

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 873**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2001 E 01998006 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 1364054**

54 Título: **Método para determinar un régimen quimioterapéutico basado en la expresión de ERCC1**

30 Prioridad:

01.12.2000 US 250121 P
04.12.2000 US 250470 P
02.03.2001 US 796491
11.06.2001 US 877095
20.11.2001 US 988784

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2014

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:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 439 873 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 basado en la expresión de ERCC1

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de pronóstico que son útiles para medicina, en particular en la quimioterapia del cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a la evaluación de la expresión de genes de células tumorales en un paciente. La supervivencia de los pacientes tratados con agentes quimioterapéuticos dirigidos al ADN, especialmente agentes que dañan el ADN mediante agentes platinados, se analiza examinando el ARNm expresado a partir de los genes implicados en la reparación del ADN en seres humanos.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer aparece cuando una célula normal sufre una transformación neoplásica y se convierte en una célula maligna. Las células transformadas (malignas) se escapan de los controles fisiológicos normales que especifican el fenotipo de la célula y refrenan la proliferación celular. Por consiguiente, las células transformadas en el cuerpo de un individuo proliferan y forman un tumor. Cuando se encuentra un tumor, el objetivo clínico es destruir las células malignas de forma selectiva al tiempo que se mitiga cualquier daño causado a las células normales en el tratamiento individual que se esté usando.

La quimioterapia se basa en el uso de fármacos que son selectivamente tóxicos (citotóxicos) para las células cancerosas. Se han desarrollado varias clases generales de fármacos quimioterapéuticos, incluidos fármacos que interfieren en la síntesis de los ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos vitales. Generalmente estos se denominan fármacos antimetabolitos. Otras clases de fármacos quimioterapéuticos producen daños en el ADN celular. Generalmente, los fármacos de estas clases se denominan genotóxicos. Sin embargo, a menudo la susceptibilidad de una neoplasia individual a un fármaco quimioterapéutico o combinación de fármacos deseados solo se puede evaluar con precisión después de un periodo de tratamiento de ensayo. El tiempo invertido en un periodo de ensayo sin éxito plantea un riesgo significativo en el tratamiento clínico de las neoplasias malignas agresivas.

La reparación de los daños en el ADN celular es un importante proceso biológico llevado cabo por la maquinaria de reparación del ADN enzimática de una célula. Las lesiones sin reparar en el genoma de una célula pueden impedir la replicación del ADN, alterar la fidelidad de la replicación de ADN recién sintetizado y/o dificultar la expresión de genes necesarios para la supervivencia celular. Por tanto, los fármacos genotóxicos generalmente se consideran más tóxicos para las células en división activas que participan en la síntesis del ADN que para las células quiescentes que no están en división. Las células normales de muchos tejidos corporales son quiescentes y con poca frecuencia vuelven a entrar en el ciclo celular y se dividen. Generalmente se proporciona mayor tiempo entre rondas de división celular para la reparación de los daños en el ADN de las células normales producidos por genotoxinas quimioterapéuticas. Como resultado, se consigue alguna selectividad para matar las células cancerosas. Muchos regímenes de tratamiento reflejan intentos de mejorar la selectividad de las células cancerosas coadministrando fármacos quimioterapéuticos pertenecientes a dos o más de estas clases generales.

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

Dos fármacos anticancerosos genotóxicos ampliamente usados que se ha demostrado que dañan el ADN son el cisplatino (DDP) y el carboplatino. Actualmente, el cisplatino y/o el carboplatino se usan en el tratamiento de varias neoplasias determinadas de origen epitelial y mesenquimatoso, incluidos carcinomas y sarcomas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y reproductor, del sistema nervioso central, y de origen escamoso en la cabeza y el cuello. El cisplatino combinado con otros agentes es el fármaco que se prefiere en la actualidad para el tratamiento del carcinoma testicular y, en muchos casos, produce una remisión duradera. (Loehrer y col., 1984, 100 Ann. Int. Med. 704). El cisplatino (DDP) rompe la estructura del ADN a través de la formación de aductos intracatenarios. La resistencia a agentes platinados, tales como el DDP, se ha atribuido a una mayor tolerancia a los aductos de platino, a la disminución de la acumulación del fármaco o a una reparación reforzada del ADN. Aunque la resistencia al DDP es multifactorial, es probable que las alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN desempeñen un papel significativo. La reparación por escisión de aductos voluminosos de ADN, tales como los formados por los agentes de platino, parece estar mediada por genes implicados en el reconocimiento de daños en el ADN y su escisión. 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). De hecho, las células portadoras de un defecto genético en uno o más elementos de la maquinaria de reparación enzimática del ADN son extremadamente sensibles al cisplatino. Fraval y col., (1978), 51 Mutat. Res. 121, Beck y Brubaker (1973), 116 J. Bacteriol 1247.

65 El gen de complementación cruzada de reparación por escisión (*ERCC1*) es esencial en la reparación de los aductos de ADN. El gen *ERCC1* humano se ha clonado. Westerveld y col., Nature (London) 310:425-428 (1984);

Tanaka y col., Nature 348:73-76 (1990) y Van Duir y col., Cell, 44, 913-923 (1986). En varios estudios que usan líneas celulares mutantes humanas y de hámster que son defectivas en este gen y en estudios con tejidos tumorales humanos se ha indicado que el producto codificado por *ERCC1* está implicado en la reparación por escisión de los aductos de ADN de platino. 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).

5 Cuando se transfecta en células CHO deficientes en reparación de ADN, el *ERCC1* confiere resistencia celular al cisplatino, además de la capacidad para reparar los aductos de ADN con platino. Hansson y col., Nucleic Acids Res. 18: 35-40 (1990). Los modelos aceptados actualmente de reparación por escisión sugieren que la etapa de reconocimiento/escisión de daños limita la velocidad del proceso de reparación por escisión.

10 Se han estudiado los niveles relativos de expresión de los genes para reparación por escisión como el *ERCC1* en células malignas de pacientes de cáncer que reciben tratamiento a base de platino. Dabholkar y col., J. Natl. Cancer Inst. 84:1512-1517 (1992). Se ha notificado que la sobreexpresión de *ERCC1* en pacientes de cáncer gástrico tiene un impacto negativo sobre la respuesta del tumor y la supervivencia última cuando se tratan con el régimen quimioterapéutico del cisplatino (DDP)/fluorouracilo (Metzger, y col., J Clin Oncol 16: 309, 1998). Pruebas recientes indican que la gemcitabina (Gem) puede modular la actividad de reparación por escisión de nucleótidos de *ERCC1* (NER). Por tanto, los niveles intratumorales de expresión de *ERCC1* pueden ser un factor pronóstico importante para determinar si el DDP y la GEM serán una terapéutica eficaz en pacientes con cáncer.

15 Las muestras más patológicas se fijan e incluyen en parafina (PFE) de forma rutinaria para permitir el análisis histológico y la posterior conservación para archivo. Por tanto, la mayoría de las muestras de tejido para biopsia no son útiles para el análisis de la expresión génica porque estos estudios requieren una elevada integridad del ARN para que se pueda realizar una medida precisa de la expresión génica. En la actualidad, los niveles de expresión génica solo pueden monitorizarse de forma cualitativa en estas muestras fijadas e incluidas usando tinción inmunohistoquímica para monitorizar los niveles de expresión de proteínas.

20 Hasta ahora, los estudios de expresión génica cuantitativa, incluidos aquéllos de expresión de *ERCC1*, se han limitado a la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) del ARN de tejido fresco o congelado. La patente de EE.UU. Nº 5.705.336 de Reed y col., divulga un método de cuantificación del ARNm de *ERCC1* de tejido tumoral de ovarios y de determinar si dicho tejido será sensible a la quimioterapia a base de platino. Reed y col., cuantifican el ARNm de *ERCC1* de biopsias de tumor ovárico congelado.

