

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 724**

21 Número de solicitud: 201330783

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.01.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070433**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA  
PAZ (54.0%)**  
**Paseo de la Castellana, 261**  
**28046 Madrid ES;**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (21.5%);**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (21.5%) y**  
**FUNDACIÓN HOSPITAL DE MADRID (3.0%)**

72 Inventor/es:

**IBÁÑEZ DE CÁCERES, Inmaculada;**  
**BELDA INIESTA, Cristóbal;**  
**PERNIA ARIAS, Olga;**  
**PERONA ABELLÓN, Rosario y**  
**CORTÉS SEMPERE, María**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MÉTODO PARA PREDECIR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA  
COMBINADA CON QUIMIOTERAPIA BASADA EN CISPLATINO**

57 Resumen:

Método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.

La invención se refiere a un método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico, donde dicho método se basa en la detección de la presencia de metilación del gen IGFBP-3. La presente invención también se refiere a un método in vitro para diseñar un tratamiento personalizado de un individuo con dicha enfermedad. El método de la invención puede ser cuantitativo o semicuantitativo. La presente invención también se refiere a una sonda para la detección cuantitativa de la metilación del gen IGFBP-3, a un kit que la comprende y al uso del kit para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento indicado.

**ES 2 527 724 A1**

Método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con  
quimioterapia basada en cisplatino

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a un método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico, donde dicho método se basa en la detección de la presencia de metilación del gen *IGFBP-3*. El método de la invención puede ser cuantitativo o semicuantitativo. La presente invención también se refiere a una sonda para la detección cuantitativa de la metilación del gen *IGFBP-3*. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo del tratamiento del cáncer.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15

La terapia combinada de radioterapia y quimioterapia en un paciente con cáncer permite combinar los beneficios de ambas técnicas y ha conseguido mejorar la supervivencia en diversos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, sin embargo, la toxicidad se ve aumentada con dicho tratamiento (Moreno-Jiménez M *et al.* Rev Med Univ Navarra 51(4):13-33).

20

En quimioterapia, el cisplatino, también denominado *cis*-diaminodicloroplatino (II) (CDDP), es el tratamiento de elección para diversos tipos de cánceres, entre ellos, el cáncer de pulmón no microcítico. El cisplatino se puede administrar en terapia combinada con radioterapia ya que estudios multicéntricos han demostrado mejor respuesta global (Curran WJ, Jr. *et al.* 2011 Journal of the National Cancer Institute 103:1452-60).

25

Se ha descrito que los agentes quimioterápicos basados en platinos, entre los que se encuentra el cisplatino, metilan *de novo* el promotor de ciertos genes, alterando así su expresión. Entre dichos genes se encuentra el gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (*IGFBP-3*) (Ibáñez de Cáceres I. *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90).

30

La hipermetilación de la región 5' del promotor del gen *IGFBP-3*, es un proceso epigenético que acontece con elevada frecuencia en el cáncer humano (40%-60%) (Chang YS *et al.* 2002 Clin Cancer Res 8:3796-802; Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90; Torng PL *et al.* 2009 Mol Cancer 8:120). La metilación del gen  
5 *IGFBP-3* puede detectarse a través del uso de diferentes técnicas, como por ejemplo, secuenciación con bisulfito y el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación (MSP) (Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90; Tomii K *et al.* 2007 Int J Cancer 120:566-73; Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2006 Cancer Res 66:5021-8).

10

En la actualidad existe una necesidad clínica de conocer si un paciente va a responder o no a un tratamiento combinado de quimioterapia y radioterapia para poder adaptar el tratamiento a cada caso de manera individual, para evitar así los efectos secundarios asociados a la toxicidad de la terapia combinada y evitar el sobretratamiento en  
15 pacientes que no vayan a responder al mismo.

#### DESCRIPCION DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar un método de  
20 predicción de la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinado con quimioterapia basada en platinos.

En la presente invención se demuestra que la detección y/o cuantificación de la región promotora del gen *IGFBP-3*, en concreto de la región comprendida entre las  
25 posiciones -584 y -492 del promotor (posiciones numeradas desde el ATG iniciador), es útil para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en platino, así como para diseñar un tratamiento individualizado del sujeto.

30 El método de la invención puede realizarse mediante la utilización de parejas de cebadores que detecten la presencia de metilación y/o parejas de cebadores que detecten la ausencia de metilación, lo que en la presente invención se denomina detección "semicuantitativa". Además, también puede realizarse mediante el uso de una sonda, lo que permite una detección "cuantitativa". Los estudios que demuestran

la invención se llevaron a cabo tanto en líneas celulares como en muestras quirúrgicas de pacientes

Además, los inventores han demostrado que el uso de una sonda que detecta las  
5 posiciones -532 y -526 del promotor del gen *IGFBP-3*, permite la cuantificación del grado de metilación de dicho gen. El uso de la sonda descrita en la invención permite predecir si un sujeto que padece cáncer va a responder a un tratamiento combinado de quimioterapia basada en platinos y de radioterapia con mayor sensibilidad y eficacia.

10

Por lo aquí descrito, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la  
15 metilación del promotor del gen *IGFBP-3*.

En la presente invención, preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama. Más preferiblemente el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

20

El término “cáncer de pulmón no microcítico”, “cáncer no microcítico pulmonar”, “carcinoma no microcítico de pulmón” (CNMP), “carcinoma de pulmón no microcítico” (CPNM), o cáncer pulmonar de células no pequeñas (en inglés “non-small cell lung cancer”, NSCLC) se refiere a un tipo de cáncer o tumor de pulmón que comprende,  
25 según clasificación histológica, el subtipo carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso, carcinoma sarcomatoide, y carcinoma de células grandes.

Se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se emplean para curar o  
30 aliviar una enfermedad.

En la presente invención se entiende como “tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino” a aquel tratamiento secuencial que comprende primeramente un tratamiento de quimioterapia basada en cisplatino y  
35 posteriormente un tratamiento de radioterapia según los criterios particulares de cada

caso y conocidos por el experto en la materia.

La presente invención la quimioterapia también podría estar basada en otros fármacos derivados del platino, como por ejemplo, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino y  
5 picoplatino.

Se entiende por “metilación del promotor” la presencia de grupos metilo en las posiciones 5’ de las citosinas de la isla CpG previas y contiguas a una guanina (es decir, de un dinucleótido CG) del promotor de un gen.

