

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 077**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2002 E 02734403 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 1407047**

54 Título: **Método de determinación de un régimen quimioterápico basado en la expresión de glutatión-S-transferasa Pi**

30 Prioridad:

**14.06.2001 US 879986**

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

**24.04.2014**

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 2 457 077 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 de determinación de un régimen quimioterápico basado en la expresión de glutatión-S-transferasa Pi

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de pronóstico que son útiles en medicina, particularmente en 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 agentes quimioterápicos que tienen como diana el ADN, especialmente agentes que dañan el ADN de la manera de agentes de platinación, se somete a ensayo examinando el ARNm expresado a partir de genes implicados en la reparación del ADN en seres humanos.

**Antecedentes de la invención**

15 Se produce cáncer cuando una célula normal experimenta 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 que restringen la proliferación celular. Las células transformadas en el cuerpo de un individuo por tanto proliferan, formando un tumor. Cuando se encuentra un tumor, el objetivo clínico es destruir las células malignas selectivamente mientras se mitiga cualquier daño causado a células normales en el individuo que se somete a tratamiento.

La quimioterapia se basa en el uso de fármacos que son selectivamente tóxicos (citotóxicos) para las células cancerígenas. Se han desarrollado varias clases generales de fármacos quimioterápicos, incluyendo fármacos que interfieren con la síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos vitales. Estos se denominan en general fármacos antimetabolitos. Otras clases de fármacos quimioterápicos infligen daño en el ADN celular. Los fármacos de estas clases se denominan en general genotóxicos. Sin embargo, la sensibilidad de un neoplasma individual a un fármaco quimioterápico deseado o combinación de fármacos a menudo puede evaluarse de manera precisa sólo tras un periodo de ensayo de tratamiento. El tiempo invertido en un periodo de ensayo insatisfactorio plantea un riesgo significativo en el tratamiento clínico de tumores malignos agresivos.

La reparación de daño al ADN celular es un proceso biológico importante llevado a cabo por la maquinaria de reparación de ADN enzimática de una célula. Las lesiones no reparadas en el genoma de una célula pueden impedir la replicación del ADN, afectar a la fidelidad de replicación del ADN recién sintetizado y/o dificultar la expresión de genes necesarios para la supervivencia celular. Por tanto, los fármacos genotóxicos se consideran en general más tóxicos para células que se dividen activamente que participan en la síntesis de ADN que para células quiescentes, de no se dividen. Las células normales de muchos tejidos corporales son quiescentes y con poca frecuencia vuelven a entrar en el ciclo celular y dividirse. Se permite en general mayor tiempo entre rondas de división celular para la reparación del daño al ADN en células normales infligido por genotoxinas quimioterápicas. Como resultado, se consigue alguna selectividad para la destrucción de células cancerígenas. Muchos regímenes de tratamiento reflejan intentos de mejora de la selectividad para células cancerígenas mediante la coadministración de fármacos quimioterápicos pertenecientes a dos o más de estas clases generales.

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

Dos fármacos anticancerígenos genotóxicos ampliamente usados que se han mostrado que dañan el ADN celular son cisplatino (DDP) y carboplatino. El cisplatino y/o el carboplatino se usan actualmente en el tratamiento de distintos neoplasmas seleccionados de origen epitelial y mesenquimatoso, incluyendo carcinomas y sarcomas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y reproductor, del sistema nervioso central y de origen escamoso en la cabeza y el cuello. Se prefiere actualmente el cisplatino en combinación con otros agentes para el tratamiento del carcinoma testicular, y en muchos casos produce una remisión duradera. (Loehrer *et al.*, 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 agentes de platino tales como DDP se ha atribuido a tolerancia aumentada a aductos de platino, acumulación de fármaco disminuida o reparación de ADN aumentada. Aunque la resistencia a DDP es multifactorial, las alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN probablemente desempeñan un papel significativo.

La familia de proteínas de glutatión-S-transferasa (GST) está implicada en la detoxificación de fármacos citotóxicos. Catalizando la conjugación de moléculas electrófilas carcinogénicas y tóxicas con glutatión, las enzimas GST protegen las macromoléculas celulares de daño (Boyer *et al.*, Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. En: Zakim D, Vessey D (eds.) Biochemical Pharmacology and Toxicology. Nueva York, NY: John Wiley and Sons, 1985.). Un tipo isomérico determinado de estas proteínas, la glutatión S-transferasa Pi (GST-pi, denominándose también de manera intercambiable GSTP1 o GST- $\pi$  en el presente documento) se expresa ampliamente en tejidos epiteliales humanos y se ha demostrado que se sobreexpresa en varios tumores (Terrier *et al.*, Am J Pathol 1990; 137: 845-853; Moscow *et al.*, Cancer Res 1989; 49: 1422-1428, Fan *et al.*, Anticancer Research, Vol. 20, 2000, págs. 4809-4814). Se han encontrado niveles aumentados de GST-pi en tumores

resistentes a fármacos, aunque el mecanismo exacto sigue sin aclararse (Tsuchida *et al.*, Crit Rev Biochem Mol Biol 1992; 27: 337-384). Estudios previos han sugerido que la baja expresión de la proteína GST (no del ARNm) se asocia con respuesta a quimioterapia basada en platino (Nishimura *et al.*, Cancer. Clin Cancer Res 1996; 2:1859-1865; Tominaga, *et al.*, Am. J. Gastro. 94:1664-1668, 1999; Kase, *et al.*, Acta Cytologia. 42: 1397-1402, 1998). Sin embargo, estos estudios no medían la expresión génica cuantitativa, sino que usaban un método de tinción inmunohistoquímica semicuantitativa para medir niveles de proteína. Sin embargo, se necesitan mediciones de expresión cuantitativa del gen *GST-pi* para conseguir un pronóstico muy eficaz.

La mayoría de muestras patológicas se fijan y se embeben en parafina (FPE) de manera rutinaria para permitir el análisis histológico y el posterior almacenamiento de archivo. Por tanto, la mayoría de muestras de tejido de biopsia no son útiles para el análisis de la expresión génica porque tales estudios requieren una alta integridad de ARN de manera que pueda obtenerse una medida precisa de la expresión génica. Actualmente, los niveles de expresión génica sólo pueden monitorizarse cualitativamente en tales muestras fijadas y embebidas usando tinción inmunohistoquímica para monitorizar niveles de expresión de proteínas.

Hasta ahora, estudios de expresión génica cuantitativa incluyendo los de la expresión de *GST-pi* se han limitado a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa (RT-PCR) de ARN de tejido fresco o congelado.

El uso de tejido congelado por profesionales sanitarios plantea inconvenientes sustanciales. El envío rápido de la biopsia para evitar la degradación del tejido y posteriormente la del ARNm es la principal preocupación cuando se planea cualquier ensayo de marcador genético cuantitativo basado en ARN. Los profesionales sanitarios que realizan la biopsia, deben enviar la muestra de tejido rápidamente a una instalación equipada para llevar a cabo un protocolo de extracción de ARN inmediatamente en cuanto se recibe la muestra de tejido. Si no está disponible tal instalación, el médico debe congelar inmediatamente la muestra para impedir la degradación del ARNm. Para que la instalación de diagnóstico lleve a cabo un protocolo de extracción de ARN útil antes de la degradación de tejido y ARN, la muestra de tejido debe permanecer congelada hasta que llegue a la instalación de diagnóstico, a pesar de lo lejos que pueda estar. El mantenimiento de la integridad del tejido congelado durante el transporte usando mensajeros especializados equipados con nitrógeno líquido y hielo seco, conlleva un gran coste.

Las biopsias de rutina comprenden en general una mezcla heterogénea de tejido estromal y tumoral. A diferencia del tejido fresco o congelado, las muestras de tejido de biopsia FPE se microdisecionan y separan fácilmente en tejido estromal y tumoral y por tanto, ofrecen una ventaja frente al uso de tejido fresco o congelado. Sin embargo, el aislamiento de ARN a partir de tejido fijado, y especialmente tejido fijado y embebido en parafina, da como resultado ARN altamente degradado, que no es aplicable en general a estudios de expresión génica.

Existen varias técnicas para la purificación de ARN a partir de muestras biológicas, pero ninguna es fiable para el aislamiento de ARN a partir de muestras FPE. Por ejemplo, Chomczynski (patente estadounidense n.º 5.346.994) describe un método para purificar ARN a partir de tejidos basado en una separación de fase líquida usando fenol e isotiocianato de guanidina. Se homogeneiza una muestra biológica en una disolución acuosa de fenol e isotiocianato de guanidina y después el homogeneizado se mezcla con cloroformo. Tras centrifugación, el homogeneizado se separa dando lugar a una fase orgánica, una interfase y una fase acuosa. Se aíslan proteínas en la fase orgánica, ADN en la interfase y ARN en la fase acuosa. Puede precipitarse ARN a partir de la fase acuosa. Desagraciadamente, este método no es aplicable a muestras de tejidos fijadas y embebidas en parafina (FPE).