25 El uso de tejido congelado por los profesionales sanitarios como se describe en Reed y col. plantea considerables inconvenientes. A la hora de planear un ensayo cuantitativo con marcadores genéticos basado en ARN es de gran importancia una rápida entrega de la biopsia para evitar la degradación del tejido y posteriormente del ARNm. El profesional sanitario que realiza la biopsia debe entregar rápidamente la muestra de tejido a un centro con instalaciones para realizar un protocolo de extracción de ARN inmediatamente tras la recepción de una muestra de tejido. Si no se dispone de dicha instalación, el clínico debe congelar de inmediato la muestra con el fin de prevenir la degradación del ARNm. Con el fin de que el centro diagnóstico realice un protocolo de extracción de ARN útil antes de la degradación de tejido y de ARN, la muestra de tejido debe permanecer congelada hasta que llegue al centro diagnóstico, con independencia de lo lejos que esté. El mantenimiento de la integridad del tejido congelado durante el transporte usando mensajeros especializados equipados con nitrógeno líquido y con hielo seco solo se puede realizar con grandes gastos.

30 Generalmente, las biopsias de rutina comprenden una mezcla heterogénea de tejido estromal y tumoral. Al contrario que con el tejido fresco o congelado, las muestras de tejido de biopsia FPE se microdisecionan con facilidad y se separan en tejido estromal y tumoral, y, por tanto, ofrecen una ventaja sobre el uso de tejido fresco o congelado. No obstante, el aislamiento de ARN de tejido fijado y, especialmente, de tejido fijado e incluido en parafina, tiene como resultado un ARN altamente degradado que generalmente no es aplicable a estudios de expresión génica.

35 Existen una serie de técnicas para la purificación de ARN de muestras biológicas, pero ninguna es fiable para aislar ARN de muestras de FPE. Por ejemplo, Chomczynski (patente de EE.UU. Nº 5.346.994) describen un método para purificar ARN de tejidos en base a una separación en fase de líquido usando fenol e isotiocianato de guanidina. Una muestra biológica se homogeneiza en una solución acuosa de fenol e isotiocianato de guanidina y el homogeneizado se mezcla después con cloroformo. Tras la centrifugación, el homogeneizado se separa en una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa. Las proteínas se secuestran en la fase orgánica, ADN en la interfase y ARN en la fase acuosa. Se puede hacer que el ARN se precipite en la fase acuosa. Desafortunadamente, este método no puede aplicarse a muestras de tejidos fijadas e incluidas en parafina (FPE).

40 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. y en Ausubel. F. M. y col. (1994) en las págs. 4.0.3-4.4.7. De nuevo, ninguno de los métodos conocidos proporciona resultados cuantitativos reproducibles en el aislamiento del ARN de muestras de tejidos incluidas en parafina

Por lo tanto, las técnicas para el aislamiento de ARN de muestras de tejidos incluidas en parafina son particularmente necesarias para el estudio de la 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 concreto.

5 Las técnicas para el análisis de expresión de ARN en tejidos incluidos en parafina se describen en, por ejemplo, Godfrey y col., Journal of Molecular Diagnostics, vol. 2, Nº. 2, pág.84-91 y Koopmans y col., Journal of Virological Methods, 43 (1993), 189-204.

10 Existe la necesidad de un método para cuantificar el ARNm de ERCC1 de tejido parafinizado con el fin de proporcionar un pronóstico precoz para los tratamientos genotóxicos propuestos para el cáncer. Como resultado, en la técnica se han realizado esfuerzos concertados aunque todavía sin éxito para obtener una cuantificación de la expresión de ERCC1 en tejido fijado e incluido en parafina (FPE). De acuerdo con lo anterior, es el objetivo de la invención proporcionar un método para evaluar los niveles de ERCC1 en tejidos fijados e incluidos en parafina (FPE) y predecir la resistencia probable del tumor de un paciente al tratamiento con agentes que dañan el ADN, que crea el tipo de lesiones en el ADN que están creadas por agentes platinados del ADN, mediante el examen de la cantidad de ARNm de ERCC1 en las células tumorales de un paciente y compararla con un nivel de expresión umbral predeterminado.

20 Se describe un método para evaluar los niveles de expresión de ARNm de ERCC1 obtenido a partir de células tumorales fijadas incluidas en parafina (FPE) y fijadas e incluidas en parafina (FPE).

También se describe un método de cuantificación de la cantidad de expresión de ARNm de ERCC1 respecto a un control interno de una muestra de tejido fijada e incluida 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.

25 También se describen cebadores oligonucleotídicos que tienen la secuencia de ERCC1-504F (SEC ID Nº 1) O ERCC1-574R (SEC ID Nº 2) y secuencias sustancialmente idénticas a las mismas. También se describen cebadores oligonucleotídicos que tienen una secuencia que hibrida con la SEC ID Nº 1 o la SEC ID Nº 2 o sus complementos en condiciones rigurosas.

35 En un aspecto de la invención se proporciona un método para determinar un régimen quimioterapéutico a base de platino para el tratamiento de un tumor en un paciente, que comprende:

(a) fijar una muestra tumoral e incluir la muestra fijada en parafina;

(b) aislar el ARNm de la muestra tumoral fijada incluida 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 y recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;

(c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores oligonucleotídicos;

45 (d) determinar la cantidad de ARNm de ERCC1 en la muestra amplificada,

(e) comparar la cantidad de ARNm de ERCC1 de la etapa (d) para una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y

50 (f) determinar un régimen quimioterapéutico basado en platino en base a la cantidad de ARNm de ERCC1 en la muestra amplificada y el nivel umbral para la expresión del gen ERCC1.

La invención se refiere además a un método de normalizar la expresión génica sin corregir (UGE) de ERCC1 respecto a un gen de control interno en una muestra de tejido analizada usando tecnología TaqMan®, a niveles de expresión conocidos de ERCC1 con respecto a un control interno de muestras analizadas mediante tecnología pre-TaqMan®.

60 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un cebador oligonucleotídico que tiene la secuencia de SEC ID Nº 1 o un oligonucleótido con una identidad de al menos un 80% con el mismo.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un cebador oligonucleotídico que tiene la secuencia de SEC ID Nº 2 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con el mismo.

65 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para detectar la expresión de un gen ERCC1 que comprende al menos dos cebadores oligonucleotídicos que consisten en la SEC ID Nº 1 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con el mismo y la SEC ID Nº 2 o un cebador

oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con el mismo.

Descripción del dibujo

5 La figura 1 es un gráfico que muestra la supervivencia global de pacientes que reciben tratamiento con cisplatino/Gem frente a la expresión relativa corregida de *ERCC1* en CPNM. Los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* en un paciente inferiores al umbral de $6,7 \times 10^{-3}$ se correlacionaban con una supervivencia significativamente mejor. Mientras que los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* en un paciente superiores al umbral de $6,7 \times 10^{-3}$ se correlacionan con una supervivencia significativamente peor. (prueba del orden logarítmico $P=0,009$)

15 La figura 2 es un gráfico que ilustra cómo calcular la expresión de *ERCC1* corregida con respecto a un gen de control interno. El gráfico contiene datos obtenidos con dos muestras de ensayo (desconocidas 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 mediante 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 la β -actina y el ARN calibrador es ARN total de hígado humano (Stratagene, N° cat. 735017).

20 La figura 3 es una tabla que muestra los detalles demográficos de los 56 pacientes del estudio, el estadio tumoral y los tipos celulares. La mediana del número de ciclos de tratamiento recibidos fue 3 (intervalo 1-6). Catorce pacientes (25%) habían recibido anteriormente quimioterapia, principalmente (9 pacientes) tratamiento con taxano solo o en combinación con DDP o carboplatino. Tres de los 56 pacientes habían recibido radioterapia y 5 pacientes habían sufrido una resección quirúrgica del tumor primario.

