

Existen varias técnicas para la purificación de ARN de muestras biológicas, aunque ninguna es fiable para el aislamiento de ARN a partir de muestras de FPE. Por ejemplo, Chomczynski (patente de Estados Unidos N° 5.346.994) describen un método para la purificación de ARN a partir de tejidos en base a una separación de la fase líquida usando fenol e isotiocianato de guanidina. Una muestra biológica se homogeneiza en una solución acuosa de fenol e isotiocianato de guanidina y a continuación el producto homogeneizado se mezcla con cloroformo. Después de la centrifugación, el producto homogeneizado se separa en una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa.

Las proteínas se secuestran en la fase orgánica, el ADN en la interfase y el ARN en la fase acuosa. Se puede hacer que el ARN precipite de la fase acuosa. Desafortunadamente, este método no puede aplicarse a muestras de tejidos fijadas y embebidas en parafina (FPE).

5 Otras técnicas conocidas para el aislamiento de ARN utilizan típicamente la extracción de sales de guanidina o fenol, como se describe, por ejemplo, en Sambrook J. y col., (1989) en las págs. 7.3-7.24, y en Ausubel. F. M. y col. (1994) en las págs. 4.0.3-4.4.7. Una vez más, ninguno de los métodos conocidos proporciona resultados cuantitativos reproducibles en el aislamiento del ARN de muestras de tejidos embebidas en parafina.

10 Por lo tanto, las técnicas para el aislamiento de ARN de muestras de tejidos embebidas en parafina son particularmente necesarias para el estudio de expresión génica en tejidos tumorales, ya que se pueden usar niveles de expresión de ciertos receptores o enzimas para determinar la posibilidad de éxito de un tratamiento particular.

15 Los marcadores moleculares predictivos de resistencia o sensibilidad al oxaliplatino aún no se han determinado. Existe la necesidad de contar con dichos marcadores para determinar las probabilidades de éxito de las terapias a base de oxaliplatino/5-FU. En este documento se da a conocer una asociación inversa significativa tanto para la expresión de ARNm intratumoral del gen *ERCC1* para la reparación por escisión como para la expresión de ARNm intratumoral del gen de la timidilato sintasa (*TS*) con resultados clínicos en pacientes con tumores sometidos a quimioterapia de combinación con 5-FU/oxaliplatino.

20 Por consiguiente, es el objeto de la invención proporcionar un método para cuantificar ARNm de *ERCC1* y/o *TS* de un tejido tumoral a fin de proporcionar un pronóstico temprano para las terapias genotóxicas para el cáncer propuestas. También es el objeto de la invención proporcionar un método para evaluar los niveles de *ERCC1* y/o *TS* en tejidos fijados y embebidos en parafina (FPE) y predecir la resistencia probable del tumor de un paciente al tratamiento con 5-FU y oxaliplatino mediante el examen de la cantidad de ARNm de *ERCC1* y/o *TS* presente en las células tumorales de un paciente y compararla con un nivel de expresión de umbral predeterminado.

Sumario de la invención

30 Se describe un método para evaluar los niveles de expresión de ARNm de *ERCC1* obtenido a partir de células tumorales fijadas o fijadas y embebidas en parafina (FPE).

También se describe en este documento un método para evaluar los niveles de expresión de ARNm de *TS* obtenido de células tumorales fijadas o fijadas y embebidas en parafina (FPE).

35 También se describe en este documento un método para cuantificar la cantidad de expresión de ARNm de *ERCC1* con respecto a un control interno de una muestra de tejido fijada y embebida en parafina (FPE). Este método incluye el aislamiento del ARNm total de dicha muestra y la determinación de la cantidad de ARNm de *ERCC1* con respecto a la cantidad de ARNm de un gen de control interno.

40 También se describe en este documento un método para cuantificar la cantidad de expresión de ARNm de *TS* con respecto a un control interno de una muestra de tejido fijada y embebida en parafina (FPE). Este método incluye el aislamiento del ARNm total de dicha muestra y la determinación de la cantidad de ARNm de *TS* con respecto a la cantidad de ARNm de un gen de control interno.

45 También se describen en este documento cebadores oligonucleotídicos que tienen la secuencia de *ERCC1*-504F (SEQ ID NO: 1) o *ERCC1*-574R (SEQ ID NO: 2) y secuencias sustancialmente idénticas a las mismas. También se describen en este documento cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia que híbrida a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o sus complementos en condiciones rigurosas.

50 También se describen en este documento cebadores oligonucleotídicos que tienen la secuencia de *TS*-763F (SEQ ID NO: 3) o *TS*825R (SEQ ID NO: 4) y secuencias sustancialmente idénticas a las mismas. También se describen en este documento cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia que híbrida a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o sus complementos en condiciones rigurosas.

55 De acuerdo con un primer aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para la determinación de un régimen quimioterapéutico que comprende 5-fluorouracilo, oxaliplatino, o una combinación de los mismos, para tratar un tumor en un paciente, que comprende:

60 (a) fijar una muestra tumoral y embeber la muestra fijada en parafina;

(b) aislar el ARNm de la muestra tumoral fijada embebida en parafina mediante el calentamiento de la muestra de tejido en una solución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;

- (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores oligonucleotídicos que hibridan en condiciones rigurosas a una región del gen *ERCC1* y comprende la SEQ ID NO: 1 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 2 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y un par de cebadores oligonucleotídicos que hidridan en condiciones rigurosas a una región del gen *TS* y comprende la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, para obtener una muestra amplificada de *ERCC1* y una muestra amplificada de *TS*;
- (d) determinar la cantidad de ARNm de *TS* y *ERCC1* en la muestra amplificada;
- (e) comparar la cantidad de ARNm de *TS* y *ERCC1* de la etapa (d) para una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y
- (f) determinar un régimen quimioterapéutico que comprende 5-fluorouracilo, oxaliplatino, o una combinación de los mismos, en base a la cantidad de ARNm de *TS* y/o *ERCC1* en la muestra amplificada y el nivel de umbral para la expresión del gen *TS* y/o *ERCC1*.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar la expresión de un gen *TS* que comprende un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar la expresión de los genes *TS* y *ERCC1* que comprende (a) un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y (b) un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 1 o un oligonucleótido idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 2 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo.

También se describe en este documento un método para normalizar la expresión génica sin corregir (UGE) de *ERCC1* y *TS* con respecto a un gen de control interno en una muestra de tejidos analizada usando la tecnología TaqMan® para los niveles de expresión de *ERCC1* y *TS* conocidos con respecto a un control interno de las muestras analizadas por la tecnología anterior a TaqMan®.

35 Descripción del dibujo

La figura 1 es un gráfico que muestra la probabilidad estimada de supervivencia y la supervivencia en meses de pacientes que tienen tumores de adenocarcinoma colorrectal con niveles de expresión de *TS* corregida altos (superior a aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 7$) y bajos (inferior a aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 43$) que reciben un régimen terapéutico basado en 5-FU y oxaliplatino.

La figura 2 es un gráfico que muestra la probabilidad estimada de supervivencia y la supervivencia en meses de pacientes que tienen tumores de adenocarcinoma colorrectal con niveles de expresión de *ERCC1* corregida altos (superior a aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 10$) y bajos (inferior a aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 40$) que reciben un régimen terapéutico basado en 5-FU y oxaliplatino.

La figura 3 es un gráfico que muestra la probabilidad estimada de supervivencia y la supervivencia en meses de pacientes que tienen tumores de adenocarcinoma colorrectal con niveles de expresión de *ERCC1* y *TS* corregida altos (expresión de *TS* superior a aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina y *ERCC1* superior a aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 14$) y bajos (expresión de *TS* inferior a aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina y *ERCC1* inferior a aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$ veces la expresión del gen β -actina; $n = 36$) que reciben un régimen terapéutico basado en 5-FU y oxaliplatino.

La figura 4 es una tabla que muestra la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino/5-FU con respecto a la expresión de *ERCC1* y *TS* analizada por análisis univariante.

La figura 5 es una tabla que muestra la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal tratados con oxaliplatino/5-FU con respecto a la expresión de *ERCC1* y *TS* analizada por análisis estratificado.

La figura 6 es un gráfico que muestra la respuesta de pacientes con tumor de adenocarcinoma colorrectal tratados con un régimen quimioterapéutico de 5-FU y oxaliplatino. Los pacientes se clasificaron en los que mostraban enfermedad progresiva (EP), respuesta parcial (RP) y enfermedad estable (EE). Los pacientes con bajos niveles de expresión de *TS* y de *ERCC1* tuvieron la mejor respuesta.

La figura 7 es un gráfico que ilustra cómo calcular la expresión de *ERCC1* con respecto a un gen de control interno. El gráfico contiene datos obtenidos con dos muestras de ensayo (incógnitas 1 y 2), e ilustra la manera de determinar los datos de expresión génica sin corregir (UGE). El gráfico ilustra asimismo la manera de normalizar la UGE generada por el instrumento TaqMan® con valores de *ERCC1* relativos conocidos determinados mediante tecnología anterior a TaqMan®. Esto se realiza multiplicando la UGE por un factor de corrección K_{ERCC1} . El gen de control interno de la figura es β -actina y el ARN calibrador es ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. N° 735017).

La figura 8 es un gráfico que ilustra la manera de calcular la expresión de *TS* con respecto a un gen de control interno. El gráfico contiene los datos obtenidos con dos muestras de ensayo (incógnitas 1 y 2), e ilustra la manera de determinar los datos de expresión génica sin corregir (UGE). El gráfico también ilustra la manera de normalizar la UGE generada por el instrumento TaqMan® con valores de *TS* publicados previamente. Esto se realiza multiplicando la UGE por un factor de corrección K_{TS} . El gen de control interno de la figura es β -actina y el ARN calibrador es ARN PE Universal; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems.

La figura 9 es una tabla que muestra la respuesta tumoral de pacientes con cáncer colorrectal al tratamiento con oxaliplatino/5-FU con respecto a la expresión de *TS*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo de que la cantidad de ARNm de *TS* y *ERCC1* se correlaciona con la resistencia a los agentes 5-FU y oxaliplatino, respectivamente. Se considera que es probable que los tumores que expresan altos niveles de ARN de *ERCC1* y/o *TS* sean resistentes a la quimioterapia a base de platino. A la inversa, es probable que aquellos tumores que expresan bajas cantidades de ARNm de *ERCC1* y *TS* sean sensibles a la quimioterapia a base de platino. El estado de expresión de ARNm de *ERCC1* y *TS* del tumor de un paciente se determina comparándolo con un nivel de expresión umbral predeterminando.

La invención proporciona un método para cuantificar la cantidad de expresión de ARNm de *ERCC1* y/o *TS* en tejido fijado o fijado e incluido en parafina (FPE) con respecto a la expresión génica de un control interno. Los presentes inventores han desarrollado cebadores oligonucleotídicos que permiten la evaluación precisa de la expresión de los genes *TS* y *ERCC1* en tejidos que se han fijados o fijado y embebido. Preferiblemente, los cebadores oligonucleotídicos de la invención, ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1), ERCC1-574R (SEQ ID NO: 2), o los cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, se usan junto con ARN extraído de muestras tumorales fijadas y embebidas en parafina (FPE). La invención también proporciona cebadores oligonucleotídicos, TS-763F (SEQ ID NO: 3), TS-825R (SEQ ID NO: 4), o cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, que se usan preferiblemente junto con ARN extraído de muestras de tumores fijadas y embebidas en parafina (FPE). Después, esta medición de la expresión génica de *TS* y/o *ERCC1* puede usarse para el pronóstico de la quimioterapia a base de platino.

También se describe en este documento una extracción fiable de ARN de una muestra FPE y, en segundo lugar, la determinación del contenido de ARNm de *ERCC1* en la muestra usando un par de cebadores oligonucleotídicos, preferiblemente el par de cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1) y ERCC1-574R (SEQ ID NO: 2), u oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, para realizar la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa.

"Sustancialmente idénticos", en el contexto de los ácidos nucleicos como se usa en este documento, se refiere a la hibridación a una diana en condiciones rigurosas, y también a que los segmentos de ácido nucleico, o sus hebras complementarias, al compararlos, son iguales si están correctamente alineados, con las inserciones y deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 60% de los nucleótidos, típicamente al menos el 70%, más típicamente al menos aproximadamente el 80%, habitualmente al menos aproximadamente el 90%, y más habitualmente, al menos aproximadamente el 95-98% de los nucleótidos. Existe hibridación selectiva cuando la hibridación es más selectiva que la falta total de especificidad. Véase, Kanehisa, Nucleic Acids Res., 12: 203-213 (1984).