Otras técnicas conocidas para aislar ARN normalmente utilizan o bien sales de guanidina o bien extracción con fenol, tal como se describe por ejemplo en Sambrook, J. *et al.*, (1989) en las págs. 7.3-7.24, y en Ausubel, F. M. *et al.*, (1994) en las págs. 4.0.3-4.4.7. Además, Koopmans *et al.*, Journal of Virological Methods, Vol. 43, 1993, págs. 189-204, dan a conocer métodos de aislamiento y amplificación de ARNm a partir de muestras de tejido fijadas embebidas en parafina que requieren el uso de perlas de vidrio o proteinasa. Gaoming *et al.*, Chinese J. Clinical Oncology, Vol. 25, 1998, págs. 858-861 dan a conocer la cuantificación de la expresión de ARNm de *GST-pi* en muestras de tejido de tumor mediante PCR pero no dice nada en cuanto a si las muestras de tumor se fijan o se embeben en parafina. De nuevo, ninguno de los métodos conocidos proporciona resultados cuantitativos reproducibles en el aislamiento de ARN a partir de muestras de tejido embebidas en parafina aunque la base de datos EMBL [en línea] European Molecular Biology Laboratory, número de registro H39177, 27 de julio de 1995 (27-07-1995), da a conocer un fragmento de ARNm de *GST-pi* que tiene 95 nucleótidos de longitud.

Tominga *et al.* (Am J Gastroenterol. Junio de 1999; 94(6):1664-8) dan a conocer que la inmunotinción de *GST-pi* podría ser un marcador prospectivo para determinar la sensibilidad del carcinoma esofágico a terapia de combinación con 5-fluorouracilo y cisplatino a dosis bajas.

Koopmans *et al.* (J Virol Methods. Julio de 1993; 43(2):189-204) dan a conocer la optimización de la extracción y amplificación por PCR de extractos de ARN a partir de tejido embebido en parafina en diferentes fijadores.

Fen *et al.* (Cancer. 1 de agosto de 1996; 78(3):416-21) dan a conocer que la expresión de *GST-pi* en pacientes con NSCLC estaba significativamente relacionada con la respuesta a quimioterapia basada en cisplatino, y puede ser un

factor pronóstico útil de respuesta a quimioterapia.

Okuyama *et al.* (Cancer. 15 de agosto de 1994; 74(4):1230-6) dan a conocer que la sobreexpresión de GST- $\pi$  está significativamente relacionada con la sensibilidad de cáncer gástrico a cisplatino.

5 Chen Gaoming *et al.* (Chinese Journal of Laboratory Medicine, vol. 23, n.º 1, 1 de enero de 2000, páginas 19-22) da a conocer que un paciente que no respondía a quimioterapia de combinación basada en platino mostraba una tasa más alta de coexpresión de MRP, GST- $\pi$  y (o) MDR1, LRP que un paciente que respondía al tratamiento.

10 Por tanto, son particularmente necesarias técnicas para el aislamiento de ARN a partir de tejidos embebidos en parafina para el estudio de la expresión génica en tejidos tumorales, ya que los niveles de expresión de determinados receptores o enzimas pueden usarse para determinar la probabilidad de éxito de un tratamiento particular.

15 Existe la necesidad de un método de cuantificación de ARNm de GST- $\pi$  a partir de tejido parafinado para proporcionar un pronóstico temprano para las terapias genotóxicas propuestas contra el cáncer. Como resultado, ha habido un esfuerzo concertado aunque insatisfactorio en la técnica para obtener una cuantificación de la expresión de GST- $\pi$  en tejido fijado y parafinado (FPE).

## 20 Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para determinar un régimen quimioterápico para tratar un tumor en un paciente que comprende:

25 (a) desparafinar una muestra de tumor fijada embebida en parafina para obtener una muestra de tumor desparafinada;

30 (b) aislar ARNm de la muestra de tumor desparafinada en presencia de una cantidad eficaz de un agente caotrópico mediante calentamiento de la muestra de tejido en una disolución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico hasta una temperatura en el intervalo de 75 a 100°C durante un periodo de tiempo de 5 a 120 minutos y recuperar el ARNm de la disolución caotrópica, en el que el tumor es un adenocarcinoma esofagocardiaco o cáncer de pulmón de células no pequeñas;

35 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores de oligonucleótido que hibridan en condiciones de alta rigurosidad con una región del gen GST- $\pi$ , para obtener una muestra amplificada;

(d) determinar la cantidad de ARNm de GST- $\pi$  en la muestra amplificada;

40 (e) comparar la cantidad de ARNm de GST- $\pi$  de la etapa (d) con una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y

(f) elegir un régimen quimioterápico basado en platino como el régimen quimioterápico basado en la cantidad de ARNm de GST- $\pi$  en la muestra amplificada y un nivel umbral predeterminado para la expresión del gen GST- $\pi$ .

45 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para determinar el nivel de expresión de GST- $\pi$  en una muestra de tejido embebida en parafina fijada que comprende:

(a) desparafinar la muestra de tejido; para obtener una muestra desparafinada;

50 (b) aislar ARNm de la muestra desparafinada en presencia de una cantidad eficaz de un agente caotrópico mediante calentamiento de la muestra de tejido en una disolución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico hasta una temperatura en el intervalo de 75 a 100°C durante un periodo de tiempo de 5 a 120 minutos y recuperar el ARNm de la disolución caotrópica;

55 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores de oligonucleótido que hibridan en condiciones rigurosas con una región del gen GST- $\pi$ , para obtener una muestra amplificada; y

(d) determinar la cantidad de ARNm de GST- $\pi$  en relación con la cantidad de ARNm de un gen de control interno.

60 Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit para detectar la expresión de un gen GST- $\pi$  que comprende un par de cebadores de oligonucleótido que consiste en un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma y un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma.

## 65 Breve descripción del dibujo

La figura 1 muestra una asociación entre supervivencia y expresión de ARNm relativa corregida de *GST-pi* en pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco tratados con 5-FU y cisplatino. Los pacientes con valores de *GST-pi* por encima del valor de mediana/umbral tenían una ventaja de supervivencia en comparación con aquellos pacientes con valores por debajo de la mediana/umbral. Los valores censurados se indican por una marca.

5 La figura 2 es un gráfico que muestra el análisis de supervivencia limitado a pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco en estadio II según TNM.

10 La figura 3 es un gráfico que muestra el análisis de supervivencia limitado a pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco en estadio IV.

15 La figura 4 es un diagrama que ilustra cómo calcular la expresión de *GST-pi* en relación con un gen de control interno. El diagrama contiene datos obtenidos con dos muestras de prueba, (desconocidas 1 y 2), e ilustra cómo determinar los datos de expresión génica no corregida (UGE). El diagrama también ilustra cómo normalizar la UGE generada mediante el instrumento TaqMan® con valores de *GST-pi* relativos conocidos determinados mediante tecnología pre-TaqMan®. Esto se efectúa multiplicando UGE por un factor de corrección  $K_{GST-pi}$ . El gen de control interno en la figura es  $\beta$ -actina y el ARN calibrador es ARN total de hígado humano (Stratagene, n.º de catálogo 735017).

20 La figura 5 muestra los cebadores de oligonucleótido usados en la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere en parte al hallazgo de que la cantidad de ARNm de *GST-pi* se correlaciona con sensibilidad aumentada a agentes de platinación de ADN. Se considera que es probable que los tumores que expresan altos niveles de ARNm de *GST-pi* sean sensibles a quimioterapia basada en platino. Por el contrario, es probable que los tumores que expresan bajas cantidades de ARNm de *GST-pi* sean insensibles a quimioterapia basada en platino. La expresión relativa de ARNm de *GST-pi* de tumor de un paciente se calcula comparándola con un nivel de expresión umbral predeterminado. Tal sensibilidad o ausencia de la misma a agentes de platinación de ADN se determina por la supervivencia de un paciente.

35 La invención se refiere a un método de cuantificación de la cantidad de expresión de ARNm de *GST-pi* en tejido fijado y embebidos en parafina (FPE) en relación con la expresión génica de un control interno. Los presentes inventores han desarrollado cebadores de oligonucleótido que permiten la evaluación precisa de la expresión de *GST-pi* en tejidos que se han fijado y embebido. Los cebadores de oligonucleótido de la invención, GST-F (SEQ ID NO: 1), GST-R (SEQ ID NO: 2), u cebadores de oligonucleótido sustancialmente idénticos a los mismos, se usan preferiblemente junto con ARN extraído de muestras de tumor fijadas y embebidas en parafina (FPE). Esta medición de la expresión del gen *GST-pi* puede usarse entonces para pronóstico de quimioterapia basada en platino.

40 Esta realización de la invención implica en primer lugar, un método para la extracción fiable de ARN a partir de una muestra FPE y en segundo lugar, la determinación del contenido de ARNm de *GST-pi* en la muestra usando un par de cebadores de oligonucleótido, preferiblemente el par de cebadores oligonucleótido GST-F (SEQ ID NO: 1) y GST-R (SEQ ID NO: 2), u oligonucleótidos sustancialmente idénticos a los mismos, para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa. El ARN se extrae de las células FPE mediante cualquiera de los métodos de aislamiento de ARNm a partir de tales muestras, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999, ahora patente estadounidense número 6.248.535, y que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

50 El presente método puede aplicarse a cualquier tipo de tejido de un paciente. Para examinar la sensibilidad del tejido tumoral es preferible examinar el tejido tumoral. En una realización preferida, se examina también una parte de tejido normal del paciente del que se obtiene el tumor.