25 La figura 4 es una tabla que muestra los pacientes con niveles de expresión corregida de *ERCC1* por debajo del umbral tenían una mediana de la supervivencia significativamente más prolongada de 61.6 semanas (IC del 95% 42,4, 80,7 semanas) en comparación con 20,4 semanas (IC del 95% 6,9, 33,9 semanas) para pacientes con niveles de *ERCC1* corregidos por encima del umbral. Ajustados según el estadio del tumor, la estadística del orden logarítmico para la asociación entre expresión de *ERCC1* baja o alta y la supervivencia global fue de 3,97 y el valor P fue 0,046. Los resultados del orden log sin ajustar se muestran en la figura. También se muestran los factores asociados significativamente con la supervivencia global en el análisis univariable usando curvas de supervivencia de Kaplan Meier y la prueba del orden logarítmico. Estos fueron la presencia de pérdida de peso antes del tratamiento y el estado funcional ECOG. La edad del paciente ($P=0,18$), el sexo ($P=0,87$), el estadio tumoral ($P=0,99$), el tipo de célula tumoral ($P=0,63$) y la presencia de derrame pleural ($P=0,71$) no eran factores pronósticos significativos de la supervivencia global. Los niveles de expresión corregida de *ERCC1*, el estado funcional ECOG y la pérdida de peso siguieron siendo factores pronóstico significativos de la supervivencia en el análisis multivariable del modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Los valores P para un modelo de regresión de Cox estratificados según el estadio tumoral fueron 0,038 para *ERCC1*, 0,017 para la pérdida de peso y 0,02 para el estado funcional ECOG (PS 0 frente a 1 o 2).

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo de que la cantidad de ARNm de *ERCC1* en un tumor se correlaciona con la supervivencia en pacientes tratados con agentes de platino del ADN. Se considera que es probable que los tumores que expresan altos niveles de ARNm de *ERCC1* sean resistentes a la quimioterapia a base de platino y esto tiene menores niveles de capacidad de supervivencia. Por el contrario, es probable que los pacientes cuyos tumores que expresan cantidades bajas de ARNm de *ERCC1* sean sensibles a la quimioterapia a base de platino y tengan niveles mayores de capacidad de supervivencia. La expresión relativa de un paciente de ARNm de *ERCC1* se juzga comparándola con un nivel de expresión umbral predeterminando.

50 La invención se refiere a un método de cuantificación de la cantidad de expresión de ARNm de *ERCC1* en tejido fijado e incluido en parafina (FPE) respecto a la expresión génica de un control interno. Los presentes inventores han desarrollado cebadores oligonucleotídicos que permiten una evaluación precisa de la expresión de *ERCC1* en tejidos fijados e incluidos. Los cebadores oligonucleotídicos de la invención, ERCC1-504F (SEC ID N° 1), ERCC1-574R (SEC ID N° 2) O los cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos, se usan, preferentemente, junto con ARN extraído de muestras tumorales fijadas e incluidas en parafina (FPE). Esta medición de la expresión del gen *ERCC1* puede usarse después para el pronóstico de la quimioterapia a base de platino.

60 Se describe un método para la 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, preferentemente el par de cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEC ID N° 1) y ERCC1-574R (SEC ID N° 2) u oligonucleótidos sustancialmente idénticos a los mismos, para realizar la reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa. El ARN se extrae de células FPW mediante cualquiera de los métodos para aislar el ARNm de muestras como las descritas en la patente de EE.UU. 6 248 535.

65

El presente método puede aplicarse a cualquier tipo de tejido de un paciente. Para analizar 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, muestran un alto nivel de expresión

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

Los pacientes que muestran un nivel de expresión del gen de *ERCC1* inferior al nivel umbral se pueden tratar con cantidades mayores de la composición quimioterapéutica porque cabe esperar que tengan una capacidad de supervivencia mayor que los pacientes con tumores que expresan un nivel de expresión del gen *ERCC1* superior al nivel umbral. Como alternativa, el médico puede determinar que los pacientes con tumores que expresan un nivel de expresión génica de *ERCC1* superior al nivel umbral pueden no obtener ningún beneficio significativo de la quimioterapia, dado su baja capacidad de supervivencia prevista.

10

Los métodos de la presente invención se pueden aplicar 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 *ERCC1* en muestras de pacientes individuales y se predice la respuesta a diversos quimioterapéuticos. Preferentemente, los métodos de la invención se aplican a tumores sólidos, muy preferentemente a tumores de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Para aplicar algunas realizaciones de la invención a determinados tipos tumorales, es preferible confirmar la relación de los niveles de expresión del gen *ERCC1* con la capacidad de supervivencia recopilando un conjunto de datos que permite la correlación de una expresión de *ERCC1* concreta y la resistencia clínica a la quimioterapia a base de platino.

15

20

Un "nivel umbral predeterminado", como se define en el presente documento, es un nivel de expresión relativa de *ERCC1* corregido por encima del cual se ha encontrado que los tumores son, probablemente, resistentes al régimen quimioterapéutico a base de platino. Es probable que se encuentren niveles de expresión tumoral por debajo del umbral en tumores sensibles al régimen quimioterapéutico a base de platino. El intervalo 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 $6,7 \times 10^{-3}$. 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 aproximadamente $6,7 \times 10^{-3}$. Véase el Ejemplo 4.

25

30

Un "nivel umbral predeterminado" también se define como niveles de expresión tumoral relativa de *ERCC1* corregidos por encima del cual los pacientes que reciben un régimen quimioterapéutico a base de platino tengan, probablemente, una baja capacidad de supervivencia. Los niveles de expresión tumoral relativa de *ERCC1* corregido por debajo de este nivel umbral en pacientes que reciben un régimen quimioterapéutico a base de platino se correlacionan con una capacidad de supervivencia alta. La expresión de *ERCC1* relativa corregida umbral, expresada como una proporción de *ERCC1*: β -actina, es de aproximadamente $6,7 \times 10^{-3}$. Figura 1, véase el Ejemplo 4. No obstante, la presente invención no está limitada al uso de una β -actina como gen de control interno.

35

40

Al realizar el método de la presente invención, preferentemente se aíslan del paciente células tumorales. 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 tratamientos 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 método de extracción.

45

Sin embargo, el tejido obtenido del paciente tras la biopsia a menudo se fija, 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 incluyen en parafina u otros soportes sólidos conocidos por los expertos en la técnica. En los presentes métodos también se puede usar tejido fijado no incluido. Se contempla que dichos soportes sólidos se puedan eliminar con disolventes orgánicos, por ejemplo, permitiendo una rehidratación posterior del tejido conservado. El método de la presente invención comprende fijar una muestra tumoral e incluir la muestra fijada en parafina.

50

55

El ARN se extrae de las células FPE mediante cualquiera de los métodos como se describen en la patente de Estados Unidos N° 6 248 535. Las muestras de tejidos fijadas e incluidas en parafina (FPE) como se describe en el presente 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 de ejemplo implica el lavado de la muestra parafinada con un disolvente orgánico, tal como xileno, por ejemplo. Las muestras desparafinadas pueden rehidratarse con una solución acuosa de un 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 rehidrata simultáneamente. Después, se extrae el ARN de la muestra.

60

65

Para la extracción del ARN, 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 hasta 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. De acuerdo con la presente invención, el ARNm se aísla de la muestra tumoral fijada incluida 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 y recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;

Se elige una "concentración eficaz del agente caotrópico" de tal manera que un ARN se purifique a partir de una muestra incluida en parafina en una cantidad superior a aproximadamente 10 veces la aislada en ausencia de un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos incluyen: 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 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 preferentemente a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, más preferentemente de aproximadamente 4, con un tampón bioquímico adecuado, tal como Tris-Cl. La solución caotrópica puede contener también agentes reductores, tales como ditiotreitól (DTT) y β -mercaptoetanol (BME). La solución caotrópica puede contener además inhibidores de la ARNasa.

Las muestras homogeneizadas se pueden calentar hasta 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.

Después, el ARN se recupera de la solución, 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.

La cuantificación del ARNm de *ERCC1* de ARNm purificado total de muestras frescas, congeladas o fijadas se realiza preferiblemente usando, por ejemplo, tratamientos de reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) habituales en la técnica. Otros tratamientos para cuantificar ARNm de *ERCC1* incluyen, por ejemplo, el uso de balizas moleculares y otras sondas marcadas útiles en la PCR múltiplex. Adicionalmente, la presente invención contempla la cuantificación de ARNm de *ERCC1* a través del uso de sistemas sin PCR que emplean, por ejemplo, sondas marcadas con fluorescencia similares a las del ensayo Invader® (Third Wave Technologies, Inc.). Más preferentemente, la cuantificación de ADNc de *ERCC1* y un control interno o un gen constitutivo (por ejemplo, β -actina) se realiza usando un tratamiento 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 en Heid y col. (Genome Res 1996; 6: 986-994) y Gibson y col. (Genome Res 1996; 6: 995-1001). La producción de 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).