Esta realización de la invención implica adicionalmente, en primer lugar, la determinación del contenido de ARNm de *TS* en la muestra mediante el uso de un par de cebadores oligonucleotídicos, preferiblemente el par de cebadores oligonucleotídicos TS-63F (SEQ ID NO: 3) y TS-825R (SEQ ID NO: 4), u oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, para realizar la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa. Se extrae ARN de las células FPE mediante cualquiera de los métodos para el aislamiento de ARNm de dichas muestras como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999.

El presente método puede aplicarse a cualquier tipo de tejido de un paciente. Para el examen de la resistencia del tejido tumoral, es preferible examinar el tejido tumoral. En una realización preferida, se examina también una porción del tejido normal obtenido del paciente del que se obtiene el tumor. Los pacientes cuyos tejidos normales se consideran resistentes a los compuestos quimioterapéuticos a base de platino, es decir, que muestran un alto nivel

de expresión génica de *TS* y/o *ERCC1*, pero aquellos cuyos tumores se consideran sensibles a dichos compuestos, es decir, muestran un bajo nivel de expresión génica de *TS* y/o *ERCC1* pueden tratarse entonces con cantidades mayores de la composición quimioterapéutica.

5 Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a una amplia gama de tipos de tumores. Esto permite la preparación de "perfiles de expresión tumoral" individuales, mediante lo cual se determinan los niveles de expresión de *TS* y/o *ERCC1* en muestras de pacientes individuales y se predice la respuesta a diversos quimioterapéuticos. Preferiblemente, los métodos de la presente invención se aplican a tumores sólidos, muy preferiblemente a tumores de adenocarcinoma colorrectal.

10 Un "nivel de umbral predeterminado", como se define en este documento con respecto a la expresión de *ERCC1*, es un nivel de expresión de *ERCC1* por encima del cual se ha encontrado que los tumores son probablemente resistentes al régimen quimioterapéutico a base de 5-FU y/o oxaliplatino. Es probable encontrar niveles de expresión inferiores a este nivel de umbral en tumores sensibles al régimen quimioterapéutico a base de 5-FU y/o oxaliplatino.

15 El rango de expresión relativa de *ERCC1*, expresado en términos de relación *ERCC1*: β -actina, entre tumores que responden a un régimen quimioterapéutico a base de platino, es inferior a aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$. Los tumores que no responden a un régimen quimioterapéutico a base de platino tienen una relación de expresión relativa de *ERCC1*: β -actina superior a $4,9 \times 10^{-3}$.

20 Un "nivel de umbral predeterminado", como se define en este documento con respecto a la expresión de *TS*, es un nivel de expresión de *TS* por encima del cual se ha descubierto que los tumores son probablemente resistentes al régimen quimioterapéutico a base de 5-FU y 5-FU y oxaliplatino. Es probable encontrar niveles de expresión inferiores a este nivel de umbral en tumores sensibles al régimen quimioterapéutico a base de 5-FU o 5-FU y oxaliplatino. El rango de expresión relativa de *TS*, expresado en términos de relación *TS*: β -actina, entre tumores que responden a un régimen quimioterapéutico a base de 5-FU o 5-FU y oxaliplatino, es inferior a aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$. Los tumores que no responden a un régimen quimioterapéutico a base de 5-FU o 5-FU y oxaliplatino tienen una relación de expresión relativa de *TS*: β -actina superior a $7,5 \times 10^{-3}$.

30 Al realizar el método de la presente invención, se ensayan los niveles de expresión de *ERCC1* o los niveles de expresión de *TS* en muestras tumorales de pacientes a fin de pronosticar la eficacia de un régimen quimioterapéutico a base de 5-FU y oxaliplatino. Además, en el método de la presente invención, se ensayan los niveles de expresión de *TS* en muestras tumorales de pacientes a fin de pronosticar la eficacia de un régimen quimioterapéutico a base de 5-FU. Adicionalmente, en el método de la presente invención se ensayan los niveles de expresión de *ERCC1* en muestras tumorales de pacientes a fin de pronosticar la eficacia de un régimen quimioterapéutico a base de oxaliplatino. Como alternativa, se ensayan tanto los niveles de expresión de *TS* como de *ERCC1* en muestras tumorales de pacientes a fin de pronosticar la eficacia de un régimen quimioterapéutico combinado a base de 5-FU y oxaliplatino.

40 Al realizar el método de esta realización de la presente invención, preferiblemente se aíslan células tumorales del paciente. Los tumores sólidos o linfoides, o porciones de los mismos, se extirpan quirúrgicamente del paciente o se obtienen mediante biopsias de rutina. El ARN aislado de las muestras congeladas o frescas se extrae de las células mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo Sambrook, Fischer y Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989). Preferiblemente, se procura evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

45 Sin embargo, el tejido obtenido del paciente tras la biopsia, a menudo es fijado, habitualmente por medio de formalina (formaldehído) o glutaraldehído, por ejemplo, o mediante inmersión en alcohol. Con frecuencia, las muestras biológicas fijadas se deshidratan y se embeben en parafina u otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la técnica. Véase Plenat y col., Ann Pathol 2001 Enero; 21(1): 29-47. Se contempla que los soportes sólidos para embeber tejido fijado puedan eliminarse con disolventes orgánicos, por ejemplo, permitiendo una rehidratación posterior del tejido conservado.

50 El ARN es extraído de las células FPE mediante cualquiera de los métodos descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999. Las muestras de tejidos fijadas y embebidas en parafina (FPE) como se describe en este documento se refieren a muestras tisulares aptas para archivar o almacenarse. El ARN puede aislarse de una muestra patológica o muestra de biopsia de archivo, que se desparafina en primer lugar. Un método de desparafinado ejemplar implica el lavado de la muestra parafinada con un disolvente orgánico, tal como xileno, por ejemplo. Las muestras desparafinadas pueden hidratarse de nuevo con una solución acuosa de alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, propanoles y butanoles. Las muestras desparafinadas pueden hidratarse de nuevo con sucesivos lavados, por ejemplo con soluciones alcohólicas inferiores de concentración decreciente. Como alternativa, la muestra se desparafina y se hidrata de nuevo simultáneamente. Después, se extrae el ARN de la muestra.

65 Para la extracción del ADN, se pueden homogeneizar las muestras fijadas o fijadas y desparafinadas utilizando medios de homogeneización mecánicos, sónicos o de otro tipo. Las muestras rehidratadas pueden homogeneizarse en una solución que comprende un agente caotrópico, tal como tiocianato de guanidinio (también comercializado

como isotiocianato de guanidinio). Las muestras homogeneizadas se calientan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C en una solución caotrópica, que contiene una cantidad eficaz de un agente caotrópico, tal como un compuesto de guanidinio. Un agente caotrópico preferido es el tiocianato de guanidinio.

5 De acuerdo con la presente invención, el ARNm se aísla de la muestra tumoral fijada y embebida en parafina mediante el calentamiento de la muestra tisular en una solución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 °C a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tipo de 5 a aproximadamente 120 minutos y que recupera dicho ARNm de dicha solución caotrópica.

15 Se elige una "concentración eficaz del agente caotrópico" de tal manera que un ARN se purifique a partir de una muestra embebida en parafina en una cantidad superior a aproximadamente 10 veces la aislada en ausencia de un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos incluyen, por ejemplo: compuestos de guanidinio, urea, formamida, yoduro potásico, tiocianato potásico y compuestos similares. El agente caotrópico preferido para los métodos de la invención es un compuesto de guanidinio, tal como isotiocianato de guanidinio (también comercializado como tiocianato de guanidinio) y clorhidrato de guanidinio. Muchos contraiones aniónicos son útiles, y un experto en la técnica puede preparar numerosas sales de guanidinio con dichos aniones apropiados. La concentración eficaz de solución de guanidinio empleada en la invención tiene generalmente una concentración en el intervalo de 20 aproximadamente 1 a aproximadamente 5 M, con un valor preferido de aproximadamente 4 M. Si el ARN ya se encuentra en solución, la solución de guanidinio puede ser de una concentración más elevada, de tal manera que la concentración final obtenida en la muestra esté en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 M. La solución de guanidinio también se tampona preferiblemente a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, más preferiblemente de aproximadamente 4, con un tampón bioquímico adecuado, tal como Tris-Cl. La solución caotrópica puede contener también agentes reductores, tales como ditioneitol (DTT) y β -mercaptoetanol (BME). La solución caotrópica puede contener además inhibidores de la RNAsa.

30 Después, el ARN se recupera de la solución caotrópica, por ejemplo mediante extracción con fenol y cloroformo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño. Después, el ARN puede purificarse adicionalmente usando técnicas de extracción, electroforesis, cromatografía, precipitación u otras técnicas adecuadas.

35 La cuantificación del ARNm de *TS* o *ERCC1* de ARNm purificado total de muestras frescas, congeladas o fijadas se realiza preferiblemente usando, por ejemplo, métodos de reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) comunes en la técnica. Otros métodos para cuantificar ARNm de *TS* o *ERCC1* incluyen, por ejemplo, el uso de marcadores moleculares y otras sondas marcadas útiles en la PCT múltiplex. Adicionalmente, la presente invención contempla la cuantificación de ARNm de *TS* y/o *ERCC1* a través del uso de un sistema sin PCR que emplea, por ejemplo, sondas marcadas con fluorescencia similares a las del ensayo Invader® (Third Wave Technologies, Inc.). Más preferiblemente, la cuantificación de ADNc de *TS* y/o *ERCC1* y un control interno o un gen constitutivo (por ejemplo, β -actina) se realiza usando un método de detección en tiempo real basado en fluorescencia (ABI PRISM 7700 o 7900 Sequence Detection System [TaqMan®], Applied Biosystems, Foster City, CA) o un sistema similar como se describe por Heid y col. (Genome Res 1996; 6: 986-994) y Gibson y col. (Genome Res 1996; 6: 995-1001). La producción del ABI 7700 (Instrumento TaqMan®) se expresa en Ct o "umbrales de ciclo". Con el sistema TaqMan®, un gen altamente expresado que tiene un número más elevado de moléculas diana en una muestra genera una señal con menos ciclos de PCR (menor Ct) que un gen de expresión relativa menor con menos moléculas diana (Ct más elevado).

50 Como se usa en este documento, gen "constitutivo" o un "control interno" pretende incluir cualquier gen constitutiva o globalmente expresado cuya presencia permita una evaluación de los niveles de ARNm de *TS* y/o *ERCC1*. Una evaluación de este tipo comprende una determinación del nivel constitutivo total de transcripción génica y un control para las variaciones de recuperación de ARN. Los genes "constitutivos" o "controles internos" pueden incluir, pero sin limitación, el gen de ciclofilina, el gen de la β -actina, el gen receptor de la transferrina, el gen GAPDH, y similares. Mucho más preferiblemente, el gen de control interno es el gen de β -actina como se describe por Eads y col., Cancer Research 1999; 59: 2302-2306.

55 Un control para las variaciones de recuperación de ARN requiere el uso de un "ARN calibrador". Se pretende que el ARN calibrador sea cualquier fuente disponible de ARN control previamente cuantificado. Preferiblemente, se utiliza ARN total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. N° 735017) para cuantificar *ERCC1* y se usa ARN PE Universal, Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems para cuantificar *TS*.

60 "Expresión génica no corregida (UGE)", como se usa en este documento, se refiere a la producción numérica de expresión de *TS* y/o *ERCC1* con respecto a un gen de control interno generado por el instrumento TaqMan®. La ecuación usada para determinar la UGE se muestra en los ejemplos 3 y 4, y se ilustra con cálculos de muestra en las figuras 7 y 8.

65 También se describe en este documento un método para normalizar los valores de expresión génica no corregida

(UGE) adquiridos del instrumento TaqMan® con valores de "expresión génica relativa conocida" obtenidos a partir de la tecnología diferente a TaqMan®. Preferiblemente, los valores de la UGE de *TS* y/o *ERCC1* obtenidos por TaqMan® de una muestra tisular se normalizan en con muestras con valores de expresión relativa de *TS* y/o *ERCC1*: β -actina obtenidos por instrumentos diferentes de TaqMan®.