55 Los métodos de la presente invención pueden aplicarse sobre una amplia variedad de tipos de tumor. Esto permite la preparación de "perfiles de expresión tumoral" individuales mediante los cuales se determinan los niveles de expresión de *GST-pi* en muestras de paciente individuales y se predice la respuesta a diversos agentes quimioterápicos. Preferiblemente, los métodos de la invención se aplican a tumores sólidos, lo más preferiblemente a tumores esofagocardiacos. Para la aplicación de algunas realizaciones de la invención a tipos de tumor particulares, es preferible confirmar la relación de niveles de expresión del gen *GST-pi* con la resistencia clínica recopilando un conjunto de datos que permite la correlación de una expresión particular de *GST-pi* y resistencia clínica a quimioterapia basada en platino.

60 Un "nivel umbral predeterminado", tal como se define en el presente documento, es un nivel de expresión de *GST-pi* por encima del cual se ha encontrado que es probable que los tumores sean sensibles a un régimen quimioterápico basado en platino. Es probable que se encuentren niveles de expresión por debajo de este nivel umbral en tumores insensibles al régimen quimioterápico basado en platino. El intervalo de expresión relativa corregida de *GST-pi*, expresada como una razón de *GST-pi* :  $\beta$ -actina, entre tumores que responden a un régimen quimioterápico basado

en platino es más de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$ . Los tumores que no responden a un régimen quimioterápico basado en platino tienen razón de expresión relativa de *GST-pi* :  $\beta$ -actina por debajo de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$ . Figura 1. Sin embargo, la presente invención no se limita al uso de  $\beta$ -actina como gen de control interno.

- 5 Para llevar a cabo el método de esta realización de la presente invención, las células tumorales se aíslan preferiblemente del paciente. Los tumores sólidos o linfoides o partes de los mismos se resecan quirúrgicamente del paciente o se obtienen mediante biopsia rutinaria. Se extrae el ARN aislado de muestras frescas o congeladas de las células mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo, Sambrook, Fischer y Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual, (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, (1989).  
10 Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

Sin embargo, el tejido obtenido del paciente tras la biopsia a menudo se fija, habitualmente mediante formalina (formaldehído) o glutaraldehído, por ejemplo, o mediante inmersión en alcohol. Las muestras biológicas fijadas a 15 También puede usarse tejidos fijado, no embebido en los presentes métodos. Se prevé que tales soportes sólidos puedan retirarse con disolventes orgánicos por ejemplo, permitiendo la rehidratación posterior del tejido conservado.

El ARN se extrae de las células FPE mediante cualquiera de los métodos que se describen en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999. Las muestras de tejido fijadas y embebidas 20 en parafina (FPE) tal como se describe en el presente documento se refieren a muestras de tejido que pueden almacenarse o archivarse. El ARN puede aislarse de una muestra patológica o muestra de biopsia de archivo que se desparafina en primer lugar. Un método de desparafinación a modo de ejemplo implica lavar la muestra parafinada con un disolvente orgánico, tal como xileno, por ejemplo. Las muestras desparafinadas pueden rehidratarse con una disolución acuosa de un alcohol inferior. Los alcoholes inferiores adecuados incluyen, por ejemplo, metanol, etanol, 25 propanoles y butanoles. Pueden rehidratarse muestras desparafinadas con lavados sucesivos con disoluciones alcohólicas inferiores de concentración decreciente, por ejemplo. Alternativamente, la muestra se desparafina y rehidrata simultáneamente. El ARN se extrae entonces de la muestra.

Para la extracción del ARN, las muestras fijadas o fijadas y desparafinadas pueden homogeneizarse usando medios 30 mecánicos, sónicos u otros medios de homogeneización. Las muestras rehidratadas pueden homogeneizarse en una disolución que comprende un agente caotrópico, tal como tiocianato de guanidinio (también vendido como isotiocianato de guanidinio). Se calientan las muestras homogeneizadas hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 a aproximadamente 100°C en una disolución caotrópica, que contiene una cantidad eficaz de un agente caotrópico, tal como un compuesto de guanidinio. Un agente caotrópico preferido es el tiocianato de 35 guanidinio.

Se elige una "concentración eficaz de agente caotrópico" de manera que se purifica un ARN a partir de una muestra embebida en parafina en una cantidad mayor de aproximadamente 10 veces la aislada en ausencia de un agente caotrópico. Los agentes caotrópicos incluyen: compuestos de guanidinio, urea, formamida, yoduro de potasio, 40 tiocianato de potasio y compuestos similares. El agente caotrópico preferido para los métodos de la invención es un compuesto de guanidinio, tal como isotiocianato de guanidinio (también vendido como tiocianato de guanidinio) y clorhidrato de guanidinio. Son útiles muchos contraiones aniónicos y un experto en la técnica puede preparar muchas sales de guanidinio con tales aniones apropiados. La concentración eficaz de disolución de guanidinio usada en la invención generalmente tiene una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 a 45 aproximadamente 5 M con un valor preferido de aproximadamente 4 M. Si el ARN está ya en disolución, la disolución de guanidinio puede ser de concentración más alta de manera que la concentración final conseguida en la muestra está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 M. La disolución 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 disolución caotrópica puede contener 50 también agentes reductores, tales como ditioneitol (DTT) y  $\beta$ -mercaptoetanol (BME). La disolución caotrópica puede contener también inhibidores de ARNasa.

Pueden calentarse las muestras homogeneizadas hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 75 a 55 aproximadamente 100°C en una disolución caotrópica, que contiene una cantidad eficaz de un agente caotrópico, tal como un compuesto de guanidinio. Un agente caotrópico preferido es tiocianato de guanidinio.

Se recupera entonces el ARN de la disolución mediante, por ejemplo, extracción con fenol-cloroformo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión molecular. Entonces puede purificarse adicionalmente el ARN usando las técnicas de extracción, electroforesis, cromatografía, precipitación u otras técnicas adecuadas.

60 La cuantificación del ARNm de *GST-pi* a partir del ARNm total purificado fresco, congelado o fijado se lleva a cabo preferiblemente usando métodos comunes en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa inversa (RT-PCR), por ejemplo. Otros métodos de cuantificación del ARNm de *GST-pi* incluyen por ejemplo, el uso de balizas moleculares y otras sondas marcadas útiles en PCR múltiple. Adicionalmente, la presente invención prevé 65 la cuantificación de ARNm de *GST-pi* mediante el uso de sistemas libres de PCR que emplean, por ejemplo sondas marcadas fluorescentes similares a las del ensayo Invader® (Third Wave Technologies, Inc.). Lo más