10

Se entiende por “hipermetilación” al aumento de la metilación de un promotor con respecto a valores considerados normales por el experto en la materia. Se entiende por “hipometilación” a la disminución de la metilación de un promotor con respecto a valores considerados normales por el experto en la materia.

15

En la presente invención se entiende como “isla CpG” aquella región del promotor de un gen que contiene al menos 500 pares de bases, una proporción de dinucleótidos CG (citosina-guanina) mayor del 50%.

20 En la presente invención se entiende por “promotor” o “región promotora”, a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen determinado, en la presente invención se trata del gen *IGFBP-3*.

En la presente invención se define el gen *IGFBP-3* (o *IGFBP3*) como el gen que  
25 codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina. Dicho gen (*Entrez ID: 3486*) está localizado en la región cromosómica 7p12.3 y codifica para dos transcritos alternativos que comparten el mismo promotor, NM\_000598.4 y NM\_001013398.1. La isla CpG del gen *IGFBP-3* se encuentra localizada en posición -518/+744 respecto el primer exón y engloba 688 pares de bases por encima del sitio  
30 ATG, incluyendo el promotor descrito del gen (SEQ ID NO: 1).

La detección y/o cuantificación en la presente invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, pero sin limitarnos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR específica de metilación

(MSP), MSP cuantitativa (QMSP o qMSP) o secuenciación. Previamente, el ADN puede haber sido sometido a una reacción con bisulfito previo a su detección y/o cuantificación.

5 El término “muestra biológica” incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ácido desoxirribonucleico (ADN). Dicho ADN puede o no estar metilado y puede presentar distintos grados de metilación.

10

En la presente invención el término “sujeto”, “individuo” y “paciente” se usan indistintamente.

15 En la presente invención se ha demostrado que la presencia de metilación en el promotor del gen *IGFBP-3* es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, mientras que la ausencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que la terapia a administrar es quimioterapia basada en cisplatino únicamente.

20 Por lo tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece cáncer que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en el que la presencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada  
25 con quimioterapia basada en cisplatino.

El término “*in vitro*” se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

30 Una realización preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en la región del promotor comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor ambas posiciones incluidas (SEQ ID NO: 2).

En la presente invención la localización de las posiciones -584 y -492 del promotor del gen *IGFBP-3* se realizan desde el codón ATG iniciador, conforme a la forma realizada por cualquier experto en la materia.

5 Otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o la cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en las posiciones -532 y-526 desde el codón ATG iniciador. Es decir, estas posiciones corresponden a las posiciones 157 y 163 de la SEQ ID NO:1 y a las posiciones 53 y 59 de la SEQ ID NO:2. Las posiciones -532 y-  
10 526 son citosinas comprendidas en dinucleótidos CG.

Otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa.  
15 Preferiblemente, la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 (cebador sentido, de secuencia 5'-ttttacgagggtatatacgaatgc-3') y SEQ ID NO: 4 (cebador antisentido, de secuencia 5'-tctcgaataaaaatctccctacg-3') (cebadores para la detección de metilación) y/o SEQ ID NO: 5 (cebador sentido, de secuencia 5'-agaaagtttatgagggtatatatga-3') y SEQ ID NO: 6  
20 (cebador antisentido, de secuencia 5'-cactctcaaaaataaaatctccct-3') (cebadores para la detección de ausencia de metilación). Preferiblemente la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

25 El término "cebador" (también denominado "oligo"), como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de  
30 secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

Como se ha indicado anteriormente, el método de la invención puede ser realizado  
35 mediante también el uso de una sonda, de modo que sería un método cuantitativo,

mientras que si no se utilizara una sonda y se utilizaran sólo los cebadores sería un método semicuantitativo.

5 Por lo tanto, otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde además se emplea una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 (5'-ccgatatcgaaaaaact-3'). Preferiblemente, la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, la sonda comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo, por ejemplo FAM™, o VIC®. En una realización aún  
10 más preferida, en el extremo amino terminal la sonda comprende el fluoróforo 6-FAM™ y en el carboxilo terminal un "minor groove binder" (MGB) sin fluorescencia (MGB-NFQ).

15 En la presente invención nos referiremos a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 como a la "sonda de la invención".

La sonda de la invención se puede producir por los métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, puede producirse a partir de síntesis química.

20 La sonda de la invención se une al ADN del promotor del gen *IGFBP-3* cuando éste está metilado.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, caracterizado porque  
25 comprende los siguientes pasos:

- a. aislamiento de ácido desoxirribonucleico en una muestra biológica aislada de un sujeto;
- b. modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico;
- 30 c. hibridación con cebadores específicos;
- d. amplificación de una secuencia comprendida entre los cebadores descritos en el paso (c);
- e. detección de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- f. comparar la metilación del paso (d) con niveles estándar;



- g. encontrar diferencias significativas en la comparación del paso (f);
- h. asociar las diferencias significativas del paso (g) a una metilación o desmetilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- 5 i. asociar la presencia de metilación del paso (h) a una respuesta favorable al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino; o asociar la desmetilación del paso (h) a una respuesta a tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino desfavorable.

10 En la presente invención el aislamiento del ADN y la modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico se realiza por los métodos conocidos por el experto en la materia.

15 El término “niveles estándar” tal como se entiende en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a los niveles de metilación obtenidos de una muestra de referencia que presente un grado de metilación conocido.

20 En la presente invención “diferencia significativa” se refiere a que existen diferencia estadísticas entre los valores comparados, siendo la probabilidad estadística al menos mayor que 0,05 ( $p > 0,05$ ) o mayor que 0.005 ( $p > 0.005$ ) y obteniéndose ésta según el test estadístico aplicable a cada caso.

25 En la presente invención los términos “desmetilación”, “ausencia de metilación” y “falta de metilación” se utilizan indistintamente.

En la presente invención se considera “favorable” a un aumento de la supervivencia del individuo tras el tratamiento. Se considera “desfavorable” a una disminución de la supervivencia del individuo tras el tratamiento.

30 Una realización preferida del método tercero de la invención, se refiere al método donde la muestra de referencia y las muestras de estudio han sido previamente normalizadas antes de la comparación.

Se entiende por "normalización" la utilización de una muestra control que sirva para eliminar variaciones experimentales entre las distintas muestras.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde  
5 los cebadores del paso (c) son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

Una realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al  
10 método donde los cebadores del paso (c) son SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al  
método donde además en el paso (c) se incluye una sonda y en el paso (e) se  
cuantifica la metilación. Preferiblemente la sonda comprende la secuencia de  
nucleótidos SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, la sonda consiste en la secuencia de  
15 nucleótidos SEQ ID NO: 7.