5 La "expresión Relativa Corregida de *ERCC1*", como se usa en este documento, se refiere a la expresión normalizada de *ERCC1* por la que se multiplica la UGE con un factor de corrección específico para *ERCC1* (K_{ERCC1}), dando como resultado un valor que puede compararse con un rango conocido de niveles de expresión de *ERCC1* con respecto a un gen de control interno. El ejemplo 3 y la figura 7 ilustran estos cálculos en detalle. Estos valores numéricos permiten determinar si la "Expresión Relativa Corregida de *ERCC1*" de una muestra específica está o no por encima o por debajo del nivel de "umbral predeterminado". El nivel de umbral predeterminado de la Expresión Relativa Corregida de *ERCC1* con respecto al nivel de β -actina es de aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$. El K_{ERCC1} específico para, la β -actina de control interno y el ARN calibrador de Hígado Humano Total (Stratagene, Cat. N° 735017), es de $1,54 \times 10^{-3}$.

15 Los valores de "expresión génica relativa conocida" se obtienen a partir de muestras tisulares analizadas previamente y se basan en la relación de la señal de RT-PCR de un gen diana a un gen de control interno expresado constitutivamente (por ejemplo, β -actina, GAPDH, etc.). Preferiblemente, dichas muestras de tejidos son muestras de formalina fijadas y embebidas en parafina (FPE), y el ARN se extrae de las mismas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999. Para cuantificar la expresión génica con respecto a un control interno, se usa la tecnología de RT-PCR cuantitativa convencional. Se realizan reacciones de PCR con tecnología pre-TaqMan® durante un número fijo de ciclos (es decir, 30) y se indican valores finales para cada muestra. Después, estos valores se informan como una relación de la expresión de *TS* con respecto a la expresión de β -actina. Véase la patente de Estados Unidos N° 5.705.336 de Reed y col.

30 El K_{ERCC1} puede determinarse para un gen de control interno distinto de β -actina y/o un ARN calibrador diferente del ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. N° 735017). Para hacerlo, se debe calibrar tanto el gen de control interno como el ARN calibrador con respecto a las muestras de tejidos para las cuales ya se han determinado los niveles de expresión de *ERCC1* con respecto a los del gen de control interno específico (es decir, "expresión génica relativa conocida"). Preferiblemente, dichas muestras de tejidos son muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (FPE) y se extrae el ARN de las mismas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Un determinación de este tipo se puede realizar usando técnicas de RT-PCR cuantitativa pre-TaqMan® convencionales bien conocidas en la técnica. Después de una determinación de este tipo, dichas muestras tienen niveles de "expresión génica relativa conocida" de *ERCC1* útiles para determinar un nuevo K_{ERCC1} específico para el nuevo control interno y/o ARN calibrador como se describe en el ejemplo 3.

40 La expresión "Expresión Relativa Corregida de *TS*", como se usa en este documento, se refiere a la expresión normalizada de *TS* por la que se multiplica la UGE por un factor de corrección específico para *TS* (K_{TS}), dando como resultado un valor que puede compararse con un intervalo conocido de niveles de expresión de *TS* con respecto a un gen de control interno. El ejemplo 4 y la figura 8 ilustran estos cálculos en detalle. Estos valores numéricos permiten determinar si la "Expresión Relativa Corregida de *TS*" de una muestra particular está por encima o por debajo del nivel de "umbral predeterminado". El nivel de umbral predeterminado de la Expresión Relativa Corregida de *TS* con respecto al nivel de β -actina es de aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$. El K_{TS} específico para *TS*, la β -actina de control interno y el ARN PE Universal calibrador; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems, es de $12,6 \times 10^{-3}$.

50 El K_{TS} puede determinarse para un gen de control interno distinto de β -actina y/o un ARN calibrador diferente del ARN PE Universal; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems. Para hacerlo, se debe calibrar tanto el gen de control interno como el ARN calibrador con respecto a las muestras de tejidos para las que ya se han determinado los niveles de expresión de *TS* con respecto a los del gen de control interno específico (es decir, "expresión génica relativa conocida" o "previamente publicada"). Preferiblemente, dichas muestras de tejidos son muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (FPE) y se extrae el ARN de las mismas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999.

55 Dicha determinación se puede hacer usando técnicas de RT-PCR cuantitativa pre-TaqMan® convencionales bien conocidas en la técnica. Después de una determinación de este tipo, dichas muestras tienen niveles de "expresión génica relativa conocida" de *TS* útiles para determinar un nuevo K_{TS} específico para el nuevo control interno y/o ARN calibrador como se describe en el ejemplo 4.

60 Los resultados de la expresión génica relativa "anteriormente publicados" se basan en la relación de la señal de RT-PCR de un gen diana con respecto a un gen constitutivamente expresado β -actina. En los estudios por tecnología pre-TaqMan®, se realizaron reacciones de PCR durante un número establecido de ciclos (es decir, 30) y se dieron a

65

conocer los valores finales para cada muestra. Después, estos valores se informaron como una relación de la expresión de *ERCC1* o *TS* con respecto a la expresión de β -actina. Salonga y col., Clinical Cancer Research, 6: 1322-1327, 2000.

- 5 Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a una amplia gama de tipos de tejidos y tumores y, por tal motivo, pueden usarse para la evaluación del tratamiento clínico de un paciente y como herramienta de diagnóstico o pronóstico para una variedad de cánceres, incluyendo el de mama, cabeza y cuello, pulmón, esófago, colorrectal, y otros. En una realización preferida, los presentes métodos se aplican al pronóstico del adenocarcinoma colorrectal.
- 10 Habitualmente se dispone de biopsias de tumores con anterioridad al tratamiento quimioterapéutico sólo en forma de tejidos fijados y embebidos en parafina (FPE), que generalmente contienen sólo una pequeñísima cantidad de tejido heterogéneo. Dichas muestras FPE se prestan fácilmente a la microdissección, por lo que se puede determinar la expresión génica de *ERCC1* y/o *TS* en tejido tumoral sin contaminar con tejido estromal. Además, se pueden hacer comparaciones entre tejido estromal y tumoral dentro de una muestra de tejido de biopsia, puesto que dichas
- 15 muestras con frecuencia contienen ambos tipos de tejidos.

Por lo general, se puede usar cualquier par de oligonucleótidos que flanquee una región del gen *ERCC1*, como se muestra en la SEQ ID NO: 10, para realizar los métodos de la presente Invención. Los cebadores que se hibridan en condiciones rigurosas a una región del gen *ERCC1* para su uso en la presente invención amplificarán un producto

20 de entre 20-1000 pares de bases, preferiblemente de 50-100 pares de bases, y mucho más preferiblemente de menos de 100 pares de bases.

La invención proporciona pares de cebadores oligonucleotídicos específicos y cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, que permiten una evaluación particularmente precisa de la expresión de

25 *ERCC1* usando tejidos FPE. Se prefieren los cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1) y ERCC1 (SEQ ID NO: 2) (también denominados en este documento como el par de cebadores oligonucleotídicos ERCC1), y cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos. Se ha demostrado que los cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1) y ERCC1 (SEQ ID NO: 2) son especialmente eficaces para medir los niveles de ARNm de *ERCC1* usando ARN extraído de células FPE mediante cualquiera de los métodos para el

30 aislamiento de ARNm, por ejemplo como se describe en el ejemplo 1.

Además, se puede usar cualquier par de oligonucleótidos que flanquee una región del gen *TS*, como se muestra en la SEQ ID NO: 11, para realizar los métodos de la presente Invención. Los cebadores que hibridan en condiciones rigurosas a una región del gen *TS* para su uso en la presente invención amplificarán un producto de entre 20-1000

35 pares de bases, preferiblemente de 50-100 pares de bases, y mucho más preferiblemente de menos de 100 pares de bases.

La invención proporciona pares de cebadores oligonucleotídicos específicos y cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, que permiten una evaluación particularmente precisa de la expresión de

40 *TS* usando tejidos FPE. Se prefieren los cebadores oligonucleotídicos TS-763F (SEQ ID NO: 3) y TS (SEQ ID NO: 4) (también denominados en este documento como el par de cebadores oligonucleotídicos TS), y cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos. Se ha demostrado que los cebadores oligonucleotídicos TS-763F (SEQ ID NO: 3) y TS (SEQ ID NO: 4) son especialmente eficaces para medir los niveles de ARNm de *TS* usando ARN extraído de células FPE mediante cualquiera de los métodos para el aislamiento de ARNm, por ejemplo

45 como se describe en el ejemplo 1.

También se describen oligonucleótidos sustancialmente idénticos que hibridan en condiciones rigurosas (como se define en este documento) a toda o una porción de la secuencia de cebadores oligonucleotídicos de ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1), su complemento o ERCC1-574R (SEQ ID NO: 2), o su complemento, o bien la secuencia de

50 cebadores oligonucleotídicos de TS-763F (SEQ ID NO: 3), su complemento o TS-825R (SEQ ID NO: 4), o su complemento.

En condiciones de hibridación rigurosas, sólo hibridan las secuencias altamente complementarias, es decir las secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente similares como se define en este documento. Preferiblemente,

55 dichas condiciones impiden la hibridación de ácidos nucleicos que tienen 4 o más desemparejamientos de cada 20 nucleótidos contiguos, más preferiblemente 2 o más desemparejamientos de cada 20 nucleótidos contiguos, mucho más preferiblemente uno o más desemparejamientos de cada 20 nucleótidos contiguos.

La porción de hibridación de los ácidos nucleicos tiene típicamente una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos (por ejemplo, 15). La porción que se hibrida del ácido nucleico que se hibrida es al menos

60 aproximadamente el 80%, preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, o mucho más preferiblemente aproximadamente al menos el 98%, idéntica a la secuencia de una porción o la totalidad del cebador oligonucleotídico ERCC1-504F (SEQ ID NO: 1), su complemento o ERCC1-574R (SEQ ID NO: 2) o su complemento, o bien el cebador oligonucleotídico TS-763F (SEQ ID NO: 3), su complemento o TS-825R (SEQ ID

65 NO: 4) o su complemento.

A continuación, se define la hibridación del cebador oligonucleotídico a una muestra de ácido nucleico en condiciones rigurosas. La estabilidad del dúplex de ácido nucleico o híbrido se expresa en términos de temperatura de fusión (T_m), que es la temperatura a la cual la sonda se disocia del ADN diana. Se utiliza esta temperatura de fusión para definir las condiciones de rigurosidad necesarias. Si las secuencias a identificar son sustancialmente idénticas a la sonda, en lugar de idénticas, entonces es útil establecer en primer lugar la temperatura menor a la que sólo se produce la hibridación homóloga con una concentración determinada de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Después, suponiendo que el 1% de desemparejamiento da como resultado un descenso de 1 °C de la T_m , la temperatura del lavado final de la reacción de hibridación se reduce en la misma proporción (por ejemplo, si se buscan secuencias con >95% de identidad con la sonda, la temperatura del lavado final se reduce en 5 °C). En la práctica, el cambio de T_m puede ser de entre 0,5 °C y 1,5 °C por el 1% de desemparejamiento.

Las condiciones rigurosas implican la hibridación a 68 °C en 5 x SSC/5 x solución de Denhardt/SDS al 1,0%, y lavado con 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Las condiciones moderadamente rigurosas incluyen lavado en 3 x SSC a 42 °C. Los parámetros de la concentración de sal y temperatura pueden variarse a fin de obtener un nivel óptimo de identidad entre el cebador y el ácido nucleico diana. En la técnica se pueden conseguir fácilmente más directrices con respecto a dichas condiciones, por ejemplo Sambrook, Fischer y Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989) y F. M. Ausubel y col. edit. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1994).

Los cebadores oligonucleotídicos divulgados en este documento son capaces de permitir una evaluación precisa de la expresión génica de *TS* y/o *ERCC1* en un tejido fijado o fijado y embebido en parafina, así como en tejido congelado o fresco. Esto es así, pese al hecho de que el ARN obtenido a partir de muestras PFE es más fragmentado que el del tejido fresco o congelado. Por consiguiente, los métodos de la invención son adecuados para su uso en el ensayo de los niveles de expresión génica de *TS* y/o *ERCC1* en tejido PFE, donde previamente no existía manera de analizar la expresión génica de *TS* y/o *ERCC1* usando tejidos fijados.