- preferiblemente, la cuantificación del ADNc de *GST-pi* y un control interno o gen de mantenimiento (por ejemplo  $\beta$ -actina) se hace usando un método de detección en tiempo real basado en fluorescencia (sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700 ó 7900 [TaqMan®], Applied Biosystems, Foster City, CA.) o sistema similar tal como se describe por Heid *et al.*, (Genome Res 1996;6:986-994) y Gibson *et al.* (Genome Res 1996;6:995-1001). El resultado del ABI 7700 (instrumento TaqMan®) se expresa en Ct o “ciclos umbral”. Con el sistema TaqMan®, un gen altamente expresado que tiene un número más alto de moléculas diana en una muestra genera una señal con menos ciclos de PCR (Ct más bajo) que un gen de expresión relativa más baja con menor número de moléculas diana (Ct más alto).
- 10 Tal como se usa en el presente documento, un gen “de mantenimiento” o “control interno” pretende incluir cualquier gen expresado de manera constitutiva o global cuya presencia permite una evaluación de los niveles de ARNm de *GST-pi*. Tal evaluación comprende una determinación del nivel constitutivo global de la transcripción del gen y un control para variaciones en la recuperación del ARN. Los genes “de mantenimiento” o “controles internos” pueden incluir, pero no se limitan a, el gen de ciclofilina, gen de  $\beta$ -actina, gen receptor de transferrina, gen de GAPDH, y similares. Lo más preferiblemente, el gen de control interno es el gen de  $\beta$ -actina tal como se describe por Eads *et al.*, Cancer Research 1999; 59:2302-2306.
- 15 Un control para variaciones en la recuperación de ARN requiere el uso de “ARN calibrador.” Se pretende que el “ARN calibrador” sea cualquier fuente disponible de ARN de control cuantificado previamente de manera precisa. Preferiblemente se usa ARN total humano de enfermedad de colon de adulto (n.º de catálogo 735263) de Stratagene.
- 20 “Expresión génica no corregida (UGE)” tal como se usa en el presente documento se refiere al resultado numérico de la expresión de *GST-pi* en relación con un gen de control interno generado por el instrumento TaqMan®. La ecuación usada para determinar UGE se muestra en el ejemplo 3 y se ilustra con cálculos de muestra en la figura 4.
- 25 Se describe en el presente documento un método para normalizar los valores de expresión génica no corregida (UGE) adquiridos a partir del instrumento Tasman® con valores de “expresión génica relativa conocida” derivados de tecnología distinta a TaqMan®. Preferiblemente, los valores de expresión relativa de *GST-pi* :  $\beta$ -actina derivados de tecnología distinta a TaqMan® se normalizan con valores de UGE de *GST-pi* derivados de TaqMan® a partir de una muestra de tejido.
- 30 “Expresión de *GST-pi* relativa corregida” tal como se usa en el presente documento se refiere a expresión de *GST-pi* normalizada mediante la cual UGE se multiplica por un factor de corrección específico de *GST-pi* ( $K_{GST-pi}$ ), dando como resultado un valor que puede compararse con un intervalo conocido de niveles de expresión de *GST-pi* en relación con un gen de control interno. El ejemplo 3 y la figura 4 ilustran estos cálculos en detalle. Estos valores numéricos permiten la determinación de si la “expresión de *GST-pi* relativa corregida” de una muestra particular está o no por encima o por debajo del nivel “umbral predeterminado”. El nivel umbral predeterminado de expresión de *GST-pi* relativa corregida con respecto al nivel de  $\beta$ -actina es de aproximadamente  $1,0 \times 10^{-3}$ .  $K_{GST-pi}$  específico para *GST-pi*, el control interno de  $\beta$ -actina y el calibrador ARN total humano de enfermedad de colon de adulto (n.º de catálogo 735263) de Stratagene, es  $7,28 \times 10^{-3}$ .
- 35 Los valores de “expresión génica relativa conocida” se derivan de muestras de tejido previamente analizadas y se basan en la razón de la señal de RT-PCR de un gen diana con respecto a un gen de control interno expresado de manera constitutiva (por ejemplo  $\beta$ -actina, GAPDH, etc.). Preferiblemente, tales muestras de tejido son muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (FPE) y el ARN se extrae de ellas según el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999, ahora patente estadounidense n.º 6.248.535.
- 45 Para cuantificar la expresión génica en relación con un control interno se usa la tecnología de RT-PCR cuantitativa convencional conocida en la técnica. Se realizan reacciones de PCR de tecnología Pre-TaqMan® para un número fijo de ciclos (es decir, 30) y se notifican valores de punto final para cada muestra. Se notifican entonces estos valores como una razón de la expresión de *GST-pi* con respecto a la expresión de  $\beta$ -actina. Véase la patente estadounidense n.º 5.705.336 concedida a Reed *et al.*
- 50  $K_{GST-pi}$  puede determinarse para un gen de control interno distinto de  $\beta$ -actina y/o un ARN calibrador diferente del ARN total humano de enfermedad de colon de adulto (n.º de catálogo 735263) de Stratagene. Para hacerlo, debe calibrarse tanto el gen de control interno como el ARN calibrador para muestras de tejido para las que ya han sido determinados los niveles de expresión de *GST-pi* en relación con ese gen de control interno particular (es decir, “expresión génica relativa conocida”). Preferiblemente, tales muestras de tejido son muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina (FPE) y se extrae el ARN de ellas según el protocolo descrito en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999.
- 55 Tal determinación puede hacerse usando técnicas de RT-PCR cuantitativa pre-TaqMan® convencionales bien conocidas en la técnica. Con tal determinación, tales muestras tienen niveles de “expresión génica relativa conocida”
- 60
- 65

de *GST-pi* útiles en la determinación de un nuevo  $K_{GST-pi}$  específico para el nuevo control interno y/o ARN calibrador como se describe en el ejemplo 3.

Los métodos de la invención son aplicables a un amplio intervalo de tipos de tejido y tumor y por tanto pueden usarse para la evaluación del tratamiento clínico de un paciente y como una herramienta de diagnóstico o pronóstico para una variedad de cánceres incluyendo de mama, cabeza y cuello, pulmón, esofágico, colorrectal y otros. En una realización preferida, los presentes métodos se aplican al pronóstico de adenocarcinoma esofagocardiaco.

Biopsias de tumores con tratamiento previo a quimioterapia están habitualmente disponibles sólo como tejidos fijados embebidos en parafina (FPE), que contienen en general sólo una cantidad muy pequeña de tejido heterogéneo. Tales muestras FPE son fácilmente tratables para microdissección, de manera que puede determinarse la expresión del gen *GST-pi* en tejido tumoral no contaminado con tejido estromal. Adicionalmente, pueden hacerse comparaciones entre tejido estromal y tumoral dentro de una muestra de tejido de biopsia, ya que tales muestras a menudo contienen ambos tipos de tejidos.

En general, puede usarse cualquier par de oligonucleótidos que flanquea una región del gen *GST-pi* para llevar a cabo los métodos de la invención. Los cebadores que se hibridan en condiciones rigurosas con una región del gen *GST-pi* para su uso en la presente invención amplificarán un producto entre 20 y 1000 pares de bases, preferiblemente 50-100 pares de bases, lo más preferiblemente menos de 100 pares de bases.

La invención proporciona pares de cebadores de oligonucleótido específicos y cebadores de oligonucleótido sustancialmente idénticos a los mismos, que permiten la evaluación particularmente precisa de la expresión de *GST-pi* en tejidos FPE. Son preferibles los cebadores de oligonucleótido, GST-F (SEQ ID NO: 1) y GST-R (SEQ ID NO: 2), (también denominados en el presente documento el par de cebadores de oligonucleótido GST) y cebadores de oligonucleótido sustancialmente idénticos a los mismos. Se ha mostrado que los cebadores de oligonucleótido GST-F (SEQ ID NO: 1) y GST-R, (SEQ ID NO: 2) son particularmente eficaces para medir los niveles de ARNm de *GST-pi* usando ARN extraído de las células FPE mediante cualquiera de los métodos para aislamiento de ARNm, por ejemplo tal como se describe en el ejemplo 1 y en solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999, ahora patente estadounidense n.º 6.248.535.

“Sustancialmente idéntico” en el contexto del ácido nucleico tal como se usa en el presente documento, significa hibridación con una diana en condiciones rigurosas y también que los segmentos de ácido nucleico, o sus cadenas complementarias, cuando se comparan, son iguales cuando se alinean adecuadamente, con las inserciones y deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 60% de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente el 70%, más normalmente 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 ausencia total de especificidad. Véase, Kanehisa, *Nucleic Acids Res.*, 12:203-213 (1984).

Esta invención incluye oligonucleótidos sustancialmente idénticos que hibridan en condiciones rigurosas (tal como se define en el presente documento) con toda o una parte de la secuencia de cebador de oligonucleótido de GST-F (SEQ ID NO: 1), su complemento o GST-R (SEQ ID NO: 2), o su complemento.

En condiciones de hibridación rigurosas, sólo hibridan secuencias de ácido nucleico altamente complementarias, es decir, sustancialmente similares. Preferiblemente, tales condiciones impiden la hibridación de ácidos nucleicos que tienen 4 o más apareamientos erróneos entre 20 nucleótidos contiguos, más preferiblemente 2 o más apareamientos erróneos entre 20 nucleótidos contiguos, lo más preferiblemente uno o más apareamientos erróneos entre 20 nucleótidos contiguos.

La parte que hibrida de los ácidos nucleicos tiene normalmente al menos 10 (por ejemplo, 15) nucleótidos de longitud. La parte que hibrida del ácido nucleico que hibrida es idéntica en al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente en al menos aproximadamente el 95% o lo más preferiblemente, aproximadamente en al menos el 98% a la secuencia de una parte o todo el cebador de oligonucleótido GST-F (SEQ ID NO: 1), su complemento o GST-R (SEQ ID NO: 2), o su complemento.

Se define a continuación la hibridación del cebador de oligonucleótido con una muestra de ácido nucleico en condiciones rigurosas. La estabilidad del híbrido o dúplex del ácido nucleico se expresa como una temperatura de fusión ( $T_m$ ), que es la temperatura a la que la sonda se disocia del ADN diana. Esta temperatura de fusión se usa para definir las condiciones de rigurosidad requeridas. Si las secuencias que van a identificarse son sustancialmente idénticas a la sonda, en vez de idénticas, es útil establecer primero la temperatura más baja a la que sólo se produce hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo SSC o SSPE). Entonces, suponiendo que el 1% de apareamientos erróneos da como resultado una disminución de 1°C en la  $T_m$ , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si se buscan secuencias que tienen una identidad >95% con la sonda, la temperatura de lavado final se disminuye en 5°C). En la práctica, el cambio en la  $T_m$  puede estar entre 0,5°C y 1,5°C por 1% de apareamientos erróneos.