Como se usa en el presente documento, un gen "doméstico" o un "control interno" pretende incluir cualquier gen constitutiva o globalmente expresado cuya presencia permita una evaluación de los niveles de ARNm de *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 "domésticos" o "controles internos" pueden incluir, pero sin limitaciones, el gen de la ciclofilina, el gen de la β -actina, el gen receptor de la transferrina, el gen GAPDH, y similares. Lo más preferentemente, el gen de control interno es el gen de β -actina como se describe en Eads y col., Cancer Research 1999; 59: 2302-2306.

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. Preferentemente, se utiliza ARN total de hígado humano (Stratagene, N° de cat. 735017).

"Expresión génica no corregida (UGE) ", como se usa en el presente documento, se refiere a la producción numérica de expresión de *ERCC1* con respecto a un gen de control interno generado por el instrumento TaqMan®. La ecuación usada para determinar la UGE se muestra en el ejemplos 3 y se ilustra con cálculos de muestra en la

figura 2.

También se describe un método para normalizar los valores de expresión génica no corregida (UGE) adquiridos con el instrumento TaqMan® con valores de "expresión génica relativa conocida" obtenidos a partir de la tecnología diferente a TaqMan®. Preferentemente, los valores de la UGE de *ERCC1*: β -actina obtenidos por instrumentos diferentes de TaqMan® se normalizan en con muestras con valores de expresión relativa de *ERCC1*: β -actina obtenidos por instrumentos diferentes de TaqMan®.

La "expresión relativa corregida de *ERCC1*", como se usa en el presente 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 intervalo conocido de niveles de expresión de *ERCC1* con respecto a un gen de control interno. El ejemplo 3 y la figura 2 ilustran estos cálculos en detalle. Estos valores numéricos permiten determinar si la "Expresión Relativa Corregida de *ERCC1*" de una muestra específica está por encima o por debajo del nivel "umbral predeterminado". El nivel umbral predeterminado de la Expresión Relativa Corregida de *ERCC1* con respecto al nivel de β -actina es de aproximadamente $6,7 \times 10^{-3}$. El K_{ERCC1} específico para, la β -actina de control interno y el ARN calibrador de hígado humano Total (Stratagene, nº de cat. 735017) es $1,54 \times 10^3$.

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 e incluidas en parafina (FPE), y el ARN se extrae de las mismas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la patente de Estados Unidos 6 248 535. 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 *ERCC1* con respecto a la expresión de β -actina. Véase, la patente de EE.UU. nº 5.705.336 de Reed y col.,

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, nº cat. 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"). Preferentemente, dichas muestras de tejidos son muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina (FPE) y se extrae el ARN de las mismas de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la patente de Estados Unidos Nº 6 248 535. Dicha determinación 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.

Los métodos de la 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 diversos 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 cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

Habitualmente se dispone de biopsias de tumores con anterioridad al tratamiento quimioterapéutico sólo en forma de tejidos fijados e incluidos en parafina (FPE), que generalmente contienen sólo una pequeña cantidad de tejido heterogéneo. Dichas muestras FPE se prestan fácilmente a la microdissección, por lo que se puede determinar la expresión génica de *ERCC1* 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 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* para llevar a cabo los métodos de la invención. Los cebadores que hibridan en condiciones rigurosas con una región del gen *ERCC1* para su uso en la presente invención amplificarán un producto de entre 20-1000 pares de bases, preferentemente 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 *ERCC1* usando tejidos FPE. Se prefieren los cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEC ID Nº 1) y ERCC1 SEC ID Nº 2) (también denominados en el presente documento par de cebadores oligonucleotídicos ERCC1) y cebadores oligonucleotídicos sustancialmente idénticos a los mismos. Los cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEC ID Nº 1) y ERCC1 (SEC ID Nº 2) hibridan con el gen *ERCC1* (SEC ID Nº 7) en condiciones rigurosas y se ha demostrado que son especialmente eficaces para medir los niveles de ARNm de *ERCC1* usando ARN extraído de células FPE mediante cualquiera de los métodos para el aislamiento de ARNm, por ejemplo como se

describe en el ejemplo 1 y en la patente de EE.UU. 6 248 535.

Sustancialmente idénticos", en el contexto de los ácidos nucleicos como se usa en el presente documento, quiere decir hibridación con 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).

También se describen oligonucleótidos sustancialmente idénticos que hibridan en condiciones rigurosas (como se define en el presente documento) con toda o una porción de la secuencia de cebadores oligonucleotídicos de ERCC1-504F (SEC ID N° 1), su complemento o ERCC1-574R (SEC ID N° 2) o su complementaria.

En condiciones de hibridación rigurosas, sólo hibridan las secuencias altamente complementarias, es decir las secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente similares. Preferiblemente, 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 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 (SEC ID N° 1), su complementaria o ERCC1-574R (SEC ID N° 2) o su complementaria.

A continuación, se define la hibridación del cebador oligonucleotídico con 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. Esta temperatura de fusión se usa 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 el presente documento son capaces de permitir una evaluación precisa de la expresión génica de *ERCC1* en un tejido fijado o fijado e incluido 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 *ERCC1* usando tejidos fijados.

A partir de la medición de la cantidad de ARNm de *ERCC1* que se expresa en el tumor, el practicante experto puede realizar un pronóstico sobre la resistencia clínica de un tumor a una genotoxina concreta o la capacidad de supervivencia de un paciente que recibe una genotoxina concreta. Una quimioterapia basada en platino o una quimioterapia que induce un tipo similar de daño en el ADN es la genotoxina preferida.

Las quimioterapias a base de platino producen un "aducto voluminoso" del ADN, en el que el efecto primario es la distorsión de la conformación tridimensional de la doble hélice. Dichos compuestos son para administrar solos o junto con otras quimioterapias tales como gemcitabina (Gem) o 5-fluorouracilo (5-FU).

Las quimioterapias genotóxicas basadas en platino comprenden compuestos de coordinación de metales pesados que forman aductos covalentes de ADN. Generalmente, estos compuestos de metales pesados se unen de forma covalente al ADN para formar, en parte pertinente, aductos dinucleotídicos cis-1,2-intracatenarios. En general, esta clase está representada por cis-diaminadichloroplatino (II) (cisplatino) e incluye cis-diamina-(1,1-

ciclobutanodicarboxilato) de platino (II) (carboplatino), cis-diamino-(1,2-ciclohexil)dichloroplatino (II), y cis-(1,2-etilenediamina) dichloroplatino (II). Los primeros agentes de platino incluyen análogos o derivados de los compuestos representativos anteriores.

- 5 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 microcítico, junto con los meduloblastomas y neuroblastomas. El trans-diaminodichloroplatino (II) (trans-DDP) no es clínicamente útil se piensa que debido a la rápida reparación de sus aductos en el ADN. Es probable que el uso de trans-DDP como agente quimioterapéutico en el presente documento proporcione un compuesto de baja toxicidad en células no seleccionadas y de una toxicidad relativa alta en células seleccionadas. En una realización preferida, el compuesto de platino es cisplatino.

15 Muchos compuestos se administran habitualmente con agentes quimioterapéuticos a base de platino. Por ejemplo, BEP (bleomicina, etopósido, cisplatino) se usa para el tratamiento del cáncer de testículos, MVAC (metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino) se usa para el tratamiento del cáncer de vejiga urinaria, MVP (mitomicina C, vinblastina, cisplatino) se usa para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico. En muchos estudios se han documentado interacciones entre agentes que contienen platino. Por ejemplo, se ha notificado sinergia de fármacos terapéuticos para muchos fármacos incluidos potencialmente en una quimioterapia a base de platino. Una lista muy breve de referencias recientes para esto incluyen las siguientes: Okamoto y col., *Urology* 2001; 57:188-192.; Tanaka y col., *Anticancer Research* 2001; 21:313-315; Slamon y col., *Seminars in Oncology* 2001; 28:13-19; Lidor y col., *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92:2440-2447; Leopold y col., *NCI Monographs* 1987;99-104; Ohta y col., *Cancer Letters* 2001; 162:39-48; van Moorsel y col., *British Journal of Cancer* 1999; 80:981-990.