Los agentes genotóxicos que se pueden usar en combinación con una quimioterapia a base de 5-FU y oxaliplatino son aquellos que forman lesiones genómicas persistentes y se prefieren para su uso como agentes quimioterapéuticos en el control clínico del cáncer. La tasa de reparación celular del daño del ADN inducido por genotoxinas, así como la tasa de crecimiento celular a través del ciclo de división celular, afecta al resultado de la terapia con genotoxinas. Las lesiones sin reparar en el genoma de una célula pueden impedir la replicación del ADN, deteriorar la fidelidad del ADN recién sintetizado u obstaculizar la expresión de los genes necesarios para la supervivencia celular. Por lo tanto, un determinante de la citotoxicidad de un agente genotóxico (propensión para contribuir a la muerte celular) es la resistencia de las lesiones genómicas formadas a partir de la misma a la reparación celular. Los agentes genotóxicos que forman lesiones genómicas persistentes, por ejemplo lesiones que permanecen en el genoma al menos hasta que la célula se someta al ciclo celular, generalmente son citotoxinas más efectivas que los agentes que forman lesiones genómicas transitorias, fácilmente reparadas.

La genotoxina Oxaliplatino, es decir, cis-oxalato(trans-1-1,2-ciclohexandiamina)platino (II) se ha descrito en la patente de Estados Unidos Nº 4.169.846. Las patentes relacionadas incluyen: la patente de Estados Unidos Nº 5.290.961; la patente de Estados Unidos Nº 5.298.642; la patente de Estados Unidos Nº 5.338.874; la patente de Estados Unidos Nº 5.420.319 y el documento PCT/IB/00614. El oxaliplatino pertenece a la clase de los complejos de platino (II)-trans-1,2-diaminociclohexano que actualmente se encuentra en pleno desarrollo. Dichos complejos, o complejos "dach", se están sometiendo a pruebas clínicas y son especialmente eficaces contra los melanomas y tumores de los ovarios, el útero, el estómago y el intestino, etc. Otros compuestos que se pueden usar para complementar las quimioterapias a base de 5-FU y oxaliplatino pueden incluir también miembros análogos del oxaliplatino, tales como complejos "dach" y los que forman aductos covalentes de ADN. En una realización preferida, el compuesto de platino complementario usado en la presente invención es el oxaliplatino.

Los tumores que se pueden controlar en la actualidad mediante compuestos coordinados de platino incluyen los carcinomas testicular, endometrial, cervical, gástrico, de células escamosas, adrenocortical y pulmonar de células pequeñas, junto con los meduloblastomas y neuroblastomas.

Habiéndose así descrito la invención, la práctica de la invención se ilustra mediante los ejemplos experimentales que se proporcionan a continuación. El experto apreciará que los materiales y métodos usados en los ejemplos ilustrativos pueden modificarse de diversas maneras.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de ARN de tejido PFE

Se extrae ARN de tejido embebido en parafina mediante el siguiente procedimiento general:

A. DESPARAFINADO E HIDRATACIÓN DE LAS SECCIONES:

- (1) Una porción de aproximadamente 10 μ M se coloca en un tubo de centrifuga de plástico de 1,5 ml.
- 5 (2) Se añaden 600 μ l de xileno y la mezcla se agita vigorosamente durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente de 20 a 25 $^{\circ}$ C).
- (3) La muestra se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos a temperatura ambiente a la velocidad máxima de la centrifuga de laboratorio (aproximadamente 10-20.000 x g).
- 10 (4) Se repiten los pasos 2 y 3 hasta que la mayor parte de la parafina se ha disuelto. Normalmente se requieren dos o más veces, dependiendo de la cantidad de parafina incluida en la porción de muestra original.
- (5) La solución de xileno se elimina mediante la agitación vigorosa con un alcohol inferior, preferiblemente con etanol al 100% (aproximadamente 600 μ l) durante aproximadamente 3 minutos.
- 15 (6) El tubo se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos, como en la etapa (3). Se decanta y descarta el sobrenadante. El gránulo se vuelve de color blanco.
- (7) Se repiten las etapas 5 y 6 con soluciones de etanol cada vez más diluidas: en primer lugar con aproximadamente el 95% de etanol, después con aproximadamente el 80%, y por último con aproximadamente el 70% de etanol.
- 20 (8) La muestra se centrifuga durante 7 minutos a temperatura ambiente como en la etapa (3). Se descarta el sobrenadante y se deja que el gránulo se seque a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.
- 25

B. AISLAMIENTO DE ARN CON FENOL-CLOROFORMO

- (1) Se añaden 400 μ l de una solución de isotiocianato de guanidina que incluye sarcosina al 0,5% y 8 μ l de ditiotreitól.
- 30 (2) Después, la muestra se homogeneiza con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC) durante aproximadamente 2 a 3 minutos, mientras gradualmente se aumenta la velocidad de baja velocidad (velocidad 1) a alta velocidad (velocidad 5).
- 35 (3) Después, la muestra se calienta a aproximadamente 95 $^{\circ}$ C durante aproximadamente 5-20 minutos. Es preferible perforar el tapón del tubo que contiene la muestra con una aguja de fino calibre antes del calentamiento a 95 $^{\circ}$ C. Como alternativa, el tapón puede fijarse con una abrazadera de plástico o con película de laboratorio.
- 40 (4) Después, la muestra se extrae con 50 μ l de acetato sódico 2 M a un pH 4,0 y 600 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (10:1,93:0,036), recién preparado mezclando 18 ml de fenol con 3,6 ml de una solución 1:49 de alcohol isoamílico:cloroformo. La solución se agita vigorosamente durante aproximadamente 10 segundos y después se enfría sobre hielo durante aproximadamente 15 minutos.
- 45 (5) La solución se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos a velocidad máxima. La fase superior (acuosa) se transfiere a un nuevo tubo.
- (6) Se hace precipitar el ARN con aproximadamente 10 μ l de glucógeno y con 400 μ l de isopropanol durante 30 minutos a -20 $^{\circ}$ C.
- 50 (7) Se granula el ARN por centrifugación durante aproximadamente 7 minutos en una centrifuga de laboratorio a velocidad máxima; el sobrenadante se decanta y se descarta; y el gránulo se lava con aproximadamente 500 μ l de etanol aproximadamente del 70 al 75%.
- 55 (8) La muestra se centrifuga de nuevo durante 7 minutos a velocidad máxima. El sobrenadante se decanta y el gránulo se seca al aire. Después, el gránulo se disuelve en un tampón apropiado para experimentos adicionales (por ejemplo, 50 μ l de Tris cloruro 5 mM, pH 8,0).

Ejemplo 2

60 *Transcripción inversa de ARNm y PCR*

Transcripción inversa: Se aisló ARN de tejido fijado con formalina y embebido en parafina (FPE) microdisecionado o sin microdisecionar como se ilustra en el ejemplo 1 y como se ha descrito previamente en la solicitud de patente de Estados Unidos N $^{\circ}$ 09/469.338 presentada el 20 de diciembre de 1999. Después de la precipitación con etanol y la centrifugación, se disolvió el gránulo de ARN en 50 μ l de Tris/Cl 5 mM a pH 8,0. La Transcriptasa Inversa M-MLV

65

extenderá un cebador oligonucleotídico hibridado a un patrón de ARN o ADN de cadena simple en presencia de desoxinucleótidos, produciendo una hebra complementaria. El ARN resultante se transcribió inversamente con hexámeros aleatorios y Transcriptasa Inversa M-MLV de Life Technologies. La transcripción inversa se realizó mezclando 25 μ l de la solución de ARN con 25,5 μ l de "mezcla de transcripción inversa" (véase a continuación). Se colocó la reacción en un termociclador durante 8 min a 26 °C (para unir los hexámeros aleatorios al ARN), durante 45 min a 42 °C (para la reacción enzimática de la transcripción inversa M-MLV) y durante 5 min a 95 °C (para la inactivación por calor de la DNAsa).

La "mezcla de transcripción inversa" consiste en 10 μ l de tampón 5 X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 0,5 μ l de hexámeros aleatorios (D.O. 50 disuelto en 5550 μ l de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), 5 μ l de dNTP 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 μ l de DTT 0,1 M, 1,25 μ l de BSA (3 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), 1,25 μ l de RNA Guard 24.800 U/ml (inhibidor de la RNAsa) (porcino N° 27-0816, Amersham Pharmacia) y 2,5 μ l de MML V 200 U/ μ l (Life Tech Cat. N° 28025-02). Las concentraciones finales de los componentes de la reacción son: Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTP 1,0 mM, DTT 1,0 mM, 0,00375 mg/ml de BSA, 0,62 U/ μ l de RNA Guard y 10 U/ μ l de MMLV.

Quantificación por PCR de la expresión de ARNm: La cuantificación de ADNc de *ERCC1* y ADNc de un control interno o gen constitutivo (por ejemplo, β -actina) se realizó usando un método de detección en tiempo real basado en fluorescencia (ABI Prism 7700 o 7900 Sequence Detection System [TaqMan®], Applied Biosystems, Foster City, CA) como se describe por Heid y col. (Genome Res 1996; 6: 986-994) y Gibson y col. (Genome Res 1996; 6: 995-1001). En resumen, este método usa una sonda de oligonucleótidos fluorogénica de doble marcación TaqMan®, (*ERCC1-530Tc* (SEQ ID NO: 5), $T_m = 70$ °C, *TS-781* (SEQ ID NO: 6), β -actina-611 (SEQ ID NO: 7) que se hibrida específicamente dentro de los cebadores directo e inverso. La estimulación por láser dentro de los pocillos tapados que contienen la mezcla de reacción causa la emisión de un colorante inhibidor 3' (TAMRA) hasta que la sonda se escinde por la actividad de la nucleasa de 5' a 3' de la ADN polimerasa durante la extensión por PCR, causando la liberación de un colorante indicador 5' (6FAM). Por lo tanto, la producción de un amplicón genera la emisión de una señal fluorescente que se detecta por la cámara de detección CCD (dispositivo de carga acoplada) de TaqMan®, y la cantidad de señal producida en el ciclo umbral dentro de la fase puramente exponencial de la reacción de PCR refleja el número de copias inicial de la secuencia de interés. La comparación del número de copias inicial de la secuencia de interés con el número de copias inicial del gen de control interno proporciona un nivel de expresión génica relativo. Los análisis de TaqMan® proporcionan los niveles que se expresan en términos de relaciones entre dos mediciones absolutas (gen de interés/gen de control interno).

La mezcla de reacción de PCR consistió en 0,5 μ l de la reacción de transcripción inversa que contenía el ADNc preparado como se ha descrito anteriormente, 600 nM de cada uno de los cebadores oligonucleotídicos *ERCC1-504F* (SEQ ID NO: 1, $T_m = 59$ °C) y *ERCC1-574R* (SEQ ID NO: 2, $T_m = 58$ °C), o los cebadores oligonucleotídicos *TS-763F* (SEQ ID NO: 3) y *TS-825R* (SEQ ID NO: 4), 200 nM de sonda TaqMan® (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6), 5 U de Polimerasa AmpliTaq Gold, 200 μ M de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 400 μ M, MgCl₂ 5,5 mM y 1 x Tampón Taqman A que contiene un colorante de referencia, a un volumen final inferior o igual a 25 μ l (todos los reactivos de Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de ciclado fueron, 95 °C durante 10 min seguido por 45 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. Los oligonucleótidos usados para cuantificar el gen de control interno de β -actina fueron β -Actina-592F (SEQ ID NO: 8) y β -Actina-651 R (SEQ ID NO: 9).

Ejemplo 3

Determinación de la expresión génica sin corregir (UGE) para *ERCC1*

Se realizan dos pares de reacciones paralelas. Las reacciones de "ensayo" y las reacciones de "calibración". Figura 7. La reacción de amplificación de *ERCC1* y la reacción de amplificación del control interno de β -actina son las reacciones de ensayo. Se realizan reacciones de amplificación separadas para *ERCC1* y β -actina en el patrón de ARN calibrador y se denominan como las reacciones de calibración. El instrumento TaqMan® producirá cuatro valores umbral de ciclo diferentes (C_t): C_{tERCC1} y $C_{t\beta-actina}$ a partir de las reacciones de ensayo y C_{tERCC1} , y $C_{t\beta-actina}$ a partir de las reacciones de calibración. Las diferencias en los valores C_t para las dos reacciones se determinan de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta C_{t_{ensayo}} = C_{tERCC1} - C_{t\beta-actina} \text{ (A partir de la reacción de "ensayo")}$$

$$\Delta C_{t_{calibrador}} = C_{tERCC1} - C_{t\beta-actina} \text{ (A partir de la reacción de "calibración")}$$

A continuación, la etapa implica elevar el número 2 al ΔC_t negativo, de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

$$2^{-\Delta C_{t_{ensayo}}} \text{ (A partir de la reacción de "ensayo")}$$

$$2^{-\Delta C_{t_{calibrador}}} \text{ (A partir de la reacción de "calibración")}$$

A fin de obtener seguidamente la expresión génica sin corregir para *ERCC1* a partir del instrumento TaqMan®, se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Expresión génica sin corregir (UGE) para ERCC1} = 2^{-\Delta Ct_{\text{ensayo}}}/2^{-\Delta Ct_{\text{calibrador}}}$$

5

Normalización de la UGE con niveles de expresión relativos de ERCC1 conocidos

El cálculo de normalización conlleva una multiplicación de la UGE con un factor de corrección (K_{ERCC1}) específico de *ERCC1* y un ARN calibrador específico. También se puede determinar el factor de corrección K_{ERCC1} para cualquier gen de control interno y cualquier ARN calibrador previamente cuantificado con precisión. Preferiblemente, se usan el gen de control interno β -actina y el ARN calibrador previamente cuantificado con precisión, ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. Nº 735017). Dados estos reactivos, el factor de corrección K_{ERCC1} equivale a $1,54 \times 10^{-3}$.