Las condiciones rigurosas suponen hibridación a 68°C en SSC 5x/solución de Denhart 5x/SDS al 1,0%, y lavado en SSC 0,2x/SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Las condiciones moderadamente rigurosas incluyen lavado en SSC 3x a 42°C. Los parámetros de concentración de sal y temperatura se varían para conseguir un nivel óptimo de identidad entre el cebador y el ácido nucleico diana. Una orientación adicional en cuanto a tales condiciones está fácilmente disponible en la técnica, por ejemplo, Sambrook, Fischer y Maniatis, *Molecular Cloning, a laboratory manual*, (2ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, (1989) y F. M. Ausubel *et al* eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons (1994).

Los cebadores de oligonucleótido dados a conocer en el presente documento pueden permitir una evaluación precisa de la expresión del gen *GST-pi* en un tejido fijado o fijado y embebido en parafina, así como en un tejido congelado o fresco. Esto es a pesar del hecho de que el ARN derivado de muestras FPE está más fragmentado en relación con el de tejido fresco o congelado. Por tanto, los métodos de la invención son adecuados para su uso en ensayos de los niveles de expresión de *GST-pi* en tejido FPE donde no existían previamente ninguna forma de someter a ensayo la expresión del gen *GST-pi* usando tejidos fijados.

A partir de la medición de la cantidad de ARNm de *GST-pi* que se expresa en el tumor, el médico especializado puede obtener un pronóstico respecto a la resistencia clínica de un tumor a una genotoxina particular, preferiblemente una quimioterapia basada en platino, o a una quimioterapia que induce un tipo similar al daño de ADN. Las quimioterapias basadas en platino producen un "aducto voluminoso" del ADN, en el que el efecto principal es distorsionar la conformación tridimensional de la doble hélice. Se pretende que tales compuestos se administren solos, o junto con otras quimioterapias tales como gemcitabina (Gem) o 5-fluorouracilo (5-FU).

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

Las quimioterapias genotóxicas basadas en platino comprenden compuestos de coordinación de metales pesados que forman aductos de ADN covalentes. En general, estos compuestos de metales pesados se unen covalentemente al ADN para formar, en la parte pertinente, aductos de di nucleótidos cis-1,2-intracatenarios. En general, esta clase se representa por cis-diaminadichloroplatino (II) (cisplatino) e incluye cis-diamina-(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II) (carboplatino), cis-diamino-(1,2-ciclohexil)dichloroplatino(II) y cis-(1,2-etilendiamina)dichloroplatino(II). Los primeros agentes de platino incluyen análogos o derivados de cualquiera de los compuestos representativos anteriores.

Los tumores que pueden tratarse actualmente mediante compuestos de coordinación de platino incluyen carcinomas testiculares, endometriales, de cuello uterino, gástricos, de células escamosas, adrenocorticales y pulmonares de células pequeñas junto con meduloblastomas y neuroblastomas. Trans-diaminadichloroplatino (II) (trans-DDP) es clínicamente inútil debido, se cree, a la rápida reparación de sus aductos de ADN. El uso de trans-DDP como un agente quimioterapéutico en el presente documento probablemente proporcionaría un compuesto con baja toxicidad en células no seleccionadas y alta toxicidad relativa en células seleccionadas. En una realización preferida, el compuesto de platino es cisplatino.

Habiéndose descrito así la invención, la práctica de la invención se ilustra mediante los ejemplos experimentales proporcionados a continuación. El médico especializado comprenderá que los materiales y métodos usados en los ejemplos ilustrativos pueden modificarse de diversas formas.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1

#### *Aislamiento de ARN a partir de tejido FPE*

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

#### A. Desparafinación e hidratación de secciones:

(1) Se coloca una parte de una sección de aproximadamente 10 µM en un tubo de centrifuga de plástico de 1,5 ml.

(2) Se añaden 600 µl de xileno y se agita la mezcla vigorosamente durante aproximadamente 10 minutos a

temperatura ambiente (aproximadamente de 20 a 25°C).

(3) Se centrifuga la muestra durante aproximadamente 7 minutos a temperatura ambiente a la máxima velocidad de la centrífuga de mesa (aproximadamente 10-20.000 x g).

(4) Se repiten las etapas 2 y 3 hasta que la mayoría de la parafina se ha disuelto. Se requieren normalmente dos o más veces dependiendo de la cantidad de parafina incluida en la parte de muestra original.

(5) Se retira la disolución de xileno mediante agitación vigorosa con un alcohol inferior, preferiblemente con etanol al 100% (aproximadamente 600 µl) durante aproximadamente 3 minutos.

(6) Se centrifuga el tubo durante aproximadamente 7 minutos como en la etapa (3). Se decanta el sobrenadante y se desecha. El sedimento se vuelve blanco.

(7) Se repiten las etapas 5 y 6 con disoluciones de etanol sucesivamente más diluidas: primero con etanol aproximadamente al 95%, luego con etanol aproximadamente al 80% y finalmente con etanol aproximadamente al 70%.

(8) Se centrifuga la muestra durante 7 minutos a temperatura ambiente como en la etapa (3). Se desecha el sobrenadante y se deja secar el sedimento a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos.

#### B. Aislamiento de ARN con fenol-cloroformo

(1) Se añade una disolución de 400 µl de isotiocianato de guanidina que incluye sarcosina al 0,5% y 8 µl de ditiotreitól.

(2) Se homogeneiza entonces la muestra con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turrax, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC) durante aproximadamente de 2 a 3 minutos mientras se aumenta gradualmente la velocidad desde baja velocidad (velocidad 1) hasta alta velocidad (velocidad 5).

(3) Se calienta entonces la muestra a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 5-20 minutos. Es preferible el tapón del tubo que contiene la muestra con una aguja de calibre fino antes de calentar hasta 95°C. Alternativamente, el tapón puede fijarse con una abrazadera de plástico o con película de laboratorio.

(4) Se extrae entonces la muestra con 50 µl de acetato de sodio 2 M a pH 4,0 y 600 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (10:1,93:0,036), recién preparado mezclando 18 ml de fenol con 3,6 ml de una disolución 1:49 de alcohol isoamílico:cloroformo. Se agita vigorosamente la disolución durante aproximadamente 10 segundos, entonces se enfría en hielo durante aproximadamente 15 minutos.

(5) Se centrifuga la disolución durante aproximadamente 7 minutos a máxima velocidad. La fase superior (acuosa) se transfiere a un tubo nuevo.

(6) Se precipita el ARN con aproximadamente 10 µl de glucógeno y con 400 µl de isopropanol durante 30 minutos a -20°C.

(7) Se sedimenta el ARN mediante centrifugación durante aproximadamente 7 minutos en una centrífuga de mesa a máxima velocidad; se decanta el sobrenadante y se desecha; y se lava el sedimento con aproximadamente 500 µl de etanol a aproximadamente del 70 al 75%.

(8) Se centrifuga la muestra de nuevo durante 7 minutos a máxima velocidad. Se decanta el sobrenadante y el sedimento se seca al aire. Se disuelve entonces el sedimento en un tampón apropiado para experimentos adicionales (por ejemplo, 50 µl de Tris-cloruro 5 mM, pH 8,0).

#### EJEMPLO 2

##### *Transcripción inversa y PCR de de ARNm*

Transcripción inversa: se aisló ARN de tejido microdisecionado o no microdisecionado, fijado en formalina, embebido en parafina (FPE) tal como se ilustra en ejemplo 1 y tal como se describió previamente en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338 presentada el 20 de diciembre de 1999, ahora patente estadounidense n.º 6.248.535, que se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Tras precipitación con etanol y centrifugación, se disolvió el sedimento de ARN en 50 µl de Tris/Cl 5 mM a pH 8,0. La transcriptasa inversa de M-MLV extenderá un cebador de oligonucleótido hibridado con un molde de ADN o ARN monocatenario en presencia de desoxinucleótidos, produciendo una cadena complementaria. El ARN resultante se sometió a transcripción inversa con hexámeros al azar y transcriptasa inversa de M-MLV de Life Technologies. Se efectuó la transcripción

inversa mezclando 25 µl de la disolución de ARN con 25,5 µl 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 al azar al ARN), 45 min. a 42°C (para la reacción enzimática de transcripción inversa de M-MLV) y 5 min. a 95°C (para la inactivación por calor de la ADNasa).

5 “Mezcla de transcripción inversa” consiste en 10 ul de tampón 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 0,5 ul de hexámeros al azar (50 de D.O. disuelto en 550 ul de Tris-HCl 10 mM pH 7,5) 5 ul de dNTP 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 5 ul de DTT 0,1 M, 1,25 ul de BSA (3 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5), 1,25 ul de ARN Guard 24.800 U/ml (inhibidor de ARNasa) (Porcino n.º 27-0816, Amersham Pharmacia) y 2,5 ul de MMLV 200U/ul (Life Tech, n.º de catálogo 28025-02).

Las concentraciones finales de los componentes de reacción son: Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTP 1,0 mM, DTT 1,0 mM, BSA 0,00375 mg/ml, ARN Guard 0,62 U/ul y MMLV 10 U/ul.