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al  
método donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y  
cuello, glioma o cáncer de mama. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es cáncer de  
20 pulmón no microcítico.

Una realización preferida del primer, del segundo y del tercer aspecto de la invención  
se refiere al método donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste  
en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido  
25 ascítico.

Otra realización preferida del primer, del segundo y del tercer aspecto de la invención  
se refiere al método donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y  
embebida en parafina  
30

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una sonda de ácido nucleico  
que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la sonda de  
35 ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

Otra realización aún más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la sonda que además comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo, por ejemplo FAM™, o VIC®. En una realización aún  
5 más preferida, en el extremo amino terminal la sonda comprende el fluoróforo 6-FAM™ y en el carboxilo terminal un “minor groove binder” (MGB) sin fluorescencia (MGB-NFQ).

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la sonda de la  
10 invención para la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la sonda de la invención para determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento de radioterapia  
15 combinado con quimioterapia basada en cisplatino.

Una realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde el sujeto padece cáncer. Preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama. Más  
20 preferiblemente, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

Otra realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.  
25

Otra realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

30 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la sonda del cuarto aspecto de la invención.

Una realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende cebadores. Más preferiblemente los cebadores son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

- 5 El kit además puede comprender al menos una ADN polimerasa, una retrotranscriptasa, una ARN polimerasa o un fluoróforo. Además el kit puede comprender una mezcla de deoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs), una mezcla de nucleótidos tri-fosfato (NTPs), deoxiribonucleasa (DNasa), inhibidores de la ribonucleasa (RNasa), Dithiothreitol (DTT), pirofosfatasa inorgánica (PPi) y los  
10 tampones necesarios para las enzimas proporcionadas en el kit.

En la presente invención la sonda o los cebadores pueden estar situados en un soporte sólido, por ejemplo, pero sin limitarse, cristal, plástico, tubos, placas multipocillo, membranas, o cualquier otro soporte conocido.

15

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit del séptimo aspecto de la invención para determinar y/o cuantificar de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.

- 20 Un noveno aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit del séptimo aspecto de la invención para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.

- Una realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiera al  
25 uso donde el sujeto padece cáncer. Preferiblemente el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama. Más preferiblemente el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

- Otra realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiere al  
30 uso donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.

- Otra realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiere al  
35 uso donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

Los términos “secuencia de nucleótidos”, “secuencia nucleotídica”, “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos. Dichos nucleótidos pueden estar, o no,  
 5 química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la  
 10 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

Fig. 1 muestra el estado de metilación de cada posición CpG analizada en la isla CpG que engloba el promotor del gen *IGFBP-3* y su frecuencia de metilación en ADN tumoral o no neoplásico. Se indica codón de inicio de la transcripción (ATG) y caja TATA (TATA). A, ADN tumoral; B, ADN de tejido control no neoplásico. Las flechas muestran la ubicación de los cebadores y de la sonda de la invención que detecta sólo presencia de ADN metilado. Círculos negros: frecuencia de metilación alta, >30%;  
 20 círculos grises: frecuencia de metilación media, 15-30%; círculos blancos: frecuencia de metilación baja, 0-15%.

25

Fig. 2 representa las curvas cuantitativas estándar para los genes *IGFBP-3* (A) y  $\beta$ -actina (B) a partir de cuatro diluciones seriadas de ADN modificado por bisulfito (3ng-0,003ng). El producto amplificado se detecta de modo cuantitativo a través del uso de la sonda de la invención, que genera una señal de fluorescencia, que permite cuantificar los niveles del producto metilado amplificado por PCR para una región del  
 30 promotor de gen *IGFBP-3* y nos permiten la amplificación y por tanto la cuantificación de los niveles de ADN metilado que contiene la muestra que analicemos para el gen *IGFBP-3*, hasta una sensibilidad de 1 alelo metilado en un fondo de 10.000 alelos no metilados (sensibilidad 1:10.000). Los datos para cada muestra se normalizan con los obtenidos de la interpolación en la curva de  $\beta$ -actina. “aprox”, aproximado; “cel”

célula; CT, número de ciclo de corte del umbral (“cycle threshold”).

Fig. 3 curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado. Se muestra la linealidad esperada entre las curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado las curvas estándar para el gen de referencia  $\beta$ -actina, y la interpolación de los ADN control positivo (SW780 y HT29) (A) y control negativo (SKOV3 y PANC1) (B). A, interpolación de las líneas celulares controles positivas (SW780 y HT29) en las curvas respectivas para el gen *IGFBP-3* metilado y para  $\beta$ -actina como control endógeno no metilado, mientras que en (B) se observa como las líneas control negativas (SKOV3 de cáncer de mama y PANC1 de cáncer de páncreas), sólo interpolan en la curva para  $\beta$ -actina como control endógeno no metilado. Estos resultados confirman la especificidad de la metodología de la invención.

Fig. 4 comparación de la sensibilidad y la especificidad de la detección cuantitativa de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* mediante la sonda de la invención mediante QMSP frente a la tradicional MSP en una cohorte de muestras de pacientes con CPNM conservadas en parafina. Se muestra un ejemplo de un gel de la técnica MSP completo con controles positivos (IVD), negativos (C-) y agua, en el que se confirma que los pacientes 2, 4 y 23 están metilados, y que la metilación en los pacientes 15 y 27 no se detecta por esta técnica, mientras que por QMSP fuimos capaces de detectar presencia de metilación en estos pacientes.

Fig. 5 muestra los niveles de metilación de *IGFBP-3* en una segunda cohorte de 40 pacientes y diez muestras no neoplásicas, y las curvas Kaplan Meier de supervivencia global representada en días en pacientes con *IGFBP-3* no metilada sometidos a un tratamiento con quimioterapia o con quimioterapia-radioterapia. (A), Niveles de metilación de *IGFBP-3* en una segunda cohorte de 40 pacientes y diez muestras no neoplásicas, a través de los ratios *IGFBP-3/ACTB* NSCLC-M: muestras de cáncer de pulmón no microcítico consideradas metiladas para *IGFBP-3*; NSCLC-U: muestras de cáncer de pulmón no microcítico consideradas no metiladas para *IGFBP-3*. (B) Curvas de Kaplan Meier comparando el estado de metilación de *IGFBP-3* no metilado con supervivencia acumulada en días en 40 pacientes con CPNM sometidos a un tratamiento con quimioterapia o con el tratamiento combinado de quimioterapia-radioterapia. Censurados son los pacientes cuya supervivencia no se han podido

seguir más allá del tiempo indicado para la censura. “Radioterapia +” significa tratamiento con radioterapia; “Radioterapia -”, significa que no hay tratamiento con radioterapia.