10

La normalización se realiza usando una modificación del método de ΔCt descrito por Applied Biosystems, el fabricante de TaqMan®, en el Boletín de Usuario Nº 2 y que se ha descrito anteriormente. Para realizar este procedimiento, se analizó la UGE de 6 tejidos de ensayo diferentes para determinar la expresión de *ERCC1* usando la metodología TaqMan® que se ha descrito anteriormente. Se utilizó el gen de control interno β -actina y el ARN calibrador, ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. Nº 735017).

15

El nivel de expresión relativa de *ERCC1* conocida de cada muestra AG221, AG222, AG252, Pulmón Adulto, PC3, AdCol se dividió por su UGE obtenida por TaqMan® correspondiente para producir un factor de corrección no promediado K.

20

$$K_{\text{no promediado}} = \text{Valores Conocidos/UGE}$$

25

A continuación, se promediaron todos los valores K a fin de determinar un solo factor de corrección K_{ERCC1} específico para *ERCC1*, ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. Nº 735017) del ARN calibrador y β -actina.

Por lo tanto, para determinar la Expresión Relativa Corregida de *ERCC1* en una muestra tisular desconocida en una escala que sea compatible con los estudios de expresión de *ERCC1* por TaqMan®, simplemente se multiplican los datos de expresión génica sin corregir (UGE) obtenidos a partir del aparato TaqMan® por un factor de corrección específico K_{ERCC1} , teniendo en cuenta el uso del mismo gen de control interno y el ARN calibrador.

30

$$\text{Expresión relativa corregida de ERCC1} = \text{UGE} \times K_{ERCC1}$$

35

Se puede determinar un K_{ERCC1} usando cualquier ARN calibrador previamente cuantificado con precisión o gen de control interno. Las fuentes futuras de ARN previamente cuantificado con precisión pueden calibrarse para muestras con niveles conocidos de expresión relativa de *ERCC1* como se ha descrito en el método anterior, o pueden calibrarse en este caso frente a un ARN calibrador previamente calibrado, tal como ARN Total de Hígado Humano (Stratagene, Cat. Nº 735017) que se ha descrito anteriormente.

40

Por ejemplo, si se determina un K_{ERCC1} posterior para un gen de control interno diferente y/o un ARN calibrador diferente, se debe calibrar tanto el gen de control interno como el ARN calibrador con respecto a muestras de tejidos para las que ya se han determinado los niveles de expresión relativa de *ERCC1* para ese gen de control interno particular. Una determinación de este tipo puede realizarse usando técnicas de RT-PCR cuantitativa pre-TaqMan® convencionales bien conocidas en la técnica. Los niveles de expresión conocidos para estas muestras se dividen por sus correspondientes niveles de UGE a fin de determinar un valor K para esta muestra. Después, los valores K se promedian dependiendo del número de muestras conocidas para determinar un nuevo K_{ERCC1} específico con respecto al gen de control interno diferente y/o al ARN calibrador.

45

50

Ejemplo 4

Determinación de la expresión génica sin corregir (UGE) para TS

Se realizan dos pares de reacciones paralelas. Las reacciones de "ensayo" y las reacciones de "calibración". Figura 8. La reacción de amplificación de *TS* y la reacción de amplificación del control interno de β -actina son las reacciones de ensayo. Se realizan reacciones de amplificación separadas para *TS* y β -actina en el patrón de ARN calibrador y se denominan como las reacciones de calibración. El instrumento TaqMan® producirá cuatro valores umbral de ciclo diferentes (Ct): Ct_{TS} y $Ct_{\beta\text{-actina}}$ a partir de las reacciones de ensayo y Ct_{TS} , y $C_{\beta\text{-actina}}$ a partir de las reacciones de calibración. Las diferencias en los valores C_t para las dos reacciones se determinan de acuerdo con la siguiente ecuación:

60

$$\Delta Ct_{\text{ensayo}} = Ct_{TS} - Ct_{\beta\text{-actina}} \text{ (A partir de la reacción de "ensayo")}$$

65

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{TS} - Ct_{\beta\text{-actina}} \text{ (A partir de la reacción de "calibración")}$$

A continuación, la etapa consiste en elevar el número 2 al ΔCt negativo, de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

5 $2^{-\Delta Ct_{\text{ensayo}}}$ (A partir de la reacción de "ensayo")

$2^{-\Delta Ct_{\text{calibrador}}}$ (A partir de la reacción de "calibración")

A fin de obtener seguidamente la expresión génica sin corregir para TS a partir del instrumento TaqMan®, se realiza el siguiente cálculo:

10 Expresión génica sin corregir (UGE) para $TS = 2^{-\Delta Ct_{\text{ensayo}}}/2^{-\Delta Ct_{\text{calibrador}}}$

Normalización de la UGE con niveles de expresión relativos de TS conocidos

15 El cálculo de normalización conlleva una multiplicación de la UGE con un factor de corrección (K_{TS}) específico para TS y un ARN calibrador específico. También se puede determinar el factor de corrección K_{TS} para cualquier gen de control interno y cualquier ARN calibrador previamente cuantificado con precisión. Preferiblemente, se usan el gen de control interno β -actina y el ARN calibrador previamente cuantificado con precisión, ARN PE Universal; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems. Dados estos reactivos, el factor de corrección K_{TS} equivale a $12,6 \times 10^{-3}$.

25 La normalización se realiza usando una modificación del método de ΔCt descrito por Applied Biosystems, el fabricante de TaqMan®, en el Boletín de Usuario N° 2 y que se ha descrito anteriormente. Para realizar este procedimiento, se analizó la UGE de 6 tejidos de ensayo diferentes para determinar la expresión de TS usando la metodología TaqMan® que se ha descrito anteriormente. Estas muestras de tejido se describen en Salonga, y col., Clinical Cancer Research, 6: 1322-1327, 2000.

30 Se utilizó el gen de control interno β -actina y el ARN calibrador, ARN PE Universal; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems.

El nivel de expresión relativa de TS conocida de cada muestra L7, L91, L121, L150, L220, L164 se dividió por su UGE obtenida por TaqMan® correspondiente para producir un factor de corrección no promediado K . Salonga, y col., Clinical Cancer Research, 6: 1322-1327, 2000.

35 $K_{\text{no promediado}} = \text{Valores conocidos}/\text{UGE}$

A continuación, se promediaron todos los valores K a fin de determinar un solo factor de corrección K_{ERCC1} específico para TS , ARN PE Universal de Applied Biosystems; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems, del ARN calibrador y β -actina.

40 Por lo tanto, para determinar la Expresión Relativa Corregida de TS en una muestra tisular desconocida en una escala que sea compatible con los estudios de expresión de TS por TaqMan®, simplemente se multiplican los datos de expresión génica sin corregir (UGE) obtenidos a partir del aparato TaqMan® por un factor de corrección específico K_{TS} , teniendo en cuenta el uso del mismo gen de control interno y el ARN calibrador.

45 Expresión relativa corregida de $TS = \text{UGE} \times K_{TS}$

50 Se puede determinar un K_{TS} usando cualquier ARN calibrador previamente cuantificado con precisión o gen de control interno. Las fuentes futuras de ARN previamente cuantificado con precisión pueden calibrarse para muestras con niveles conocidos de expresión relativa de $ERCC1$ como se ha descrito en el método anterior, o pueden calibrarse en este caso frente a un ARN calibrador previamente calibrado, tal como ARN PE Universal; Cat. N° 4307281, lote N° 3617812014 de Applied Biosystems, que se ha descrito anteriormente.

55 Por ejemplo, si se determina un K_{TS} posterior para un gen de control interno diferente y/o un ARN calibrador diferente, se debe calibrar tanto el gen de control interno como el ARN calibrador con respecto a muestras de tejidos para las que ya se han determinado los niveles de expresión relativa de TS para ese gen de control interno particular. Una determinación de este tipo puede realizarse usando técnicas de RT-PCR cuantitativa pre-TaqMan® convencionales bien conocidas en la técnica. Los niveles de expresión conocidos para estas muestras se dividen por sus correspondientes niveles de UGE a fin de determinar un valor K para esta muestra. Después, los valores K se promedian dependiendo del número de muestras conocidas para determinar un nuevo K_{TS} específico con respecto al gen de control interno diferente y/o al ARN calibrador.

Ejemplo 5

65 *Selección de los pacientes y tratamiento con quimioterapia*

Todos los pacientes se apuntaron en el protocolo solidario 3C-98-3 en el Centro Médico de la Universidad de California del Sur (University of Southern California Medical Center) de 1998-2000 y recibieron el siguiente régimen de terapia de combinación de oxaliplatino/5-FU: 130 mg/m² de oxaliplatino más infusión continua de 5-FU. Todos los
 5 pacientes habían fracasado en un tratamiento anterior con 5-FU y 60% (30/50) habían fracasado en un tratamiento adicional de segunda línea con irinotecan (CPT-11). Todos los pacientes mostraron la enfermedad activa de cáncer colorrectal de fase IV al momento de su ingreso en el protocolo.

Evaluación clínica y criterios de respuesta

10 Durante la quimioterapia, se registraron evaluaciones semanales en cuanto a estado de rendimiento, peso, dolor abdominal, recuentos sanguíneos completos y niveles de creatinina sérica y urea y nitrógeno en sangre. Se mide la carga tumoral usando tomografía computada (CT). Se requirió una masa tumoral apreciable bidimensionalmente al momento del ingreso en el protocolo. Los que respondieron a la terapia se clasificaron como pacientes cuya carga
 15 tumoral se había reducido en el 50% o más durante al menos 6 semanas. Los que no respondieron incluían aquellos con enfermedad estable o progreso del cáncer. Se computó la supervivencia en cuando al número de días desde el inicio de la quimioterapia con 5-FU/oxaliplatino hasta la muerte, cualquiera que fuera la causa. Los pacientes que estaban vivos en la última evaluación de seguimiento se eliminaron en ese momento.

Análisis estadístico

Los análisis de TaqMan® producen niveles que se expresan como relaciones entre dos mediciones absolutas (gen de interés: gen de referencia interna). Se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para evaluar las
 25 asociaciones de la expresión de *TS* y *ERCC1* (como variables continuas) con los datos demográficos de los pacientes. Zar, Biostatistical Analysis, Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. (1974) págs. 109-114 y 139-142, respectivamente. El método de chi cuadrado máximo de Miller y Sigmund (Biometrics 38: 1011-1016, 1982) y Halpern (Biometrics 38: 1017-1023, 1982) se adaptó para determinar qué nivel de umbral de corte podía dividir mejor a los pacientes en subgrupos de baja y alta expresión de *TS* y *ERCC1*. Se utilizó la prueba de chi cuadrado de Pearson para evaluar las asociaciones entre los marcadores moleculares divididos y con respecto a la quimioterapia,
 30 Zar, Biostatistical Analysis; Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. (1974) págs. 59-68. Se usaron relaciones de riesgo para calcular los riesgos de muerte relativos. Schulman, Infection Control & Hospital Epidemiology, 18: 65-73, 1997. Estos cálculos se basaron en el cálculo de Pike, con el uso del número de eventos observado y estimado en cuando como se calculó en la estadística de la prueba del logaritmo de rango. (Pike, J R Stat Soc Series A 135: 201-203, 1972). Para determinar un valor P que sería interpretado como medida de la potencia de la asociación basada en el análisis de chi cuadrado máximo, se utilizaron 1000 simulacros del método de remuestreo para calcular la distribución de la estadística de chi cuadrado máximo bajo la hipótesis de falta de asociación (Halpern, Biometrics 38: 1017-1023, 1982). El nivel de significancia se fijó en $p < 0,05$.