15 Cuantificación por PCR de expresión de ARNm. La cuantificación del ADNc de *GST-pi* y un ADNc de gen de control interno o de mantenimiento (por ejemplo, β-actina) se hizo 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.) tal como se describe por Heid *et al.*, (Genome Res 1996;6:986-994); Gibson *et al.*, (Genome Res 1996;6:995-1001). En resumen, este método usa una sonda de oligonucleótido TaqMan® fluorogénica marcada doble, (GST-219T (SEQ ID NO: 3), T<sub>m</sub> = 69°C), que se hibrida específicamente dentro de los cebadores directo e inverso. La estimulación láser dentro de los pocillos tapados que contienen mezcla de reacción produce la emisión de un colorante de extinción en 3' (TAMRA) hasta que se escinde la sonda por la actividad nucleasa de 5' a 3' de la ADN polimerasa durante la extensión por PCR, produciendo la liberación de un colorante indicador en 5' (6FAM). La producción de un amplicón produce por tanto la emisión de una señal fluorescente que se detecta por la cámara de detección TaqMan® CCD (dispositivo de carga acoplada), y la cantidad de señal producida a un ciclo umbral dentro de la fase puramente exponencial de la reacción de PCR refleja el número de copias de partida de la secuencia de interés. La comparación del número de copias de partida de la secuencia de interés con el número de copias de partida del gen de control interno proporciona un nivel de expresión génica relativa. Los análisis de TaqMan® proporcionan valores que se expresan como razones entre dos mediciones absolutas (gen de interés/gen de control interno).

La mezcla de reacción de PCR consistió en 0,5 µl de la reacción de transcripción inversa que contiene el ADNc preparado tal como se describió anteriormente con 600 nM de cada cebador de oligonucleótido (GST-F (SEQ ID NO: 1), T<sub>m</sub> = 59°C y GST-R (SEQ ID NO: 2), T<sub>m</sub> = 59°C), 200 nM de sonda TaqMan® (SEQ ID NO: 3), 5 U de AmpliTaq Gold Polymerase, 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 400 µM, MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM y 1 x tampón TaqMan® A que contiene un colorante de referencia, hasta un volumen final de menos de 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 β-actina fueron sonda TaqMan® de β-actina (SEQ ID NO: 4), β-actina-592F (SEQ ID NO: 5) y β-actina-651R (SEQ ID NO: 6).

Los cebadores de oligonucleótido GST-F (SEQ ID NO:1) y GST-R (SEQ ID NO: 2) usados en la reacción descrita anteriormente amplificarán un producto de 72 pb.

### 45 EJEMPLO 3

#### *Determinación de la expresión génica no corregida” (UGE) para GST-pi*

Se llevan a cabo dos pares de reacciones paralelas, es decir, reacciones “de prueba” y reacciones de “calibración”. La reacción de amplificación de *GST-pi* y la reacción de amplificación de control interno de β-actina son reacciones de prueba. Se realizan reacciones de amplificación de β-actina y *GST-pi* separadas en el molde de ARN calibrador y se denominan reacciones de calibración. El instrumento TaqMan® proporcionará cuatro valores diferentes de ciclo umbral (Ct): Ct<sub>*GST-pi*</sub> y Ct<sub>β-actina</sub> a partir de las reacciones de prueba y Ct<sub>*GST-pi*</sub> y Ct<sub>β-actina</sub> a partir de las reacciones de calibración. Las diferencias en los valores de Ct para las dos reacciones se determinan según la siguiente ecuación:

$$\Delta Ct_{\text{prueba}} = Ct_{\text{GST-pi}} - Ct_{\beta\text{-actina}} \text{ (a partir de la reacción “de prueba”)}$$

$$\Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{GST-pi}} - Ct_{\beta\text{-actina}} \text{ (a partir de la reacción “de calibración”)}$$

60 A continuación, la etapa implica aumentar el número 2 a la ΔCt negativa, según las siguientes ecuaciones.

$$2^{-\Delta Ct_{\text{prueba}}} \text{ (a partir de la reacción “de prueba”)}$$

$$2^{-\Delta Ct_{\text{calibrador}}} \text{ (a partir de la reacción “de calibración”)}$$

65

Para obtener entonces una expresión génica no corregida para *GST-pi* a partir del instrumento TaqMan® se lleva a cabo el siguiente cálculo:

$$\text{Expresión génica no corregida (UGE) para } GST-pi = 2^{-\Delta Ct_{\text{prueba}}} / 2^{-\Delta Ct_{\text{calibrador}}}$$

5 *Normalización de UGE con niveles de expresión de GST-pi relativa conocida*

10 El cálculo de normalización implica una multiplicación de UGE por un factor de corrección ( $K_{GST-pi}$ ) específico para *GST-pi* y un ARN calibrador particular. También puede determinarse un factor de corrección  $K_{GST-pi}$  para cualquier gen de control interno y cualquier ARN calibrador cuantificado previamente de manera precisa. Preferiblemente, se usan el gen de control interno  $\beta$ -actina y el calibrador ARN total humano de enfermedad de colon de adulto cuantificado previamente de manera precisa, (n.º de catálogo 735263) de Stratagene. Dados estos reactivos, el factor de corrección  $K_{GST-pi}$  es igual a  $7,28 \times 10^{-3}$ .

15 La normalización se efectúa usando una modificación del método de  $\Delta Ct$  descrito por Applied Biosystems, el fabricante de TaqMan®, en el boletín de usuario n.º. 2 y descrito anteriormente. Para llevar a cabo este procedimiento, se analizó la UGE de 6 tejidos de prueba diferentes para la expresión de *GST-pi* usando la metodología de TaqMan® descrita anteriormente. Se usó el gen de control interno  $\beta$ -actina y el ARN calibrador, ARN total humano de enfermedad de colon de adulto, (n.º de catálogo 735263) de Stratagene.

20 El nivel de expresión relativa de *GST-pi* conocido de cada muestra 14-1, 14-5, 14-8, 13-24, 13-25 se dividió entre su UGE derivada de TaqMan® correspondiente para dar un factor K de corrección no promediado.

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

25 A continuación, se promedian todos los valores de K para determinar un factor de corrección  $K_{GST-pi}$  individual específico para *GST-pi*, ARN total humano de enfermedad de colon de adulto (n.º de catálogo 735263) de Stratagene a partir de ARN calibrador y  $\beta$ -actina.

30 Por tanto, para determinar la expresión de *GST-pi* relativa corregida en una muestra de tejido desconocido en una escala que concuerda con los estudios de expresión de *GST-pi* de pre-TaqMan®, simplemente se multiplican los datos de expresión génica no corregida (UGE) derivados del aparato TaqMan® por el factor de corrección específico  $K_{GST-pi}$ , dado el uso del mismo gen de control interno y ARN calibrador.

$$35 \text{ Expresión de } GST-pi \text{ relativa corregida} = \text{UGE} \times K_{GST-pi}$$

40 Puede determinarse un  $K_{GST-pi}$  usando cualquier ARN calibrador o gen de control interno cuantificado previamente de manera precisa. Pueden calibrarse fuentes futuras de ARN cuantificado previamente de manera precisa para muestras con niveles de expresión de *GST-pi* relativa conocidos tal como se describe en el método anterior o pueden calibrarse ahora frente a ARN calibrador calibrado previamente tal como ARN total humano de enfermedad de colon de adulto (n.º de catálogo 735263) de Stratagene descrito anteriormente.

45 Por ejemplo, si se determina un  $K_{GST-pi}$  posterior para un gen de control interno diferente y/o un ARN calibrador diferente, debe calibrarse tanto el gen de control interno como el ARN calibrador para muestras de tejido para las que ya se han determinado los niveles de expresión de *GST-pi* en relación con 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 dividirán entre sus correspondientes niveles de UGE para determinar un K para esa muestra. Los valores de K se promedian entonces dependiendo del número de muestras conocidas para determinar un nuevo  $K_{GST-pi}$  específico para los genes de control interno diferentes y/o ARN calibrador.

#### EJEMPLO 4

55 *La expresión de GST-pi se correlaciona con la capacidad de supervivencia*

60 Se aisló el ARNm total de muestras de tumor con tratamiento previo con FPE microdisseccionadas, y se midió la expresión de *GST-pi* relativa corregida usando RT-PCR cuantitativa tal como se describe en los ejemplos 2 y 3. Se describe un método para el aislamiento de ARNm de tales muestras en el ejemplo 1 y en la solicitud de patente estadounidense n.º 09/469.338, presentada el 20 de diciembre de 1999, ahora patente estadounidense n.º 6.248.535, y se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad.

65 Los valores de las expresiones génicas se correlacionaron con el desenlace clínico usando métodos estadísticos apropiados. Se estimó la supervivencia según Kaplan y Meier (Kaplan *et al.*, J Am Stat Assoc 1958; 53: 187-220). Se llevó a cabo el análisis de única variable con la prueba de rangos logarítmicos (Mantel, Chemother Rep 1966; 150: 163-170). Se fijó el nivel de significación a  $P < 0,05$ . Todos los valores de P notificados se basaron en ensayos bilaterales.