25 Otros agentes genotóxicos 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, alterar la fidelidad de la replicación de ADN recién sintetizado o dificultar la expresión de 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.

35 Una clase general de compuestos genotóxicos que se usan para tratar muchos cánceres y que no se ven afectados por los niveles de expresión de *ERCC1* son los agentes alquilantes de ADN y los agentes de intercalación de ADN. Los psoralenos son compuestos genotóxicos que se sabe que son útiles en el tratamiento fotoquimioterapéutico de enfermedades cutáneas, tales como psoriasis, vitiligo, infecciones fúngicas y linfoma cutáneo de linfocitos T. Harrison's Principles of Internal Medicine, Part 2 Cardinal Manifestations of Disease, Ch. 60 (12^a ed. 1991). Otra clase general de compuestos genotóxicos, miembros de la cual pueden alquilar o intercalarse en el ADN, incluye antibióticos sintéticos o naturales. De interés concreto en el presente documento son los antibióticos antineoplásicos, que incluyen, entre otros, las siguientes clases de compuestos representados por: amsacrina; actinomicina A, C, D (como alternativa conocida como dactinomicina) o F (como alternativa KS4); azaserina; bleomicina; carminomicina (carubicina), daunomicina (daunorubicina), o 14-hidroxi-daunomicina (adriamicina o doxorubicina); mitomicina A, B o C; mitoxantrona; plicamicina (mitramicina); y similares.

50 Otra clase general más de agentes genotóxicos de uso habitual y que alquilan ADN son aquéllos que incluyen las haloetilnitrosoureas, especialmente las cloroetilnitrosoureas. Miembros representativos de esta amplia clase incluyen carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina y estreptozotocina. Los primeros agentes haloetilnitrosoureas pueden ser análogos o derivados de los compuestos representativos anteriores.

55 Otra clase general de compuestos genotóxicos, miembros de la cual pueden alquilar ADN, incluye las mostazas de azufre y de nitrógeno. Estos compuestos dañan el ADN principalmente formando aductos covalentes en el átomo N7 de la guanina. Miembros representativos de esta amplia clase incluyen clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, mecloroetamina, novembicina, trofosfamida y similares. Los oligonucleótidos o análogos de los mismos que interaccionan de forma covalente o no con secuencias específicas en el genoma de células seleccionadas también se pueden usar como agentes genotóxicos, si se desea seleccionar una o más dianas genómicas predefinidas como el locus de una lesión genómica.

60 Otra clase de agentes, miembros de la cual alquilan ADN, incluye las etileniminas y las metilmelaminas. Estas clases incluyen altretamina (hexametilmelamina), trietilenfosforamida (TEPA), trietilenfosforamida (ThioTEPA) y trietilenmelamina, por ejemplo.

65 Clases adicionales de agentes alquilantes de ADN incluyen los sulfonatos de alquilo, representados por busulfán; las azinidinas, representados por benzodepa; y otros, representados por, por ejemplo, mitoguazona, mitoxantrona y procarbazona. Cada una de estas clases incluye análogos y derivados de los correspondientes compuestos

representativos.

5 Estando descrita la invención de este modo, la práctica de la invención se ilustra mediante los ejemplos experimentales proporcionados a continuación. El practicante experto se dará cuenta de que los materiales y métodos usados en los ejemplos ilustrativos se pueden modificar de varias formas. Se considera que dichas modificaciones entran dentro del ámbito de la presente invención.

Ejemplos

10 EJEMPLO 1

Aislamiento de ARN de tejido PFE

15 Se extrae ARN de tejido incluido en parafina mediante el siguiente método general:

A. Desparafinado e hidratación de las secciones:

- 1) Una porción de aproximadamente 10 μ M se coloca en un tubo de centrífuga de plástico de 1, 5 ml.
- 20 (2) Se añaden 600 μ l de xileno y la mezcla se agita enérgicamente durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente a de 20 a 25 °C).
- (3) La muestra se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos a temperatura ambiente a la velocidad máxima de la centrifuga de mesa (aproximadamente 10-20.000 x g).
- 25 (4) Las etapas 2 y 3 se repiten hasta que se ha disuelto la mayoría de la parafina. Normalmente se necesitan dos o más veces, en función de la cantidad de parafina incluida en la porción de la muestra original.
- (5) La solución de xileno se elimina agitando enérgicamente con un alcohol inferior, preferentemente con etanol al 100% (aproximadamente 600 μ l) durante aproximadamente 3 minutos.
- 30 (6) El tubo se centrifuga durante aproximadamente 7 minutos como en la etapa (3). Se decanta y se desecha el sobrenadante. El precipitado se convierte en blanco.
- 35 (7) Las etapas 5 y 6 se repiten con soluciones de etanol sucesivamente más diluidas. Primero con etanol aproximadamente al 95%, después con aproximadamente al 80% y, por último, con etanol aproximadamente al 70%.
- (8) La muestra se centrifuga de nuevo durante 7 minutos a temperatura ambiente como en la etapa (3). El sobrenadante se desecha y el precipitado se deja secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.
- 40

B. Aislamiento de ARN con fenol-cloroformo

- 45 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.
- (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).
- 50 (3) Después, la muestra se calienta a aproximadamente 95 °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 °C. Como alternativa, el tapón puede fijarse con una abrazadera de plástico o con película de laboratorio.
- 55 (4) Después, la muestra se extrae con 50 μ l de acetato sódico 2 M a un de 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.
- 60 (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 °C.
- 65

(7) Se granula el ARN por centrifugación durante aproximadamente 7 minutos en una centrífuga de laboratorio a velocidad máxima; el sobrenadante se decanta y se descarta; y el gránulo se lava con aproximadamente 500 µl de etanol aproximadamente del 70 al 75%.

- 5 (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 µl de Tris cloruro 5 mM, pH 8, 0).

10 EJEMPLO 2

Transcripción inversa de ARNm y PCR

Transcripción inversa: Se aisló ARN de tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FPE) microdisecionado o sin microdisecionar como se ilustra en el ejemplo 1 y como se ha descrito previamente en el documento U.S.6 248 15 535. Después de la precipitación con etanol y la centrifugación, se disolvió el precipitado de ARN en 50 µl de Tris/Cl 5 mM a pH 8,0. La Transcriptasa Inversa M-MLV extenderá un cebador oligonucleotídico hibridado con un molde de ARN o de ADN monocatenario 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 µl de la solución de ARN con 25, 5 µl de "mezcla de 20 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 ADNsa).

La "mezcla de transcripción inversa" consiste en 10 µl de tampón 5 X (Tris-HCl 250 mM, pH 8, 3, KCl 375 mM, MgCl₂ 25 15 mM) , 0, 5 µl de hexámeros aleatorios (D.O. 50 disuelto en 5550 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 7, 5) , 5 µl de dNTP 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) , 5 µl de DTT 0, 1 M, 1, 25 µl de BSA (3 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7, 5) , 1, 25 µl de RNA Guard 24.800 U/ml (inhibidor de la ARNsa) (porcino N° 27-0816, Amersham Pharmacia) y 2,5 µl de MMLV V 200 U/ul (Life Tech N° DE CAT. 28025-02).

30 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/ ul de RNA Guard y 10 U/ul de MMLV

Cuantificación por PCR de la expresión de ARNm. La cuantificación de ADNc de *ERCC1* y un control interno o un gen constitutivo (por ejemplo, β-actina) se realiza usando un tratamiento 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 en 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 (SEC ID N° 3), T_m = 70° C), que se hibrida específicamente dentro de los cebadores directo e 40 inverso. La estimulación por láser dentro de los pocillos tapados que contienen la mezcla de reacción causa la emisión de un colorante inactivador 3' (TAMRA) hasta que la sonda se escinde por la actividad de la nucleasa 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 valores que se expresan en términos de relaciones entre dos mediciones absolutas (gen de interés/gen de control interno).

50 La mezcla de reacción de PCR consistió en 0, 5 µl 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 (SEC ID N° 1), T_m = 59° C y ERCC1-574R (SEC ID N° 2), T_m = 58° C), sonda TaqMan® 200 nM (SEC ID N° 3), 5 U de Polimerasa AmpliTaq Gold, 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 400 µM, 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 µl (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 la sonda de β-Actina-β-Actina TaqMan® (SEC ID N° 4), β-Actina-592F (SEC ID N° 5), β-Actina-651R (SEC ID N° 6).