Demografía y pacientes disponibles para la evaluación de la respuesta y la supervivencia

40 En este estudio se evaluó un total de 50 pacientes, que consistían en 14 mujeres (28%) y 36 hombres (72%), con una edad media de 59 (mín. 34; máx. 83 años). Los antecedentes étnicos de este grupo incluían 39 blancos caucásicos, 6 hispanos, 3 asiáticos y 2 afroamericanos. Los 50 pacientes pudieron ser evaluados para asociar los niveles de expresión de *TS* y de expresión de *ERCC1* con supervivencia. Cuarenta y cinco (90%) pudieron ser
 45 evaluados para comprobar la asociación de estos parámetros moleculares con la respuesta mediante los criterios que se han citado anteriormente.

*Niveles de expresión de *TS* y niveles de expresión de *ERCC1**

50 Se aisló ARNm total de muestras tumorales FPE microdisecionadas con anterioridad al tratamiento, y se midieron los niveles de expresión relativa de ARNm de *ERCC1*: β -actina y/o *TS*: β -actina usando RT-PCR cuantitativa. Un método para el aislamiento de ARNm de dichas muestras se ha descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999. Se utilizó un sistema de ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT/PCR) para determinar el nivel de expresión
 55 de *ERCC1* y de β -actina, como se ha descrito en el ejemplo 2. Se determinó la expresión relativa corregida de *ERCC1* y/o *TS* como se ha descrito en los ejemplos 3 y 4, respectivamente.

Se pudo detectar la expresión génica de *TS* en todas las 50 muestras analizadas. La expresión media corregida de *TS*, con respecto al gen constitutivo, β -actina, fue de $3,4 \times 10^{-3}$ (mín: $0,18 \times 10^{-3}$; máx: $11,5 \times 10^{-3}$). Se pudo detectar la expresión génica de *ERCC1* en 47 muestras (94%) analizadas. La expresión media corregida de *ERCC1*, con respecto al gen constitutivo, β -actina, fue de $2,53 \times 10^{-3}$ (mín: 0,00; máx: $14,61 \times 10^{-3}$). Cuando se analizaron por género, edad y origen étnico no se encontraron diferencias significativas en la expresión corregida de ARNm de *TS* y *ERCC1*.

*Supervivencia en relación a la expresión de *TS**

Con un período de seguimiento medio de 10,5 meses (I.C. al 95%: 1,8, 21,2) para los 50 pacientes evaluados en este estudio, la supervivencia media fue de 8,4 meses (I.C. al 95%: 6,4, 12,3). Usando un valor umbral de *TS* de $7,5 \times 10^{-3}$, 43 pacientes (86%) tuvieron un bajo nivel de expresión corregida de *TS* y 7 (14%) pacientes tuvieron un alto nivel de expresión corregida de *TS*. Se usó la prueba de logaritmo de rango para evaluar la asociación entre la expresión corregida de *TS* y la supervivencia. En la figura 1 se presentan las curvas de supervivencia respectivas y muestran una supervivencia media de 10,2 meses (I.C. al 95%: 7,4,15,1) en el grupo con baja expresión corregida de *TS* y de 1,5 meses (I.C. al 95%: 1,1, 2,1) en el grupo con alta expresión corregida de *TS* ($P < 0,001$, Prueba de logaritmo de rango; figura 3). La probabilidad de supervivencia a 6 meses fue de 0,77 para pacientes con expresión corregida de *TS* de $\leq 7,5 \times 10^{-3}$ en comparación con el 0,00 para el grupo que de alta expresión. Los pacientes con niveles de *TS* corregidos de $> 7,5 \times 10^{-3}$ tuvieron un riesgo relativo aumentado de 8,4 veces (I.C. al 95%: 2,63, 27,13) de morir en comparación con los pacientes con niveles de *TS* de $\leq 7,5 \times 10^{-3}$ en un análisis univariante ($p < 0,001$, figura 4).

Supervivencia en relación a la expresión de ERCC1

Usando $4,9 \times 10^{-3}$ como un umbral, 40 (80%) tuvieron una expresión corregida de *ERCC1* baja y 10 (20%) tuvieron una expresión de *ERCC1* corregida alta. La figura 2 muestra una representación de Kaplan Meier de la probabilidad estimada de supervivencia frente a los niveles de expresión corregida de *ERCC1*, y muestra una supervivencia media de 10,2 meses (I.C. al 95%: 7,8, 15,1) para el grupo de expresión baja y de 1,9 meses (I.C. al 95%: 1,1, 4,9) para el grupo de expresión alta ($P < 0,001$; Prueba de logaritmo de rango). La probabilidad de supervivencia a los 6 meses fue de 0,76 para pacientes con una expresión corregida de *ERCC1* de $\leq 4,9 \times 10^{-3}$ en comparación con 0,16 para pacientes con una expresión corregida de *ERCC1* de $> 4,9 \times 10^{-3}$. Los pacientes con niveles corregidos de *ERCC1* de $> 4,9 \times 10^{-3}$ tuvieron un riesgo relativo de 4,8 veces (I.C. al 95%: 2,09, 15,88) de morir en comparación con pacientes con niveles de *ERCC1* corregidos de $\leq 4,9 \times 10^{-3}$ en el análisis univariante $p < 0,001$, figura 4).

Supervivencia en relación con la expresión combinada de ERCC1 y TS

Se detectaron niveles de expresión corregida de *TS* y *ERCC1* bajos en 36 (72%) de los pacientes, y 14 (28%) pacientes tenían un nivel de expresión corregida de *TS* y/o *ERCC1* alto. Los pacientes con bajos niveles de expresión para ambos genes tenían una supervivencia superior significativa. La supervivencia media fue de 11,1 meses (I.C. al 95%: 8,4, 17,5) para los que tenían niveles de expresión corregida de *TS* y *ERCC1* bajos, y de 1,9 meses (I.C. al 95%: 1,1, 4,9) para los que tenían niveles de expresión corregida de *TS* y/o *ERCC1* altos ($P < 0,001$, Prueba de logaritmo de rango; figura 3). Los pacientes con niveles de expresión corregida bajos para ambos genes tenían una probabilidad de supervivencia a 6 meses de 0,85 en comparación con 0,10 para los pacientes con un alto nivel de expresión corregida para al menos un gen, *TS* o *ERCC1*. El riesgo relativo de morir para pacientes con un aumento de la expresión corregida para al menos un gen (*TS* o *ERCC1*) fue de 7,12 (I.C. al 95%: 2,60, 19,52) en comparación con pacientes que mostraban niveles de expresión bajos para ambos genes en el tumor ($P < 0,001$; figura 4). Las expresiones de ARNm de *TS* y *ERCC1* son independientes entre sí, como se reveló por el análisis estratificado (figura 5).

Asociación de la respuesta con los niveles de expresión génica de TS y ERCC1

El nivel medio corregido de expresión de *TS* fue de $3,4 \times 10^{-3}$ (mín: $0,18 \times 10^{-3}$; máx.: $11,50 \times 10^{-3}$) en los 45 pacientes aptos para la medición es idéntico para toda la cohorte de 50 pacientes. Cuando se analizaron las respuestas segregando tumores en los de baja y alta expresión de *TS*, tres de cuatro respondedores parciales (75%), 26 de 27 (96%) de los pacientes con enfermedad estable, y 9 de 14 (64%) de los pacientes con enfermedad progresiva tuvieron una baja expresión corregida de *TS* ($P = 0,02$; Test Exacto de Fisher; figura 9).

El nivel medio corregido de expresión de *ERCC1* fue de $2,7 \times 10^{-3}$ (mín.: $0,00 \times 10^{-3}$; máx.: $14,61 \times 10^{-3}$) en los 45 pacientes aptos para la medición, y no fue significativamente diferente a toda la cohorte de 50 pacientes. Sin embargo, el nivel de expresión de *ERCC1* no fue estadísticamente significativo en cuanto a su respuesta a la quimioterapia ($P = 0,29$; Test Exacto de Fisher).

Lista de secuencias

<110> Kathleen Danenberg, y col.
 <120> MÉTODO PARA DETERMINAR UN REGIMEN QUIMIOTERAPEUTICO EN BASE A LA EXPRESIÓN DE ERCC1 Y TS
 <130> 11220-119
 <140> A asignar
 <141> 09-03-2001
 <160> 11
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico
 <400> 1
 5 gggaattgg cgacgtaatt c 21
 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico
 <400> 2
 gcggaggctg aggaacga 18
 <210> 3
 15 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico
 20 <400> 3
 ggctcgggtg tgcctt 17
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico
 <400> 4
 gatgtgca atcatgtacg t 21
 30 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda Oligonucleotídica
 <400> 5 25
 cacagtgct ctggcccagc acata 25
 <210> 6
 <211> 22
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Oligonucleotídico
 <400> 6
 45 aacatcgcca gctacgcct gc 22
 <210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sonda Oligonucleotídica
 <400> 7
 accaccacgg ccgagcgg 18
 <210> 8
 55 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda Oligonucleotídica
 60 <400> 8
 tgagcgcggc tacagctt 18
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Cebador Oligonucleotídico

<400> 9

tccttaatgt cacgcacgat tt 22

<210> 10

5 <211> 1097

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

aagtgetgcg agccctgggc cacgetggcc gtgctggcag tgggcccgcct cgateccctct 60
gcagtctttc ccttgaggct ccaagaccag caggtgagge ctgcgaggcg tgaaaccgtg 120
aggcccggac cacaggctcc agatggacce tgggaaggac aaagaggggg tgccccagcc 180
ctcaggggcg ccagcaagga agaaatgtgt gataccctc gacgaggatg aggtccctcc 240
tggagtggcc aagcccttat tccgatctac acagagcctt cccactgtgg acacctcggc 300
ccaggcggcc cctcagacct acgcccgaata tgccatctca cagcctctgg aaggggctgg 360
ggccacgtgc cccacagggt cagagccctt ggcaggagag acgcccaccc aggccctgaa 420
accgggggca aaatccaaca gcatcattgt gagcctcgg cagaggggca atcccgtact 480
gaagtctgtg cgcaatgtgc cctgggaatt tggcgacgta atcccgact atgtgctggg 540
ccagagcacc tgtgcctgtt tcctcagcct ccgctaccac aacctgcacc cagactacat 600

```

```

ccatggggcg ctgcagagcc tggggaagaa cttcgccttg cgggtcctgc ttgtccaggt 660
ggatgtgaaa gatccccagc aggccctcaa ggagctggct aagatgtgta tcctggccga 720
ctgcacattg atcctcgcct ggagccccga ggaagctggg cggtagcttg agacctaca 780
ggcctatgag cagaaaccag cggacctcct gatggagaag cttagagcagg acttcgtctc 840
ccgggtgact gaatgtctga ccaccgtgaa gtcagtcaac aaaacggaca gtcagaccct 900
cctgaccaca tttggatctc tggaacagct catcggcgca tcaagagaag atctgggctt 960
atgccaggc ctggggcctc agaaagccc gaggctggtt gatgtcctgc acgagccctt 1020
cttgaagata cctgatgac ccagctgcc aaggaaacc ccagtgtaat aataaatcgt 1080
cctcccaggc caggctc 1097

```

10 <210> 11

<211> 1536

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