Se analizaron un total de 31 muestras de tumor de adenocarcinoma de unión esofágica o gastroesofágica (esofagocardiaco) de 31 pacientes para el análisis de expresión del ARNm de *GST-pi*. Treinta (97%) de los pacientes eran hombres, la mediana de edad era 64 años (media 60,9 años, intervalo 36-78 años). Los antecedentes étnicos de este grupo incluían 29 caucásicos, 1 asiático y 1 afro-americano. Usando los criterios de estadificación clínica TNM, 2 (6,5%) de los pacientes tenían enfermedad en estadio I, 22 (71%) tenían enfermedad en estadio II, 1 (3,2%) tenían enfermedad en estadio III y 6 (19,4%) pacientes tenían enfermedad en estadio IV. La supervivencia global fue evaluable para todos los pacientes. La mediana de la supervivencia global fue de 17,17 meses (media 24,8 meses, intervalo 3,8-156,7 meses). Doce (38,7%) de los pacientes habían muerto y 19 (61,3%) estaban vivos.

El tratamiento consistió en que todos los pacientes recibieron dos ciclos de 5-FU administrados como 800 mg/m<sup>2</sup> por día durante 5 días o 1000 mg/m<sup>2</sup> por día durante 4 días más 75 mg/m<sup>2</sup> de cisplatino con radiación de 45 Gy simultánea, seguido por resección operatoria. Para entrar en el estudio, cada paciente tenía que haber completado el régimen de quimioterapia y la radioterapia prescrita, haberse sometido a resección completa macroscópica y haber vivido al menos 30 días tras la cirugía.

La influencia del estadio del tumor se explicó reuniendo los datos sobre los niveles de estadios según TNM. Se generaron curvas de supervivencia y estadísticas de rango logarítmico para pacientes con enfermedad en estadio II y estadio IV únicamente debido a los números muy pequeños de pacientes en los otros estadios. La mediana del nivel de expresión de ARNm de *GST-pi* relativa corregida fue  $1,0 \times 10^{-3}$  (media  $0,51 \times 10^{-3}$ , intervalo  $0,0-16,1 \times 10^{-3}$ , todos los valores de  $GST-pi \times 10^{-3}/\beta$ -actina). Un análisis de supervivencia según los valores de *GST-pi* mostró que los pacientes cuyos tumores tenían un nivel de expresión del gen *GST-pi* relativa más alto que el valor de la mediana tenían un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo en comparación con aquellos con niveles por debajo del valor de mediana ( $P=0,0073$ , prueba de rango logarítmico). Por consiguiente, la mediana de ARNm de *GST-pi* relativo corregido se asignó para que fuera un valor umbral. Esta asociación se muestra gráficamente en la figura 1. La relación era independiente del estadio. Las figuras 2 y 3 muestran que la asociación estaba presente si el análisis se limitaba sólo a aquellos con enfermedad en estadio II o estadio IV.

La expresión de ARNm de *GST-pi* es un factor pronóstico significativo para pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco que se tratan con un régimen que contiene cisplatino.

**Lista de secuencias**

- 35 <110> RESPONSE GENETICS, INC.
- <120> MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE UN RÉGIMEN QUIMIOTERÁPICO BASADO EN LA EXPRESIÓN DE GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA Pi
- 40 <130> 11220-159
- <140> 09/879.986
- <141> 14-06-2001
- 45 <160> 6
- <170> FastSEQ para Windows, versión 4.0
- 50 <210> 1
- <211> 24
- <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 60 <223> Cebador
- <400> 1
- cctgtaccag tccaatacca tcct 24
- 65 <210> 2

<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Cebador  
<400> 2  
tcctgctggt ccttccata 20  
15 <210> 3  
<211> 20  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Sonda  
<400> 3  
30 tcacctgggc cgcacccttg 20  
<210> 4  
<211> 18  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
40 <220>  
<223> Sonda  
<400> 4  
45 accaccacgg ccgagcgg 18  
<210> 5  
50 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
55 <220>  
<223> Sonda  
60 <400> 5  
tgagcgcggc tacagctt 18  
65 <210> 6  
<211> 20

## ES 2 457 077 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sonda

10

<400> 6

tccttaatgt caccacgat 20

## REIVINDICACIONES

1. Método para determinar un régimen quimioterápico para tratar un tumor en un paciente, que comprende:
- 5 (a) desparafinar una muestra de tumor fijada embebida en parafina para obtener una muestra de tumor desparafinada;
- 10 (b) aislar ARNm de la muestra de tumor desparafinada en presencia de una cantidad eficaz de un agente caotrópico mediante calentamiento de la muestra de tejido en una disolución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico hasta una temperatura en el intervalo de 75 a 100°C durante un periodo de tiempo de 5 a 120 minutos y recuperar el ARNm de la disolución caotrópica, en el que el tumor es un adenocarcinoma esofagocardiaco o cáncer de pulmón de células no pequeñas;
- 15 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores de oligonucleótido que hibridan en condiciones de alta rigurosidad con una región del gen *GST-pi*, para obtener una muestra amplificada;
- (d) determinar la cantidad de ARNm de *GST-pi* en la muestra amplificada;
- 20 (e) comparar la cantidad de ARNm de *GST-pi* de la etapa (d) con una cantidad de ARNm de un gen de control interno; y
- (f) elegir un régimen quimioterápico basado en platino como el régimen quimioterápico basado en la cantidad de ARNm de *GST-pi* en la muestra amplificada y un nivel umbral predeterminado para la expresión del gen *GST-pi*.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que el par de cebadores de oligonucleótido consiste en un oligonucleótido de SEQ ID NO: 1 o un oligonucleótido con una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma y un oligonucleótido de SEQ ID NO: 2 o un oligonucleótido con una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma.
- 30 3. Método según la reivindicación 1, en el que el par de cebadores de oligonucleótido consiste en un oligonucleótido de SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido de SEQ ID NO: 2.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el nivel umbral de expresión del gen *GST-pi* es  $1,0 \times 10^{-3}$  veces el nivel de expresión del gen de control interno.
- 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el régimen quimioterápico basado en platino comprende cisplatino, carboplatino, cis-diamino-(1,2-ciclohexil)-dicloroplatino(II) o cis-(1,2-etilendiamina)-dicloroplatino(II).
- 40 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el tumor es un tumor de adenocarcinoma esofagocardiaco.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el régimen quimioterápico basado en platino comprende cisplatino.
- 45 8. Método para determinar el nivel de expresión de *GST-pi* en una muestra de tejido embebida en parafina fijada, que comprende:
- (a) desparafinar la muestra de tejido; para obtener una muestra desparafinada;
- 50 (b) aislar ARNm de la muestra desparafinada en presencia de una cantidad eficaz de un agente caotrópico mediante calentamiento de la muestra de tejido en una disolución que comprende una concentración eficaz de un compuesto caotrópico hasta una temperatura en el intervalo de 75 a 100°C durante un periodo de tiempo de 5 a 120 minutos y recuperar el ARNm de la disolución caotrópica;
- 55 (c) someter el ARNm a amplificación usando un par de cebadores de oligonucleótido que hibridan en condiciones rigurosas con una región del gen *GST-pi*, para obtener una muestra amplificada; y
- (d) determinar la cantidad de ARNm de *GST-pi* en relación con la cantidad de ARNm de un gen de control interno.
- 60 9. Método según la reivindicación 8 en el que el par de cebadores de oligonucleótido consiste en un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma y un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma.
- 65 10. Método según la reivindicación 8 en el que, el gen de control interno es  $\beta$ -actina.
11. Cebador de oligonucleótido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en al menos

el 80% a la misma.

12. Cebador de oligonucleótido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma.

5

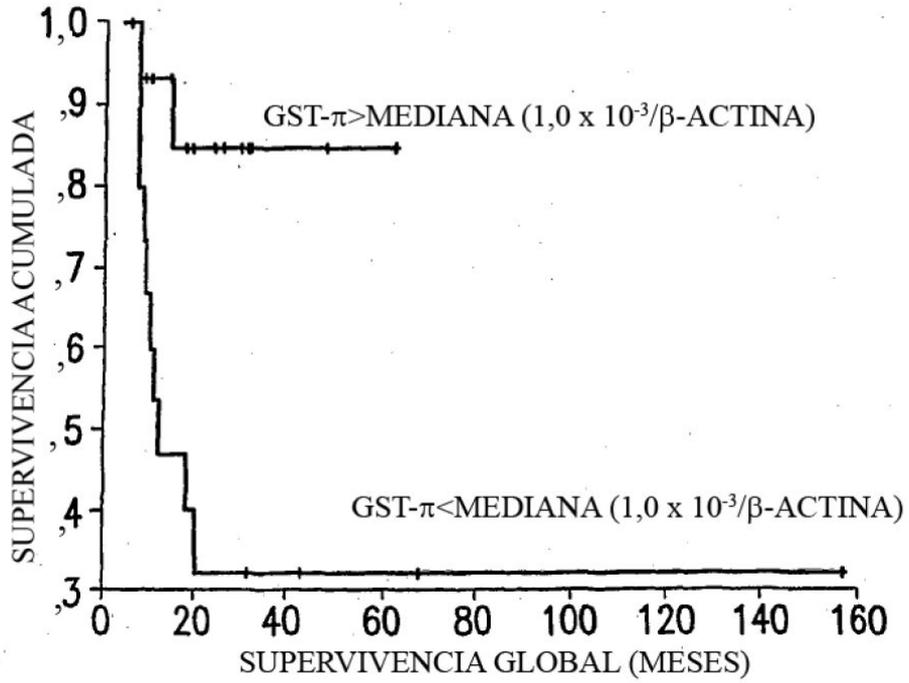
13. Kit para detectar la expresión de un gen *GST-pi* que comprende un par de cebadores de oligonucleótido que consiste en un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma y un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en al menos el 80% a la misma.