60 Los cebadores oligonucleotídicos ERCC1-504F (SEC ID N° 1) y ERCC1-574R (SEC ID N° 2) usados en la reacción descrita anteriormente amplificarán un producto de 71 pb.

EJEMPLO 3

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

Se realizan dos pares de reacciones paralelas, es decir las reacciones de "ensayo" y las reacciones de "calibración". 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 molde de ARN calibrador y se denominan como las reacciones de calibración. El instrumento TaqMan® producirá cuatro valores umbral de ciclo diferentes (Ct): Ct_{ERCC1} y $Ct_{\beta-actina}$ a partir de las reacciones de ensayo y Ct_{ERCC1} y $Ct_{\beta-actina}$ a partir de las reacciones de calibración. Las diferencias en los valores Ct para las dos reacciones se determinan de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta Ct_{ensayo} = Ct_{ERCC1} - Ct_{\beta-actina} \text{ (A partir de la reacción de "ensayo")}$$

$$\Delta Ct_{calibrador} = Ct_{ERCC1} - Ct_{\beta-actina} \text{ (A partir de la reacción de "calibración")}$$

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

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

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

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

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

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. Preferentemente se usan el gen de control interno de la figura de la β -actina y el ARN calibrador ARN total de hígado humano (Stratagene, N° cat. 735017). Dados estos reactivos, el factor de corrección K_{ERCC1} equivale a $1,54 \times 10^3$

La normalización se realiza usando una modificación del tratamiento 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 método, 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 usaron el gen de control interno de la β -actina y el ARN calibrador ARN total de hígado humano (Stratagene, N° cat. 735017).

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.

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

A continuación, se promediaron todos los valores K a fin de determinar un solo factor de corrección K_{ERCC1} específico para *ERCC1*, ARN total de hígado humano (Stratagene, n° cat. 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.

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

Se puede determinar un 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, n° cat. 735017), descrito anteriormente.

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 KERCC1 específico con respecto al gen de control interno diferente y/o al ARN calibrador.

EJEMPLO 4

- 5 Todos los pacientes se incluyeron en la rama de cisplatino/gemcitabina de un ensayo aleatorizado, multicéntrico de tres ramas (GEPC/98-02, Ensayo en fase III del grupo de cáncer de pulmón en España de cisplatino/gemcitabina (CG) frente a cisplatino/ gemcitabina / vinorelbina (CGV) frente a dobletes secuenciales de Gemcitabina/ Vinorelbina, seguidos de ifosfamida / vinorelbina (GV/IV) en CPNM avanzado). Todos los pacientes recibieron 1250 mg/m² los días 1,8 más CDDP 100mg/m² el día 1 cada 3 semanas. Los criterios de elegibilidad para GEPC/98-02 eran CPNM en estadio IV (con metástasis cerebral, elegibles si estaban asintomáticos) o estadio IIIB (derrame pleural maligno y/o derrame pericárdico y/o adenopatía supraclavicular) y puntuación en el estado funcional Eastern Cooperative Group (ECOG) de 0-2. A Todos los pacientes se realizó una radiografía de tórax una tomografía computerizada (TAC) de tórax y del cuadrante abdominal superior antes de entrar en el estudio y se les realizaron varias evaluaciones al menos cada 6 semanas. La respuesta del tumor se evaluó de acuerdo con los criterios de la OMA como respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable y enfermedad progresiva. Se reevaluaron los tumores durante el tratamiento con los mismos métodos de imagen usados para establecer la medición del tumor basal.
- 10
- 15
- 20 El ARNm total se aisló de muestras de tumores de FPE pretratamiento microdisecionadas y la expresión de *ERCC1* relativa corregida se midieron usando RT-PCR cuantitativa como se describe en los ejemplos 2 y 3. Un método para aislar el ARNm de dichas muestras se describe en el Ejemplo 1 y en el documento US 6 248 535.

Análisis estadístico

- 25 La prueba U de Mann-Whitney se usó para evaluar las asociaciones significativas entre la variable de ensayo continua Expresión de *ERCC1* relativa corregida y las variables dicotómicas (sexo del paciente, edad por encima y por debajo de la mediana de la edad, presencia de pérdida de peso, presencia de derrame pleural, estadio del tumor). La prueba de Kruskal-Wallis se usó para analizar las diferencias significativa en la Expresión de *ERCC1* relativa corregida dentro de múltiples grupos (estado funcional ECOG, histopatología). La prueba exacta de Fisher se usó para el análisis de los valores clínico-patológicos, incluida los valores de respuesta y de Expresión de *ERCC1* relativa corregida dicotómica.
- 30
- 35 Se realizó un seguimiento de todos los pacientes desde el primer tratamiento del estudio hasta su muerte o hasta la censura de los datos. Se usaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba del orden logarítmico para analizar las distribuciones univariadas de la supervivencia y la supervivencia sin enfermedad. El método máximo de chi-cuadrado de Miller y Siegmund (Biometrics 1982; 38:1011-1016 y Halpern (Biometrics 1982; 38:1017-1023) se adaptó para determinar qué valor de expresión segregaba mejor a los pacientes en subgrupos de malo y buen pronóstico (en términos de probabilidad de supervivencia) con la prueba del orden logarítmico como la estadística usada para medir la potencia del agrupamiento. Para un valor P que sería interpretado como medida de la potencia de la asociación basada en el análisis de chi cuadrado máximo, se utilizaron 1.000 simulacros del tratamiento de remuestreo para estimar la distribución de la estadística de chi cuadrado máximo bajo la hipótesis de falta de asociación (Biometrics 1982; 38:1017-1023). Se realizó un modelo de riesgos proporcionales de Cox de los factores significativos en el análisis multivariado para identificar qué factores podrían tener una influencia significativa sobre la supervivencia. Para todos los análisis estadísticos se usó la versión 10.0.5 del software SPSS (SPSS Inc., Chicago Ill.) Todos los valores P fueron bilaterales.
- 40
- 45

Niveles de expresión de ERCC1 relativa corregida

- 50 La expresión del ARNm de *ERCC1* fue detectable en las 56 muestras analizadas. La mediana de la expresión relativa corregida de *ERCC1*, con respecto al gen doméstico de la β -actina de control interno fue de $6,7 \times 10^{-3}$ (intervalo $0,18 \times 10^{-3}$ - $24,65 \times 10^{-3}$) No se encontraron asociaciones significativas entre los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* y cualquiera de los factores edad (P= 0.06), sexo (P=0,18) presencia de pérdida de peso en los seis meses anteriores a la aleatorización (P=0,74), estadio del tumor (IIIB frente a IV, P=0,39), o presencia de derrame pleural (P=0.25, toda pruebas U de Mann-Whitney) Tampoco hubo diferencias significativas entre los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1*, entre los pacientes con diferentes grados del estado funcional (P=0,48, prueba de Kruskal-Wallis) o diferentes tipos de células tumorales (los cuatro tipos de tumores, P=0,10, prueba de Kruskal-Wallis), pero los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* fueron significativamente mayores en los tumores SCC (mediana $8,6 \times 10^{-3}$) en comparación con los adenocarcinomas (mediana $5,2 \times 10^{-3}$, P=0,015, prueba de Mann-Whitney).
- 55
- 60

Respuesta a la quimioterapia

- 65 Las frecuencias de respuesta tumoral para los 47 pacientes evaluables según su respuesta se muestran en la figura 3. La tasa de respuesta global fue de 44,7%. Los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* en la respuesta completa y la respuesta parcial, es decir tumores "que responden" (mediana $4,3 \times 10^{-3}$, intervalo $1,2 \times 10^{-3}$ - $24,6 \times 10^{-3}$)

³⁾ no fueron significativamente diferentes de los niveles en la enfermedad estable y la enfermedad progresiva, es decir tumores "que no responden" (mediana $7,85 \times 10^{-3}$, intervalo $0,8 \times 10^{-3}$ - $24,3 \times 10^{-3}$, $P=0,31$ prueba de Mann-Whitney). Tampoco se produjeron diferencias significativas entre la proporción de tumores respondedores y no respondedores con valores de expresión relativa corregida de *ERCC1* superiores e inferiores a cualquier nivel de *ERCC1* (todos prueba exacta de Fisher). La tasa de respuesta en los tumores con expresión relativa corregida de *ERCC1* inferior al valor umbral (expresión "baja", 52% de respondedores) fue mayor que para los tumores con expresión relativa corregida de *ERCC1* superior al valor umbral (expresión "alta", 36,4% de respondedores, prueba exacta de Fisher, $P= 0,38$).