## 5 EJEMPLOS

### **Ensayo cuantitativo de metilación:**

10 Para valorar el estado de metilación del gen *IGFBP-3* en cada muestra, se procedió en primer lugar a la modificación de la secuencia del ADN genómico a través del uso combinado de bisulfito sódico e hidroquinona. El ADN modificado se amplificó a través de una PCR a tiempo real basada en fluorescencia según protocolo descrito previamente (Harden SV *et al.* 2003 Clin Cancer Res 8:1370-5).

15 Los oligos que se utilizaron en la presente invención fueron descritos anteriormente (Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-1690). La utilización de estos oligos (también denominados “cebadores” en la presente invención) permite identificar la presencia de metilación en la zona promotora del gen *IGFBP-3* utilizando la técnica de PCR específica de metilación (MSP), que es una técnica semicuantitativa. Los cebadores son la pareja SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que detecta metilación; y la  
20 pareja SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que detecta ausencia de metilación.

La utilización de la sonda de la invención (SEQ ID NO: 7) permitió la cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*, mediante la técnica MSP cuantitativa (QMSP).

25 Se realizaron numerosos ensayos en un panel de 26 líneas celulares de cáncer humano, modificando el ADN, eliminando la presencia de citosinas no metiladas, y su sustitución por uracilos seguido de su amplificación y secuenciación del área de ADN comprendido entre ambos oligos, con la finalidad de identificar las posiciones de los nucleótidos CpG que más frecuentemente y de manera inalterada y constante se muestran metiladas cuando el gen está inactivado. De esta manera se pudo identificar  
30 la región específica de metilación para ADN modificado comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor del gen *IGFBP-3* y seleccionar el marcaje adecuado en los extremos 5´ y 3´, para producir una sonda que hiciera efectiva la técnica. El producto amplificado por esta técnica (denominada “QMSP-*IGFBP-3*”), se

detecta de modo cuantitativo a través del uso de la sonda específica de la presente invención (SEQ ID NO: 7), marcada con el fluorocromo FAM™, en su extremo 5' y con un "Minor Groove Binder" (MGB) sin fluorescencia (NFQ) en el extremo 3' (6FAM5'-CCGATATCGAAAAAACT-3'MGB-NFQ). Tras su unión, esta sonda generó una señal

5 de fluorescencia, que permitió cuantificar los niveles del producto metilado amplificado por PCR. La cuantificación del grado de metilación del gen *IGFBP-3* depende exclusivamente de la especificidad de la sonda de la invención y no de la técnica QMSP en sí misma. La técnica QMSP descrita en la presente invención para detectar la metilación del gen *IGFBP-3* se denominó "QMSP-*IGFBP-3*".

10 Por lo tanto, la técnica QMSP-*IGFBP-3* de la presente invención, se basa en la amplificación con fluorescencia de ADN modificado que permite cuantificar la metilación del promotor de *IGFBP-3* en muestras de ADN modificadas por bisulfito. Los niveles relativos de ADN con el promotor del gen *IGFBP-3* metilado ("niveles relativos de metilación") en cada muestra, se determinaron como un ratio entre los

15 valores obtenidos de la amplificación de la región seleccionada del promotor del gen *IGFBP-3* y los obtenidos de la amplificación del gen  $\beta$ -actina como referencia endógena. El ratio se multiplicó por 1000 para facilitar su tabulación (gen de interés/gen referencia x 1000), obteniéndose un cociente de metilación (MQ) que representa el nivel relativo de metilación de la muestra de estudio, tal como se ha

20 descrito para la valoración en otros genes (Eads CA *et al.* 2000 Nucleic Acid Res 28:E32; Eads CA *et al.* 1999 Cancer Res 59:2302-6).

En nuestro análisis de metilación, las amplificaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en el sistema *StepOnePlus™* de detección de amplicones de la casa

25 *Applied Biosystems* con un volumen final de 25  $\mu$ l en cada pocillo, conteniendo: 600 nM de cada cebador para la amplificación de ADN modificado y metilado para el gen *IGFBP-3*; 200 nM de sonda específica; *2X TaqMan Universal Master Mix II*, esta reacción contiene AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa, Uracil-N glycosilasa (UNG), dNTPs con dUTP y ROX™ como referente junto con un buffer optimizado, todo ello de

30 la casa *Applied Biosystems*; y ADN modificado, donde se utilizan 3 $\mu$ l de ADN tratado para cada reacción de QMSP. Las condiciones de la reacción de la QMSP fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C; 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C, en un volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de la MSP habían sido descritas anteriormente (Ibáñez de Cáceres I, *et al.* 2012



Oncogene 29:1681-1690).

Cada placa contenía las muestras tumorales, múltiples blancos con agua (NTCs) y controles positivos y negativos. El ADN de las líneas de cáncer humano SW780 (vejiga), HT29 (Colon) and 41MR (ovario), se usó como control positivo, ya que estas líneas presentan metilación en el promotor del gen *IGFBP-3*. Diluciones seriadas de un “pool” de estos ADNs modificados, en un rango desde 30 ng/μl a 0,003ng/μl, sirvió como control para las curvas estándar de β-actina e *IGFBP-3* en cada palca utilizada para cada ensayo.

10

En cada ensayo se determinó la sensibilidad y especificidad para un rango de valores de “threshold” en ambas curvas estándar, seleccionándose un “threshold” ideal que diferenciaría los casos verdaderos positivos (independientemente de los niveles de metilación que presentase cada muestra) de los verdaderos negativos. Todos los casos verdaderos negativos en la tecnología que presentamos se validaron como negativos por las técnicas de secuenciación por bisulfito (BS) y/o PCR de metilación específica (MSP), lo que correspondería con una especificidad del 100%.