```

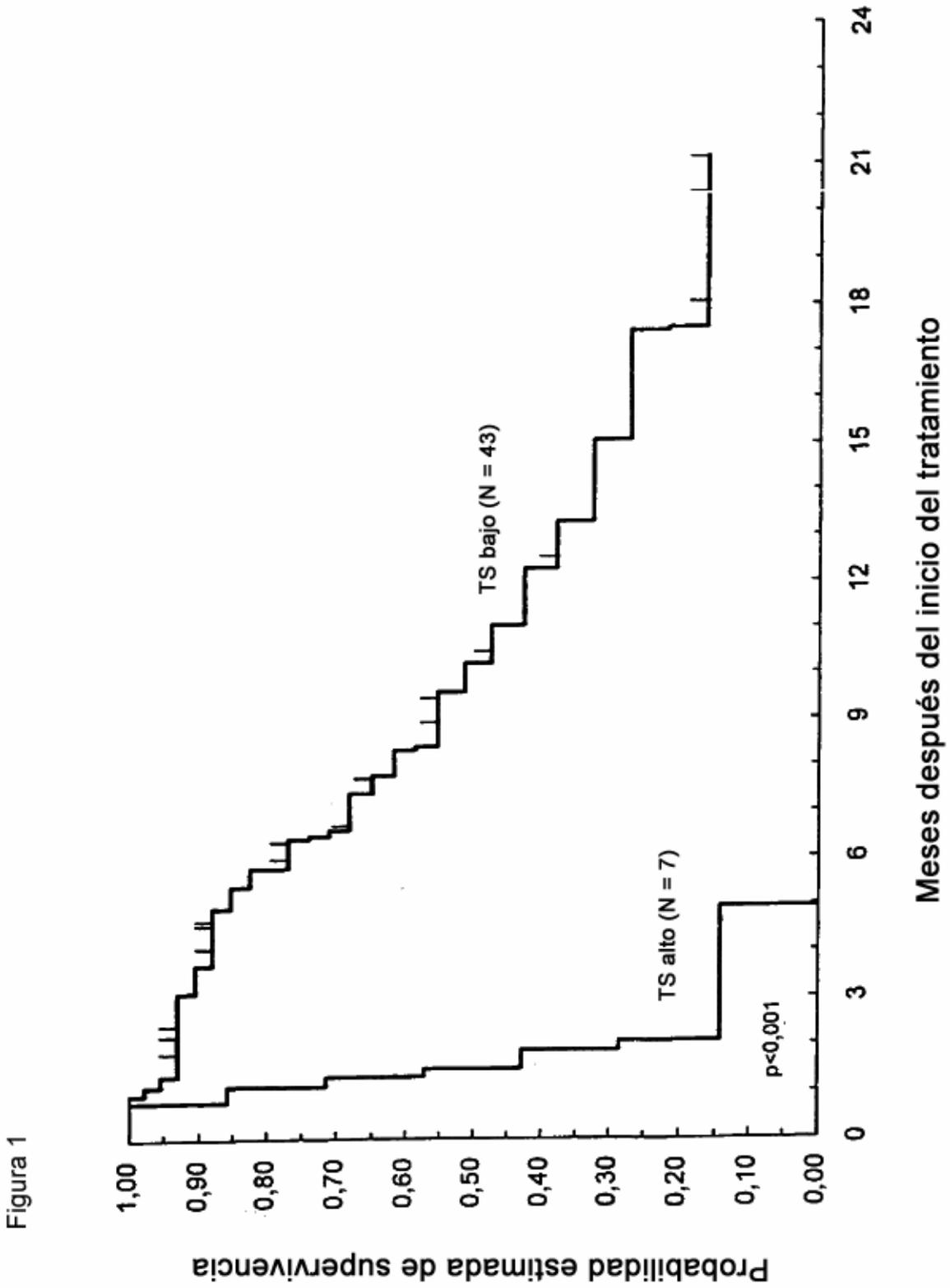
gggggggggg ggaccacttg gcctgcctcc gtcccgcgcg gccacttggc ctgcctccgt 60
cccgcgcgcg cacttcgcct gcctccgtcc cccgcccgcg ggcctatgcc tgtggccggc 120
tcggagctgc cgcgcccggc cttgcccccc gcgacacagg agcgggacgc cgagccgcgt 180
ccgcccagcg gggagctgca gtacctgggg cagatccaac acatcctccg ctgcccggctc 240
aggaaggacg accgcacggg caccggcacc ctgtcgggat tcggcatgca ggcgcgctac 300
agcctgagag atgaattccc tctgctgaca accaaacgtg tgttctggaa ggggtgtttg 360
gaggagtggc tgtggtttat caagggatcc acaaatgcta aagagctgtc ttccaaggga 420
gtgaaaatct gggatgccaa tggatcccga gactttttgg acagcctggg attetccacc 480
agagaagaag gggacttggg cccagtttat ggcttccagt ggaggcattt tggggcagaa 540
tacagagata tggaaatcaga ttattcagga caggagttg accaactgca aagagtgat 600
gacaccatca aaaccaacc tgacgacaga agaatcatca tgtgcgcttg gaatccaaga 660
gatcttctc tgatggcgct gcctccatgc catgcctct gccagttcta tgtggtgaa 720
agtgagctgt cctgccagct gtaccagaga tcgggagaca tgggcctcgg tgtgccttc 780
aacatcgcca gctacgccct gctcacgtac atgattgocg acatcacggg cctgaagcca 840
ggtgacttta tacacacttt gggagatgca catatttacc tgaatcacat cgagccactg 900
aaaattcagc ttcagcgaga accagacctt tcccacaaag tcaggattct tcgaaaagt 960
gagaaaatg atgacttcaa agctgaagac tttcagattg aagggtaca tccgcatcca 1020
actattaata tggaaatggc tgtttagggt gctttcaaag gagcttgaag gatattgtca 1080
gtctttaggg gttgggctgg atgccgaggt aaaagtctct tttgctctaa aagaaaaagg 1140
aactaggtca aaaatctgtc cgtgacctat cagttattaa ttttaagga tgttgccact 1200
ggcaaatgta actgtgccag ttctttccat aataaaaggc tttgagttaa ctactgagg 1260
gtatctgaca atgctgaggt tatgaacaaa gtgaggagaa tgaaatgtat gtgctcttag 1320
caaaaacatg tatgtgcatt tcaatcccc gtacttataa agaaggttgg tgaatttca 1380
aagctatttt tggaaatatt ttagaatatt ttaagaattt cacaagctat tccctcaat 1440
ctgaggggagc tgagtaaacac catcgatcat gatgtagagt gtggttatga actttatagt 1500
tgttttatat gttgctataa taaagaagtg ttctgc 1536

```

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un régimen quimioterapéutico que comprende 5-fluoroacilo, oxaliplatino o una combinación de los mismos para el tratamiento de un tumor en un paciente, que comprende:
- 5 (a) fijar una muestra tumoral y embeber la muestra fijada en parafina;
- (b) aislar el ARNm de la muestra tumoral fijada embebida en parafina mediante el calentamiento de la muestra de tejido en una solución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;
- 10 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores oligonucleotídicos que hibridan en condiciones rigurosas a una región del gen *ERCC1* y comprende la SEQ ID NO: 1 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 2 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y un par de cebadores oligonucleotídicos que hidridan en condiciones rigurosas a una región del gen *TS* y comprende la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, para obtener una muestra amplificada de *ERCC1* y una muestra amplificada de *TS*;
- 15 (d) determinar la cantidad de ARNm de *TS* y *ERCC1* en la muestra amplificada;
- (e) comparar la cantidad de ARNm de *TS* y *ERCC1* de la etapa (d) para una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y
- 20 (f) determinar un régimen quimioterapéutico que comprende 5-fluorouracilo, oxaliplatino, o una combinación de los mismos, en base a la cantidad de ARNm de *TS* y/o *ERCC1* en la muestra amplificada y el nivel de umbral para la expresión del gen *TS* y/o *ERCC1*.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que el tumor es un tumor de adenocarcinoma colorrectal.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de umbral de la expresión del gen *ERCC1* es aproximadamente $4,9 \times 10^{-3}$ veces el nivel de expresión de un gen de control interno.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de umbral de la expresión del gen *TS* es aproximadamente $7,5 \times 10^{-3}$ veces el nivel de expresión de un gen de control interno.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el gen de control interno es β -actina.
- 40 6. Un kit para detectar la expresión de un gen *TS* que comprende un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo.
- 45 7. Un kit para detectar la expresión de los genes *TS* y *ERCC1* que comprende (a) un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 3 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 4 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo, y (b) un par de cebadores oligonucleotídicos que consiste en la SEQ ID NO: 1 o un oligonucleótido idéntico al menos al 80% al mismo, y la SEQ ID NO: 2 o un cebador oligonucleotídico idéntico al menos al 80% al mismo.