10 Asociación entre la supervivencia global del paciente y los niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1*

La mediana de la supervivencia global fue de 36,6 semanas (intervalo de 0-113,4 semanas) y la mediana del tiempo hasta la progresión fue 24,4 semanas (intervalo de 0-102,9 semanas). El uso de la prueba del orden logarítmico y la estadística de chi-cuadrado máximo para identificar los niveles umbral de expresión relativa corregida de *ERCC1* que segregaban a los pacientes en subgrupos de buen y mal pronóstico mostraron que el intervalo de valores discriminatorios incluyeron la mediana del valor que, por consiguiente, se usó como valor umbral para el análisis de la supervivencia. Por consiguiente, se determinó que el valor umbral de la expresión relativa corregida de *ERCC1* era $6,7 \times 10^{-3}$ para el CPNM. La figura 1 muestra la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* intratumorales por encima y por debajo del nivel umbral de expresión relativa corregida de *ERCC1*. Como se muestra en la figura 4, los pacientes con niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* por debajo del umbral tenían una mediana de la supervivencia significativamente más prolongada de 61.6 semanas (IC del 95% 42,4, 80,7 semanas) en comparación con 20,4 semanas (IC del 95% 6,9, 33,9 semanas) para pacientes con niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* corregidos por encima del umbral. Ajustados según el estadio del tumor, la estadística del orden logarítmico para la asociación entre expresión relativa corregida de *ERCC1* baja o alta y la supervivencia global fue de 3,97 y el valor P fue 0,046. Los resultados del orden log sin ajustar se muestran en la figura 4.

Se analizó un valor umbral distinto de la expresión relativa corregida de *ERCC1* de $5,8 \times 10^{-3}$ porque este valor se ha mostrado en un estudio anterior que está asociado con la supervivencia global para pacientes con cáncer gástrico. (Metzger y col., J Clin Oncol 1998; 16:309-316). La supervivencia global fue significativamente mejor para el grupo de pacientes con CPNM en este estudio con niveles de expresión relativa corregida de *ERCC1* de $5,8 \times 10^{-3}$ en comparación con los niveles de *ERCC1* inferiores a $5,8 \times 10^{-3}$ (estadística del orden logarítmico 6,37, $P=0.011$), aunque un nivel umbral de la expresión relativa corregida de *ERCC1* de $6,7 \times 10^{-3}$ es un discriminador más potente.

Otros factores asociados significativamente con la supervivencia global en el análisis univariable usando curvas de supervivencia de Kaplan Meier y la prueba del orden logarítmico fueron la presencia de pérdida de peso antes del tratamiento y el estado funcional ECOG (Tabla 2). La edad del paciente ($P=0,18$), el sexo ($P=0,87$), el estadio tumoral ($P=0,99$), el tipo de célula tumoral ($P=0,63$) y la presencia de derrame pleural ($P=0,71$) no eran factores pronósticos significativos de la supervivencia global. Los niveles de expresión corregida de *ERCC1*, el estado funcional ECOG y la pérdida de peso siguieron siendo factores pronóstico significativos de la supervivencia en el análisis multivariable del modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox (figura 4). Los valores P para un modelo de regresión de Cox estratificados según el estadio tumoral fueron 0,038 para *ERCC1*, 0,017 para la pérdida de peso y 0,02 para el estado funcional ECOG (PS 0 frente a 1 o 2).

Este estudio halló una asociación entre niveles de expresión de ARNm de *ERCC1* menores y mejor supervivencia tras el tratamiento con quimioterapia a base de platino para pacientes con cáncer.

Listado de secuencias

- 50 <110> Danenberg, Kathleen
- <120> Método para determinar un régimen terapéutico basado en la expresión de *ERCC1*
- <130> 11220/145
- <140> Pendiente de asignación
- <141> - -
- 55 <150> 09/877,095
- <151> 11-06-2001
- <150> 09/796,491
- <151> 02-03-2001
- <160> 7
- 60 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>
- <223> Cebador oligonucleotídico

<400> 1
 gggaatttgg cgacgtaatt c 21
 <210> 2
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico
 <400> 2
 10 gcggaggctg aggaacag 18
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico
 <400> 3
 cacaggtgct ctggcccagc acata 25
 <210> 4
 20 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico
 25 <400> 4
 accaccacgg ccgagcgg 18
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico
 <400> 5
 tgagcgcggc tacagctt 18
 35 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador oligonucleotídico
 <400> 6
 tcctaatgt cagcaccgat 20
 <210> 7
 <211> 1097
 45 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 aagtgtgctg agccctgggc cacgctggcc gtgctggcag tgggcccgcct cgatccctct 60
 gcagtctttc ccttgaggct ccaagaccag caggtgaggc ctgcggcgc tgaaaccgtg 120
 aggcccggac cacaggtctc agatggacc tgggaaggac aaagaggggg tgccccagcc 180
 ctgagggccg ccagcaagga agaaatattgt gataccctc gacgaggatg aggtccctcc 240
 tggagtggcc aagcccttat tccgatctac acagagcctt cccactgtgg acacctcggc 300
 ccagcggcc cctcagacct acgcccgaata tgccatctca cagcctctgg aaggggctgg 360
 ggccaagtgc cccacagggc cagagcccct ggcaggagag acgcccacc aggcctgac 420
 acccggggca aaatccaaca gcatcattgt gagccctcgg cagaggggca atcccgtact 480
 gaagtctcgtg cgcacagctgc cctgggaatt tggcgacgta attcccgact atgtgcctggg 540
 ccagagcacc tgtgcctctgt tcctcagcct ccgctaccac aacctgcacc cagactacat 600
 ccattggcgg ctgcagagcc tggggaagaa ctctgccttg cgggtcctgc ttgtccagg 660
 ggatgtgaaa gatccccagc aggcctcaa ggagctggct aagatgtgta tcctggccga 720
 ctgcacattg atcctcgcct ggagccccga ggaagctggg cggctacctg agacctaca 780
 ggcctatgag cagaaaccag cggacctcct gatggagaag ctgagcagg acttcgtctc 840
 ccgggtgact gaatgtctga ccaccgtgaa gtcagtcaac aaacggaca gtcagacct 900
 cctgaccaca tttggatctc tggaacagct catcagcgca tcaagagaag atctggcctt 960
 atgccaggc ctgggcccctc agaaagccc gaggctgttt gatgtcctgc acgagccctt 1020
 cttgaaagta cctgatgac cccacctgccc aaggaaacc ccagtgtaat aataaatcgt 1080
 cctcccaggc caggctc 1097