Considerándose positiva una muestra para metilación cuando el valor de MQ es mayor de 1. Este valor se obtiene para promotor del gen *IGFBP-3* metilado en cada muestra, determinado como un ratio entre los valores obtenidos de la amplificación de la región seleccionada del promotor del gen *IGFBP-3* y los obtenidos de la amplificación del gen B-actina como referencia endógena. El ratio se multiplica por 1000 para facilitar su tabulación (gen de interés/gen referencia x 1000), obteniéndose un cociente de metilación (MQ) que representa el nivel relativo de metilación de la muestra de estudio, tal como se ha descrito para la valoración en otros genes como MGMT, APC, MLH1, p16 (Durr ML, *et al.* PLoS One 2010 May 26;5(5):e10828).

### Resultados

El diseño de los cebadores y sonda de la presente invención son específicos para la región del promotor de gen *IGFBP-3* comprendida entre las posiciones -584 y -492, incluyendo ambas posiciones, y permiten la amplificación y por tanto la cuantificación de los niveles de ADN metilado que contiene la muestra que analicemos para el gen *IGFBP-3*, hasta una sensibilidad de 1 alelo metilado en un fondo de 10.000 alelos no

metilados (sensibilidad 1:10.000) (figura 1). Las curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado cumplen la linealidad y el paralelismo esperados con las curvas estándar para el gen de referencia  $\beta$ -actina. Mostramos como ejemplo ambas curvas obtenidas en el mismo proceso experimental, en la figura 2.

5

Se testó la nueva metodología en las líneas de cáncer humano que nos sirvieron como control ya que fueron las utilizadas para la identificación de la sonda, y cuyo estado de metilación para el gen *IGFBP-3* fue testado tanto por la técnica de secuenciación por bisulfito como por la técnica de PCR de metilación específica (MSP). En la figura 3 se puede observar en el panel izquierdo, la clara interpolación de las líneas celulares controles positivos (SW780 y HT29) en las curvas respectivas para el gen *IGFBP-3* metilado y para  $\beta$ -actina como control endógeno no metilado, mientras que el panel derecho se observa como las líneas control negativas (SKOV3 de cáncer de mama y PANC1 de cáncer de páncreas), sólo interpolan en la curva para  $\beta$ -actina como control endógeno no metilado. Estos resultados confirman la especificidad de la metodología que presentamos en esta invención (Figura 3).

Posteriormente se comparó la sensibilidad y la especificidad de esta nueva tecnología QMSP-*IGFBP-3* frente a la tradicional MSP en dos series de muestras de pacientes con CPNM conservadas en parafina. En la primera cohorte de pacientes se comprobó la especificidad de la técnica que presentamos (QMSP-*IGFBP-3*), comparándola con la tradicional MSP (descrita en Ibáñez de Cáceres I. *et al.* 2010 *Oncogene* 29:1681-1690). En 28 de 32 pacientes con CPNM extirpados en el Hospital Universitario La Paz, encontramos el mismo estado de metilación del gen *IGFBP-3* utilizando ambas técnicas, y los restantes 4 pacientes fueron rescatados, ya que con la técnica tradicional MSP no se encontró presencia de metilación, siendo en su momento identificadas como muestras no metiladas, mientras que la utilización de la sonda de la invención permitió identificar la presencia de un grado moderado de metilación en estas 4 muestras de pacientes, ya que la sensibilidad se incrementa en un orden de magnitud (tabla 1, con asterisco). Esta técnica además incorpora valores de grado de metilación, ya que es una valoración cuantitativa, lo que permite estudios de correlaciones con variable continua, aumentando su valor estadístico. En la Figura 4, mostramos a modo de ejemplo un gel de la técnica MSP completo con controles positivos (IVD), negativos (C-) y agua, en el que se confirma que los pacientes 2, 4 y

23 están metilados, y que la metilación en los pacientes 15 y 27 no se detecta por esta técnica, mientras que por QMSP con la sonda de la invención fuimos capaces de detectar presencia de metilación en estos pacientes.

- 5 Tabla 1. Se muestra en tejido de pacientes los resultados obtenidos para la MSP y para la qMSP de la presente invención.

<b>Muestra</b>	<b>Anatomía Patológica</b>	<b>TNM</b>	<b>Estadio</b>	<b>MSP</b>	<b>qMSP(RQ nivel relativo de metilación)</b>
1	Célula grande	T2N1	2B	<b>M</b>	<b>M (0,55)</b>
2	Epidermoide	T2N0	1B	<b>M</b>	<b>M (0,15)</b>
3	Epidermoide	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>* M (12,95)</b>
4	Epidermoide	T3N0M0	2B	<b>M</b>	<b>M (10,84)</b>
5	Epidermoide	T2N0M0	1B	<b>M</b>	<b>M (3,9)</b>
6	Adenocarcinoma	T1N0M0	1A	<b>U</b>	<b>U</b>
7	Epidermoide	T1N0M0	1A	<b>U</b>	<b>U</b>
8	Epidermoide	T2N0	1B	<b>M</b>	<b>M (0,22)</b>
9	Célula grande	T1N0M0	1A	<b>M</b>	<b>M (0,046)</b>
10	Adenocarcinoma	Desconocido	Desconocido	<b>M</b>	<b>M (11,3)</b>
11	Adenocarcinoma	T2N0M0	1B	<b>M</b>	<b>M (0,30)</b>
12	Adenocarcinoma	T1N0M0	1B	<b>M</b>	<b>M (0,2)</b>
13	Epidermoide	T2N0M0	1B	<b>U</b>	<b>U</b>
14	Epidermoide	T2N0	1B	<b>M</b>	<b>M (54,9)</b>
15	Adenocarcinoma	T2N0	1B	<b>U</b>	<b>* M (0,14)</b>
16	Epidermoide	T2N0M0	1B	<b>U</b>	<b>U</b>
17	Adenocarcinoma	T2N0M0	1B	<b>U</b>	<b>U</b>
18	Adenocarcinoma	T3N0	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
19	Epidermoide	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>* M (2,6)</b>
20	Epidermoide	T2N0	1B	<b>U</b>	<b>U</b>
21	Epidermoide	T3N0	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
22	Epidermoide	T2N2	3A	<b>U</b>	<b>U</b>
23	Epidermoide	T2N0	1B	<b>M</b>	<b>M (4,9)</b>
24	Epidermoide	Desconocido	Desconocido	<b>U</b>	<b>U</b>
25	Epidermoide	T3N0	2A	<b>M</b>	<b>M (91,6)</b>
26	Epidermoide	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
27	Epidermoide	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>* M (0,7)</b>
28	Adenocarcinoma	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
29	Célula grande	T2N0	1B	<b>U</b>	<b>U</b>
30	Epidermoide	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
31	Adenocarcinoma	T2N1	2B	<b>U</b>	<b>U</b>
32	Epidermoide	T1N0	1A	<b>U</b>	<b>U</b>

TNM, clasificación del cáncer de pulmón. "RQ", cuantificación relativa; U, no metilado; M, metilado.