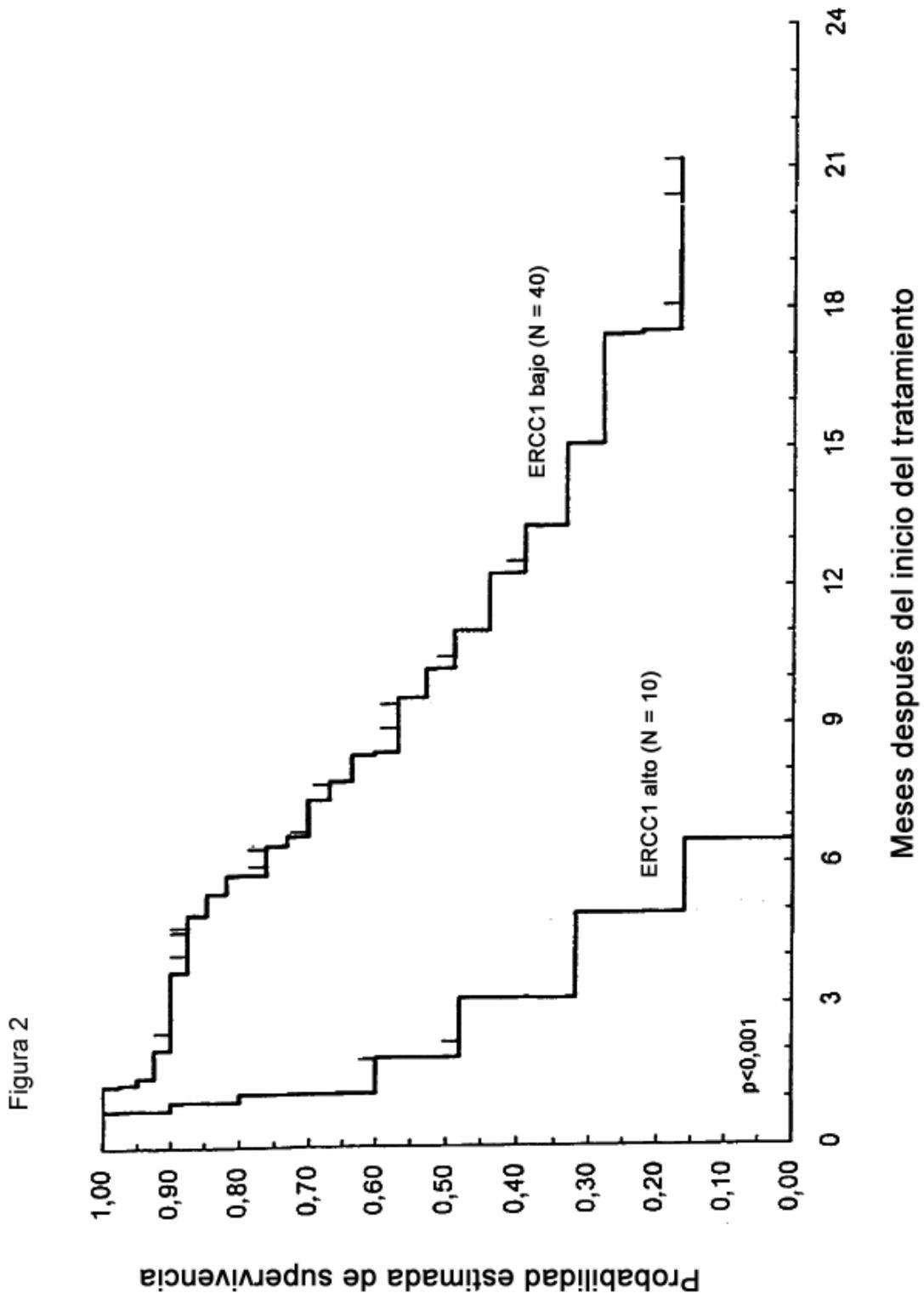


Figura 3

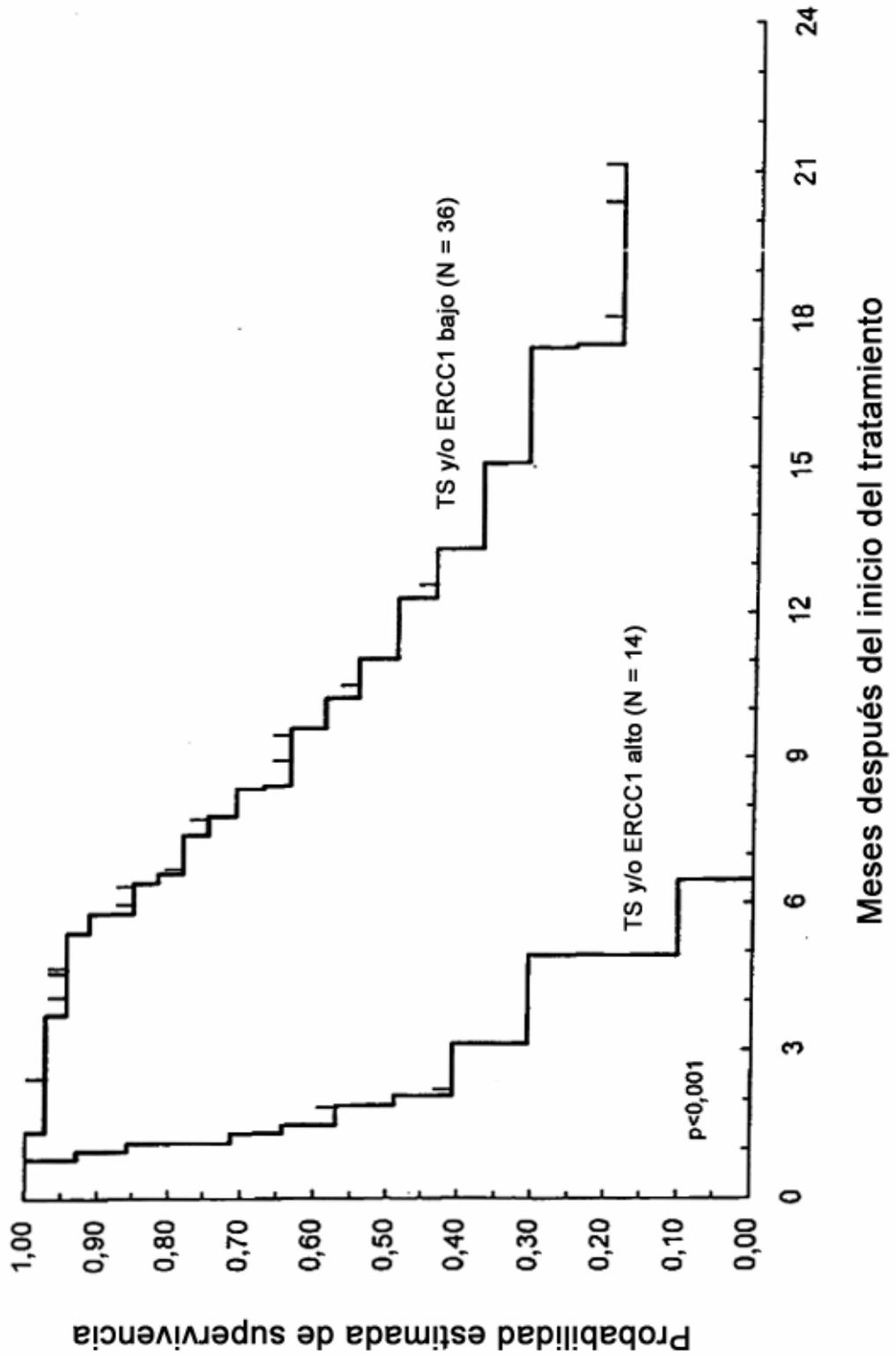


Figura 4 Análisis de la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal. Asociación con la expresión de ARNm de TS y ERCC1 (análisis univariante)

Factor	Nº de puntos	Riesgo relativo ¹	Probabilidad de supervivencia a 6 meses	Valor de p ²
Expresión de TS				
Baja (< 7,5)	43	1,00	0,77 \pm 0,07	<0,001
Alta (>7,5)	7	8,44 (2,63,27,13) ³	0,00 \pm 0,00	
Expresión de ERCC1				
Baja (< 4,9)	40	1.00	0,76 \pm 0,07	<0,001
Alta (> 4,9)	10	5.76 (2,09,15.88) ³	0,16 \pm 0,14	
Expresión de TS y ERCC1				
TS y ERCC1 baja	36	1.00	0,85 \pm 0,06	<0,001
Otros	14	7,12 (2,60,19,52) ³	0,10 \pm 0,10	

1. El riesgo relativo puede interpretarse como el aumento de la posibilidad media de morir en cualquier momento en el tiempo para los pacientes en el segundo grupo en comparación con los del primer grupo. El grupo con mejor pronóstico se enumera en primer lugar.
2. Estadísticas basadas en la prueba de logaritmo del rango, pero después de una simulación de 1.000 remuestreos para ajustar la selección del punto de corte óptimo.
3. Intervalo de confianza del 95%

Figura 5 Análisis de la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal.
Correlación con la expresión de ARNm de *TS* y *ERCC1* (análisis estratificado)

Expresión	Estratificado por	Riesgo relativo ¹	CI al 95% ²	Valor de p ajustado ³
<i>TS</i>	<i>ERCC1</i>			0,002
	Baja	1,00		
	Alta	5,38	(1,46, 19,92)	
<i>ERCC1</i>	<i>TS</i>			0,008
	Baja	1,00		
	Alta	4,24	(1,35, 13,29)	

1. El riesgo relativo puede interpretarse como el aumento de la posibilidad media de morir en cualquier momento en el tiempo para los pacientes en el segundo grupo en comparación con los del primer grupo. El grupo con mejor pronóstico se enumera en primer lugar.
2. Intervalo de confianza del 95%
3. Basado en una estadística de la prueba de logaritmo del rango, pero después de una simulación de 1.000 remuestros para ajustar la selección del punto de corte óptimo.

Figura 6 Respuesta en relación con la expresión de ERCC1 y TS

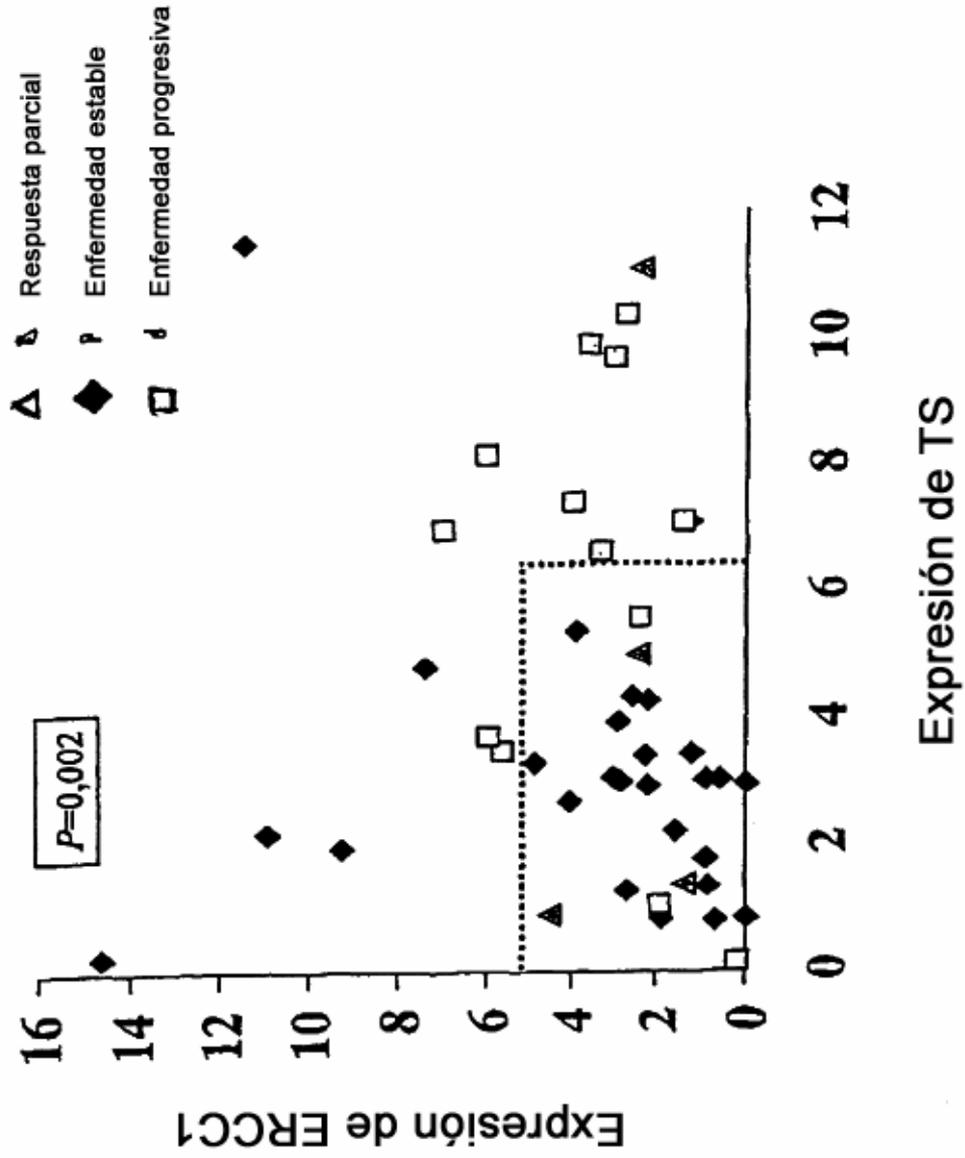


Figura 7: Cuadro que ilustra cómo calcular la expresión de ERCC1 con respecto a un gen de control interno

Experimento	C ₁			C ₂			C ₃			C ₄			K			K _{control}
	Muestra	C ₁ (msec)	C ₁ (pmole)	ΔC _T	C ₂ (msec)	C ₂ (pmole)	ΔC _T	C ₃ (msec)	C ₃ (pmole)	ΔC _T	C ₄ (msec)	C ₄ (pmole)	ΔC _T	K	Relación de K	
Desconocido 1	Desconocido 1	28.68	21.17	7.51	-	0.00549	-	-	-	-	-	-	0.737	-	1.54 x 10 ³	
	Desconocido 2	24.8	17.84	7.16	-	0.00699	-	-	-	-	-	-	0.9385	-	1.54 x 10 ³	
	ARN calibrador	-	-	-	27.61	20.71	7.07	0.0074	-	-	-	-	0.007400074	-	1.54 x 10 ³	
De muestras conocidas	AQ271	34.48	28.56	5.9	-	0.187	-	-	-	-	-	-	2.81	4.32 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
	AQ222	33.93	27.21	6.72	-	0.0095	-	-	-	-	-	-	1.59	2.45 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
	AQ252	38.9	29.43	7.47	-	0.0058	-	-	-	-	-	-	0.946	1.48 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
	Agut lung	25.2	17.3	8	-	0.0019	-	-	-	-	-	-	0.655	1.669 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
	PC3	24.51	16.47	8.04	-	0.0038	-	-	-	-	-	-	0.637	0.991 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
	A6C8	24.48	16.75	7.71	-	0.0048	-	-	-	-	-	-	0.601	1.233 x 10 ³	1.54 x 10 ³	
ARN calibrador	-	-	-	-	25.98	18.37	7.59	0.00596	-	-	-	-	0.00596 / 0.00596 = 1	-	-	

Figura 8: Cuadro que ilustra cómo calcular la expresión de TS con respecto a un gen de control interno

Experimento	Muestra	C ₁			C ₂			C ₃			C ₄			K	K _{TS}						
		f _g	f _h	f _{total}	AC ₁	3 ^{g₀}	C ₁ /N	f _{total}	AC ₂	3 ^{g₀}	C ₂ /N	f _{total}	AC ₃			3 ^{g₀}	C ₃ /N	f _{total}	AC ₄	3 ^{g₀}	C ₄ /N
Experimento	Desconocido 1	28.14		18.35	8.73	0.00663	*				*									12.8 x 10 ²	2.25 x 10 ²
	Desconocido 2	32.07		28.38	3.67	0.0748	*				*									12.8 x 10 ²	16.758 x 10 ²
	ARN calibrador	*		*	*	*	27.94	22.73	4.15	0.0683											
A partir de datos publicados	L7	28.94		24.55	2.39	0.191	*				*									12.7 x 10 ²	12.8 x 10 ²
	L91	24.91		22.12	2.79	0.144	*				*									12.31 x 10 ²	12.8 x 10 ²
	L121	24.93		20.69	4.06	0.059	*				*									13.88 x 10 ²	12.8 x 10 ²
	L150	26.77		22.68	6.60	0.008	*				*									12.93 x 10 ²	12.8 x 10 ²
	L220	28.52		19.77	8.75	0.0082	*				*									12.38 x 10 ²	12.8 x 10 ²
	L184	26.81		21.21	5.6	0.0205	*				*									12.31 x 10 ²	12.8 x 10 ²
ARN calibrador	*		*	*	*	25.14	20.09	5.04	0.06												

Fig. 9: Respuesta tumoral mediada por CPT-11/C 225 y expresión génica de EGF-R