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un régimen quimioterapéutico a base de platino para el tratamiento de un tumor en un paciente, que comprende:
- 5 (a) fijar una muestra tumoral e incluir la muestra fijada en parafina;
- (b) aislar el ARNm de la muestra tumoral fijada incluida 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 y recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;
- 10 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores oligonucleotídicos;
- 15 (d) determinar la cantidad de ARNm de *ERCC1* en la muestra amplificada,
- (e) comparar la cantidad de ARNm de *ERCC1* de la etapa (d) para una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y
- 20 (f) determinar un régimen quimioterapéutico basado en platino en base a la cantidad de ARNm de *ERCC1* en la muestra amplificada y el nivel umbral para la expresión del gen *ERCC1*.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los cebadores oligonucleotídicos consisten en la SEC ID N° 1 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos aproximadamente un 80% con la misma y la SEC ID N° 2 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos aproximadamente un 80% con la misma.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que el tumor es un tumor de cáncer no microcítico (CPNM).
4. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel umbral de la expresión del gen *ERCC1* es aproximadamente $6,7 \times 10^{-3}$ veces el nivel de expresión de un gen de control interno.
- 30 5. El método de la reivindicación 1, en el que el régimen quimioterapéutico basado en platino comprende un agente genotóxico que consiste en gemcitabina, cisplatino o una combinación de los mismos cuando el nivel de expresión génica determinado para *ERCC1* es inferior a un umbral predeterminado.
- 35 6. Un método para determinar el nivel de expresión de *ERCC1* en una muestra de tejido fijada incluida en parafina, que comprende:
- 40 (a) desparafinizar la muestra de tejido para obtener una muestra desparafinizada;
- (b) aislar el ARNm de la muestra desparafinizada en presencia de una cantidad eficaz de un compuesto caotrópico calentando la muestra de tejido en una solución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos y recuperando dicho ARNm de dicha solución caotrópica;
- 45 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores oligonucleotídicos capaces de amplificar una región del gen *ERCC1* para obtener una muestra amplificada; y
- 50 (d) determinar la cantidad de ARNm de *ERCC1* con respecto a la cantidad de ARNm de un gen de control interno.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el par de cebadores oligonucleotídicos consisten en la SEC ID N° 1 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con la misma y la SEC ID N° 2 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con la misma.
- 55 8. El método de la reivindicación 6, en el que el gen de control interno es la β -actina.
9. Un kit para detectar la expresión de un gen *ERCC1* que comprende al menos dos cebadores oligonucleotídicos que consisten en la SEC ID N° 1 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con la misma y la SEC ID N° 2 o un cebador oligonucleotídico con una identidad de al menos un 80% con la misma.
- 60

Figura 1

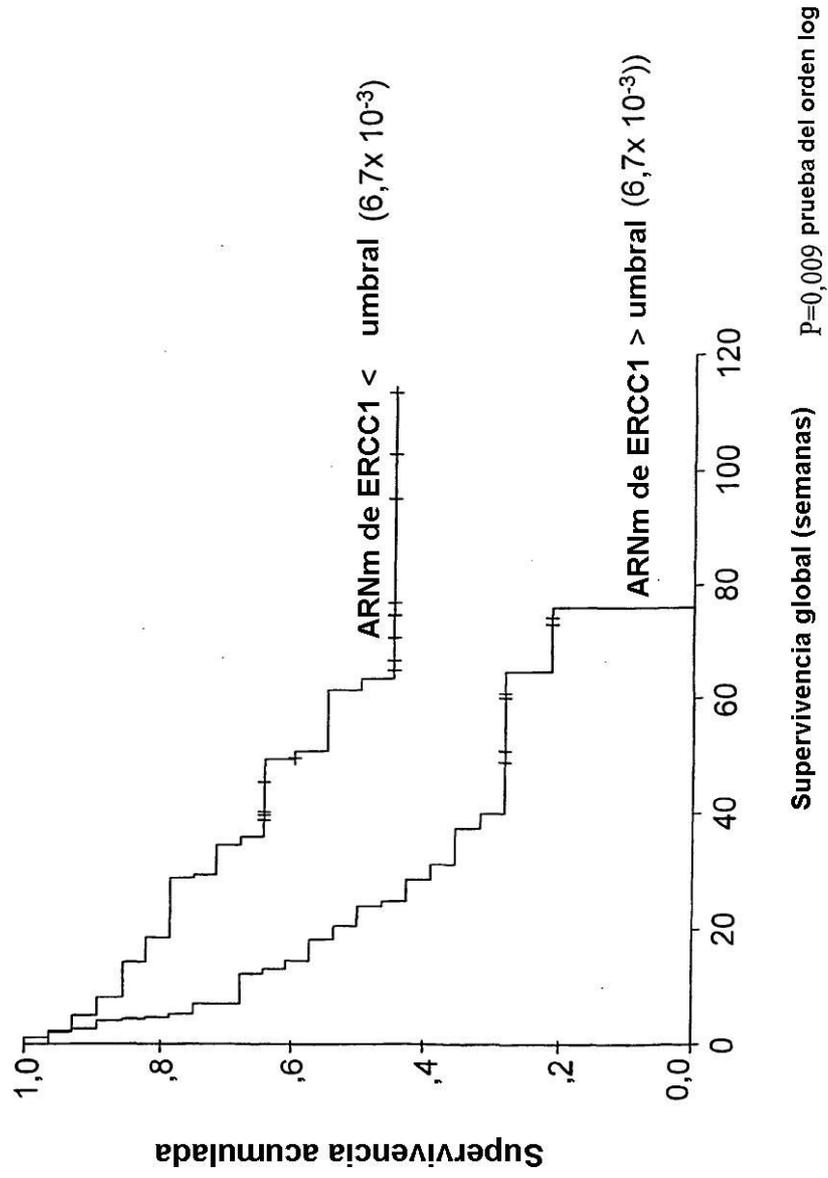


Figura 2: Gráfico que ilustra cómo calcular la expresión de ERCC1 con respecto a un gen de control interno

Muestra	de relaciones de "nuevas"				de relaciones de "calibración"				Expresión génica no corregida (UQE)	Valores ERCC1 conocidos	Derivación de K (K primario)	ERCC1 emp. corregida relativa
	Cr. exacto	Cr. frac.	AC	2.0	Cr. calib.	Cr. frac.	AC	2.0				
Experimental	desconocida 1	29,68	23,17	7,51	0,00549	-	-	-	0,737	-	$1,54 \times 10^3$	$1,13 \times 10^3$
	desconocida 2	24,8	17,64	7,16	0,00659	-	-	-	0,9385	-	$1,54 \times 10^3$	$1,45 \times 10^3$
ARN calib.	-	-	-	-	-	27,81	20,71	7,07	$0,0074(0,0074 \times 1)$	-	-	-
De muestras conocidas	AG221	34,46	28,56	5,9	0,167	-	-	-	2,81	$4,32 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
	AG222	33,93	27,21	6,72	0,0095	-	-	-	1,59	$2,45 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
	AG252	36,9	29,43	7,47	0,0055	-	-	-	0,946	$1,46 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
	Pulmón adulto	25,2	17,3	8	0,0039	-	-	-	0,655	$1,009 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
	PC3	24,51	16,47	8,04	0,0038	-	-	-	0,637	$0,981 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
	AdCal	24,45	16,75	7,71	0,0048	-	-	-	0,801	$1,233 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$
ARN calib.	-	-	-	-	25,95	18,57	7,39	0,00586	$0,00586(0,00586 \times 1)$	-	-	-

Figura 3. Características de los pacientes

	N (%)
Nº de pacientes	56 (100)
Sexo	
Masculino	48 (85,7)
Femenino	8 (14,3)
Edad, años	
Mediana	60,5
Intervalo	32-75
Estado funcional ECOG	
0	13 (23,2)
1	35 (62,5)
2	8 (14,3)
Pérdida de peso	21 (37,5)
Estadio	
IIIB	16 (28,6)
IV	40 (71,4)
Derrame pleural	11 (19,6)
Histopatología	
Adenocarcinoma	30 (53,6)
Escamoso	20 (35,7)
Macrocitico	4 (7,1)
Indiferenciado	2 (3,6)
Respuesta	
Respuesta completa	3 (5,4)
Respuesta parcial	18 (32,1)
Enfermedad estable	8 (14,3)
Enfermedad progresiva	18 (32,1)
No evaluable	9 (16,1)

Figura 4. Factores asociados con la supervivencia global

	Mediana de la supervivencia (semanas)	Análisis Univariable		Análisis multivariable	
		Estadística orden log.	valor P	Cociente de riesgos inst. (IC 95%)	valor P
Expresión de ERCC1 Baja* Alta*	62 20	6,78	0,009	0,32 (0,14-0,71)	0,005
Pérdida de peso No Sí	46 14	8,89	<0,003	0,36 (0,17-0,75)	0,007
Estado funcional ECOG 0 1 2	61 31 5	10,29	<0,005	(0 frente a 1 o 2) 0,26 (0,09-0,76)	0,014

*Valores de expresión relativa de ERCC1 corregidos clasificados de acuerdo con si es menor que el valor umbral de ERCC1 relativo corregido de $6,7 \times 10^{-3}$ ("expresión baja") o mayor que el umbral ("expresión alta").