Así mismo hemos comprobado en una segunda serie confirmativa de 40 piezas  
5 tumorales embebidas en parafina de pacientes con CPNM extirpados en el Hospital  
del Mar de Barcelona, la sensibilidad de la técnica para identificar presencia y grado  
de metilación y comprobar en primer lugar si el rango de valores es similar al obtenido  
en la primera cohorte. La totalidad de los pacientes interpolaron en la curva del control  
endógeno no metilado  $\beta$ -actina, lo que garantiza la presencia de ADN modificado  
10 objeto de estudio mientras que 21 pacientes de los 40 interpolaron también en la curva  
para el gen *IGFBP-3* metilado, resultando en la obtención de valores relativos de la  
presencia de DNA metilado para el gen *IGFBP-3* de diferente grado de metilación  
(reflejado en el valor entre paréntesis y denominado "nivel relativo de metilación"), con  
valores aproximados de cociente de metilación (MQ) comprendidos entre 0,01 y 100  
15 (Figura 5A). Los valores obtenidos de MQ concuerdan en grado con los obtenidos en  
la cohorte inicial del H U La Paz (Figura 4 y tabla 1). En segundo lugar se ha  
demostrado que la ausencia de metilación del promotor del gen *IGFBP-3* es indicativa  
de que el tratamiento a administrar es quimioterapia con cisplatino, en vez de la  
terapia combinada con quimio-radioterapia (Figura 5B), por lo que los pacientes con  
20 ausencia de metilación no deberían recibir radioterapia, ya que la supervivencia global  
en los pacientes con *IGFBP-3* no metilado que reciben sólo quimioterapia es superior  
a los que reciben tratamiento combinado con quimioterapia y radioterapia.

La técnica es por tanto, capaz de identificar la presencia de ADN metilado en un  
25 amplio rango (Figura 5A). Estos resultados satisfacen una necesidad existente y no  
resuelta hasta la fecha en la práctica clínica, que es identificar qué pacientes son los  
que presenta alta probabilidad de respuesta a un tratamiento con radioterapia  
combinada con quimioterapia basada en derivados del platino, como cisplatino,  
carboplatino, oxaliplatino, sartraplatino, etc .

30

**REIVINDICACIONES**

1. Método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*.  
5
2. Método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece cáncer que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en el que la presencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.  
10
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se realiza en la región del promotor comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor ambas inclusive.  
15
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la detección y/o la cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en las posiciones -532 y -526 del promotor.  
20
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa.  
25
6. Método la reivindicación 5 donde la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.  
30
7. Método según la reivindicación 6 donde la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 donde además se emplea una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.  
35

9. Método según la reivindicación 8 donde la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
- 5 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 donde la sonda comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo.
11. Método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- 10 a. aislamiento de ácido desoxirribonucleico en una muestra biológica aislada de un sujeto;
- b. modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico;
- c. hibridación con cebadores específicos;
- 15 d. amplificación de una secuencia comprendida entre los cebadores descritos en el paso (c);
- e. detección de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- f. comparar la metilación del paso (d) con niveles estándar;
- g. encontrar diferencias significativas en la comparación del paso (f);
- 20 h. asociar las diferencias significativas del paso (g) a una metilación o desmetilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- i. asociar la presencia de metilación del paso (h) a una respuesta favorable al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino; o asociar la desmetilación del paso (h) a una respuesta a
- 25 tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino desfavorable.
12. Método según la reivindicación 11, donde los cebadores del paso (c) son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID
- 30 NO: 6.
13. Método según la reivindicación 12, donde los cebadores del paso (c) son SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde además en el paso (c) se incluye una sonda y en el paso (e) se cuantifica la metilación.
15. Método según la reivindicación 14 donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
16. Método según la reivindicación 15 donde la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el sujeto padece cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama.
18. Método según la reivindicación 17, donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.
21. Sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
22. Sonda de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
23. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22 que además comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo.
24. Uso *in vitro* de una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 para la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.

25. Uso *in vitro* de una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 para determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento de radioterapia combinado con quimioterapia basada en cisplatino.
- 5 26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25 donde el sujeto padece cáncer.
27. Uso según la reivindicación 26 donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama
- 10 28. Uso según la reivindicación 27 donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.
29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28 donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.
- 15 30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29 donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.
- 20 31. Kit que comprende una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23
32. Kit según la reivindicación 31 que además comprende cebadores.
- 25 33. Kit según la reivindicación 32, donde los cebadores son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
34. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 para determinar y/o cuantificar de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.
- 30 35. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 34 para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.



36. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 o 35 donde el sujeto padece cáncer.
- 5 37. Uso según la reivindicación 36 donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama
38. Uso según la reivindicación 37 donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