10

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7, en el que el tumor es un cáncer de pulmón de células no pequeñas.

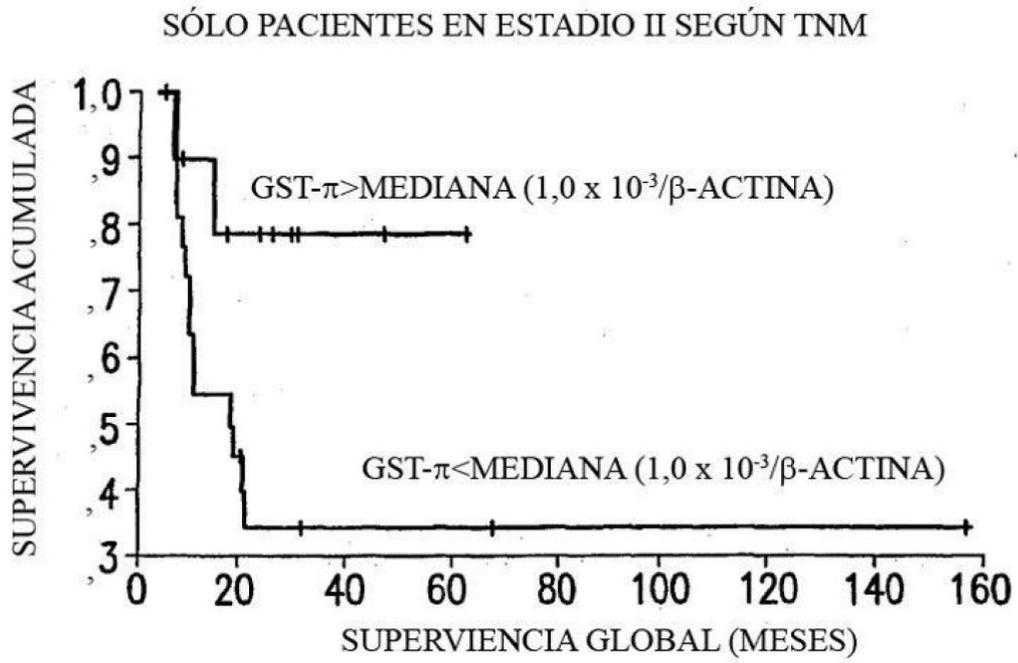
15

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el par de cebadores de oligonucleótido consiste en un oligonucleótido de SEQ ID NO: 1 y un oligonucleótido de SEQ ID NO: 2.



Asociación entre supervivencia y expresión de ARNm relativa de *GST- $\pi$*  en pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco tratados con 5-FU y cisplatino. Los pacientes con valores de *GST- $\pi$*  por encima del valor de mediana tenían una ventaja de supervivencia en comparación con aquellos pacientes con valores por debajo de la mediana. Los valores censurados se indican por una marca.

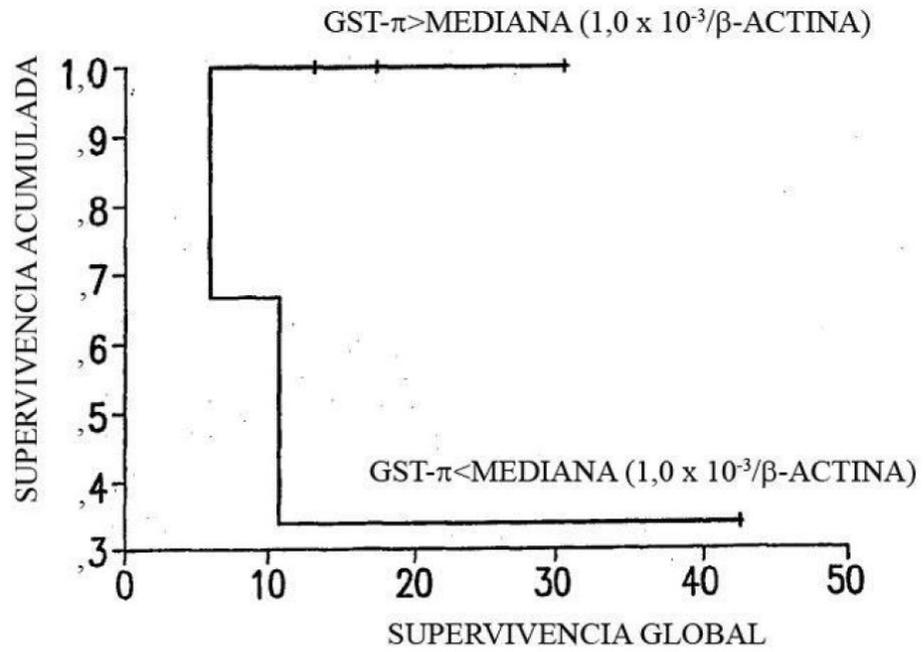
FIG. 1



Análisis de supervivencia limitado a pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco en estadio II según TNM

FIG. 2

PACIENTES EN ESTADIO IV SEGÚN TNM



Análisis de supervivencia limitado a pacientes con adenocarcinoma esofagocardiaco en estadio II

FIG. 3

	A partir de reacción de "prueba"				A partir de reacción de "calibrado"				Expresión génica no corregida (UGE)	Valores de $GSTP1$ publicados	Derivación de $K_{GSTP1}$ (K prom.)		exp. de $GSTP1$ relativa
	$C_T$ $GSTP1$	$C_T$ $\beta$ -ACTINA	$\Delta C_T$	$2^{-\Delta C_T}$	$C_T$ $GSTP1$	$C_T$ $\beta$ -ACTINA	$\Delta C_T$	$2^{-\Delta C_T}$			K	$K_{GSTP1}$	
Muestra													
Experimental	Desconocida 1	27.87	20.57	4.99	0.0314674	-	-	-	0.15	-	-	$7.28 \times 10^{-3}$	$1.10 \times 10^{-3}$
	Desconocida 2	24.32	19.91	2.2	0.2176376	-	-	-	1.05	-	-	$7.28 \times 10^{-3}$	$7.65 \times 10^{-3}$
	ARN calib.	-	-	-	-	21.43	19.16	2.27	0.2073299	0.207/0.207=1	-	-	-
A partir de datos publicados	14-1	30.55	25.5	5.05	0.0301855	-	-	-	0.18	$1.6 \times 10^{-3}$	$9.05 \times 10^{-3}$	$7.28 \times 10^{-3}$	-
	14-5	29.41	25.7	3.71	0.076415	-	-	-	0.45	$2.91 \times 10^{-3}$	$6.5 \times 10^{-3}$	$7.28 \times 10^{-3}$	-
	14-8	31.41	27.1	4.31	0.0504151	-	-	-	0.31	$2.91 \times 10^{-3}$	$6.95 \times 10^{-3}$	$7.28 \times 10^{-3}$	-
	13-24	30.16	25.42	4.74	0.0374212	-	-	-	0.22	$1.45 \times 10^{-3}$	$6.62 \times 10^{-3}$	$7.28 \times 10^{-3}$	-
	13-25	29.27	25.5	3.77	0.0733022	-	-	-	0.43	$3.12 \times 10^{-3}$	$7.27 \times 10^{-3}$	$7.28 \times 10^{-3}$	-
ARN calib.	-	-	-	-	26.09	23.54	2.55	0.170755	0.1707/0.1707=1	-	-	-	-

FIG.4 GRÁFICO QUE ILUSTRARÍA CÓMO CALCULAR LA EXPRESIÓN DE  $GSTP1$  EN RELACIÓN CON UN GEN DE CONTROL INTERNO

Los cebadores y la sonda usados

Cebador directo: GST-F [24 pb, 59 C]:  
CCTGTACCAGTCCAATACCATCCT, (SEQ ID NO: 1)

Cebador inverso: GST-R [20 pb, 59 C]:  
TCCTGCTGGTCCTTCCCATA (SEQ ID NO: 2)

Sonda Taqman: GST-219T [20 pb, 69 C]:  
TCACCTGGGCCGCACCCTTG (SEQ ID NO: 3)

Amplificón: 72 pb

Sonda de  $\beta$ -actina Taqman®:

ACCACCACGG CCGAGCGG (SEQ ID NO: 4)

$\beta$ -actina-592F  
TGAGCGCGGC TACAGCTT (SEQ ID NO: 5)

$\beta$ -actina-651R  
TCCTTAATGT CACGCACGAT (SEQ ID NO: 6)

FIG.5