Figura 1 A

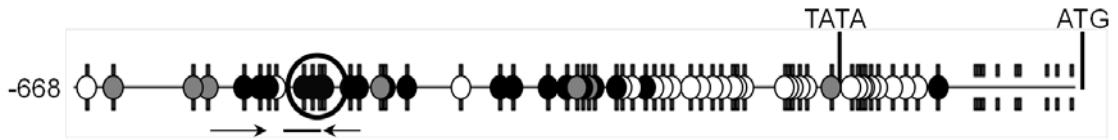


Figura 1 B

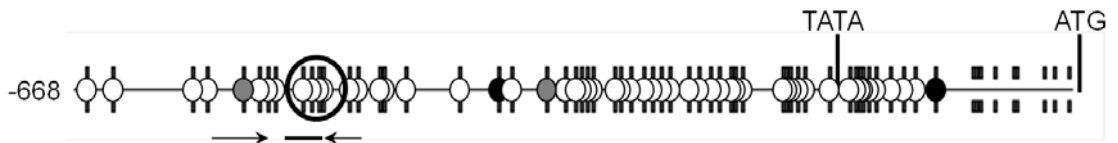


Figura 2 A

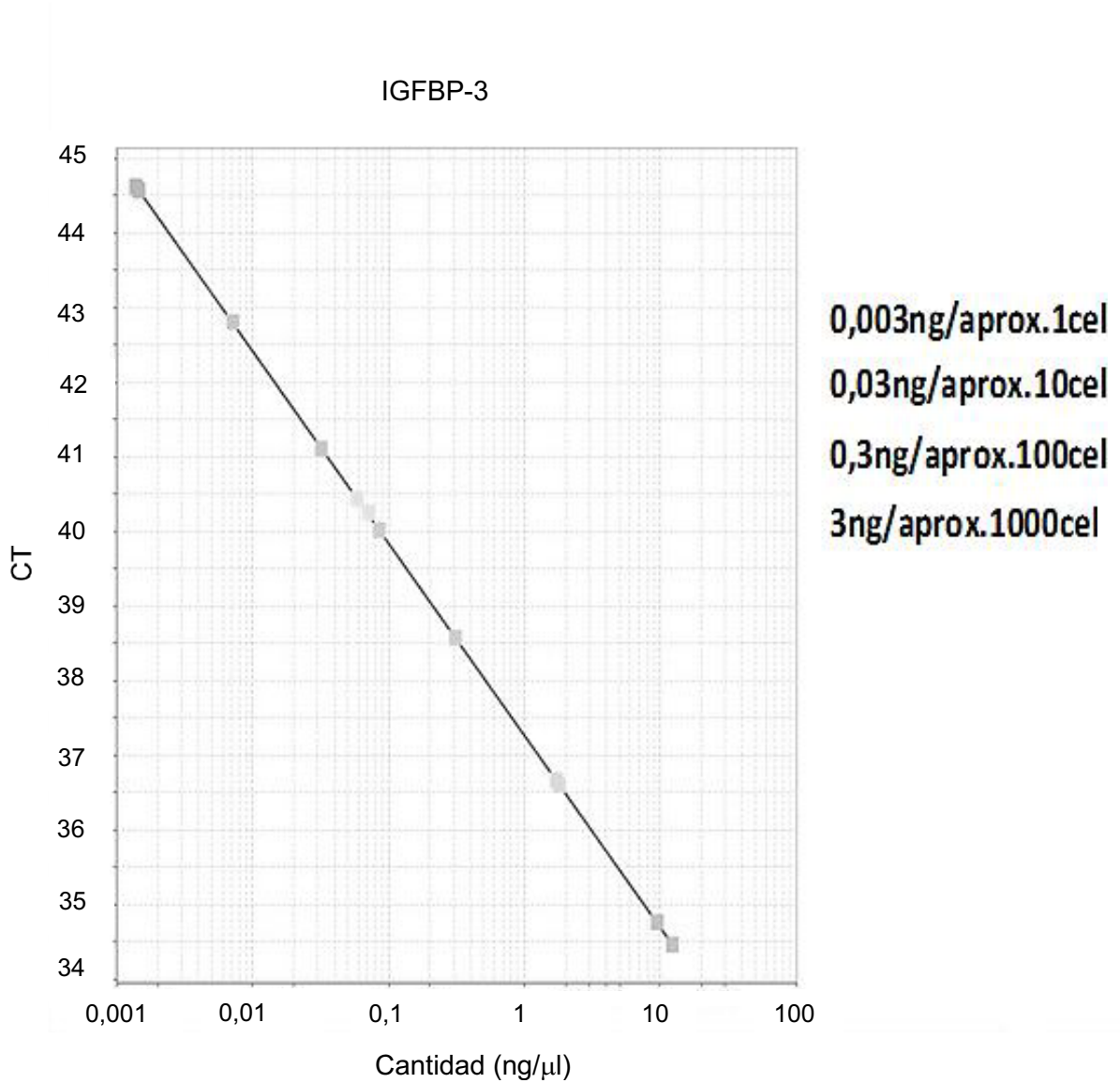


Figura 2 B

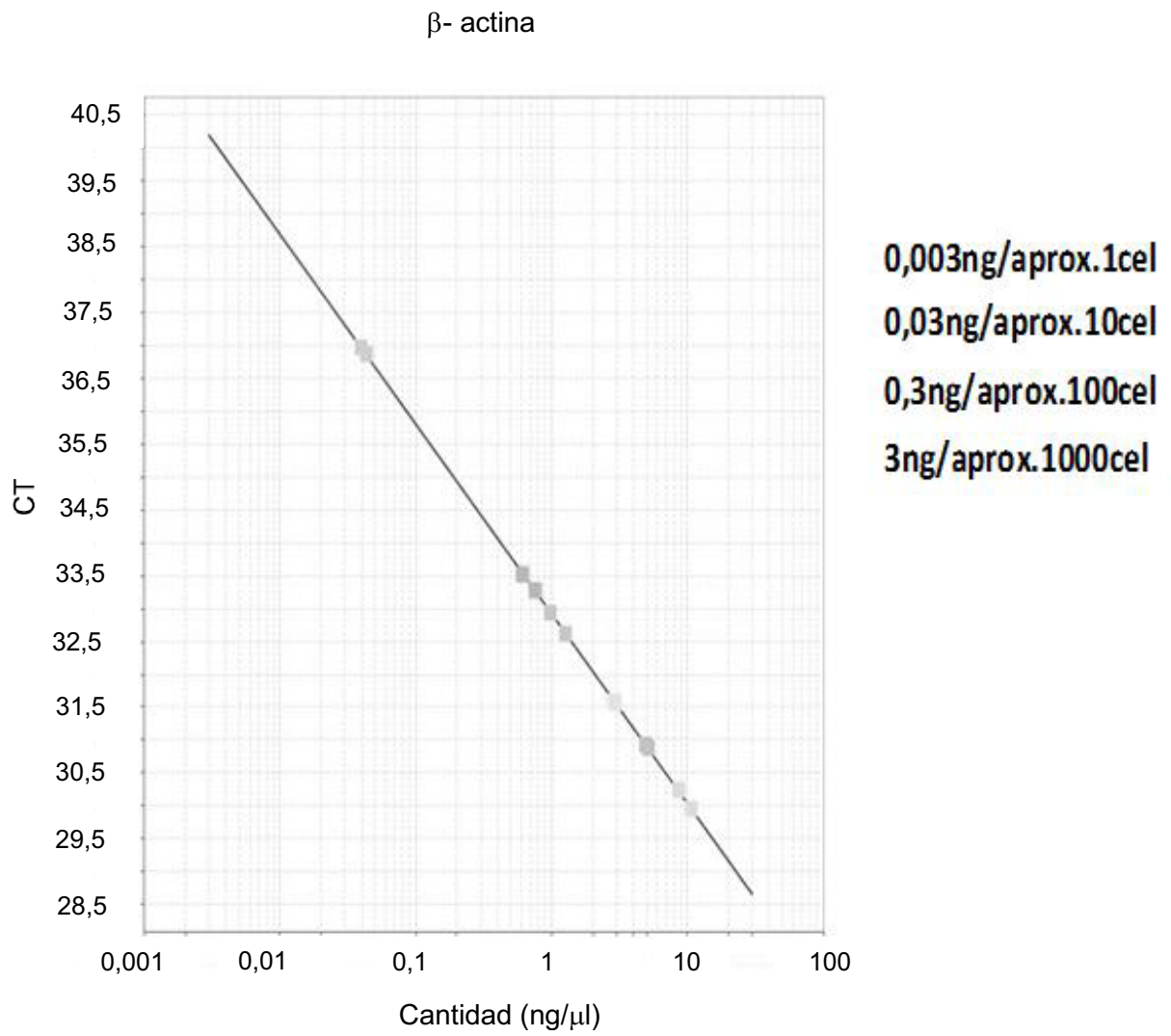


Figura 3 A

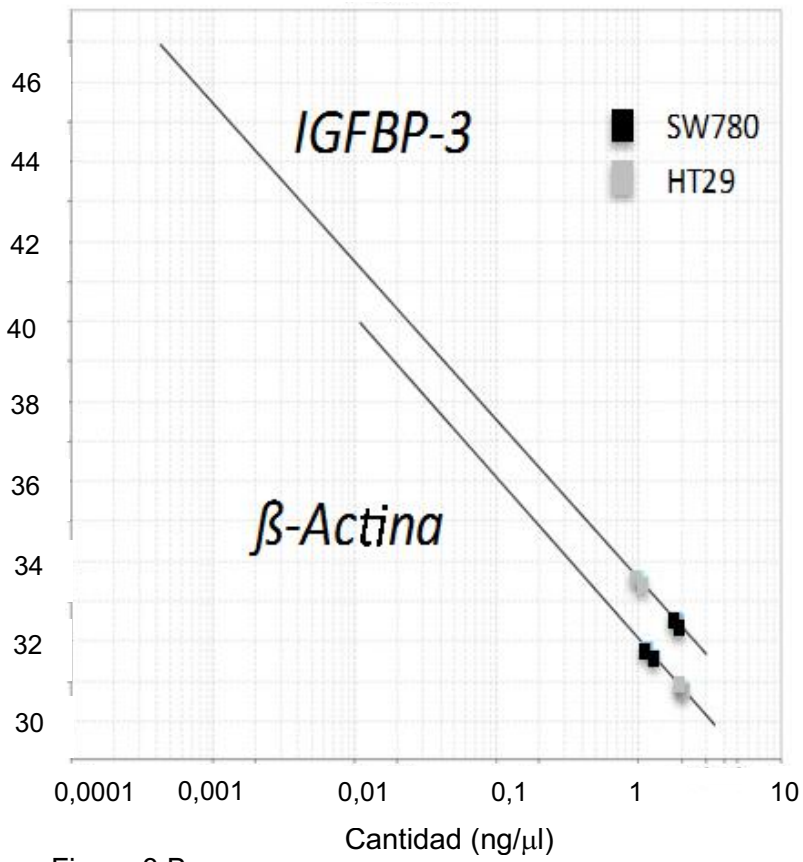


Figura 3 B

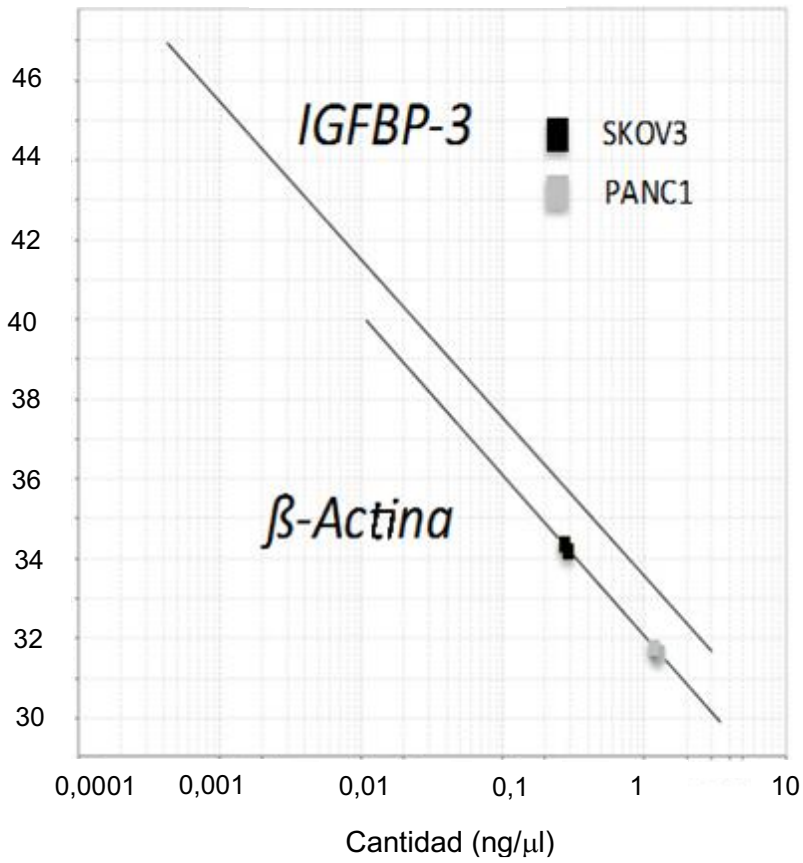


Figura 4

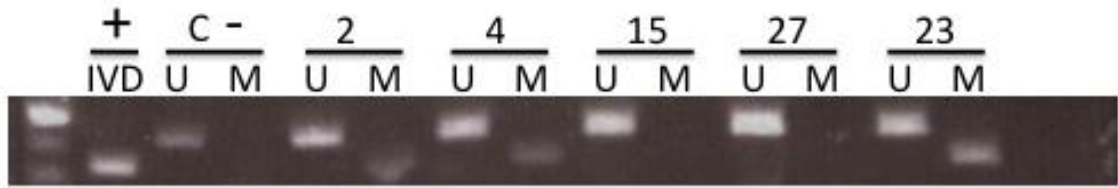


Figura 5 A

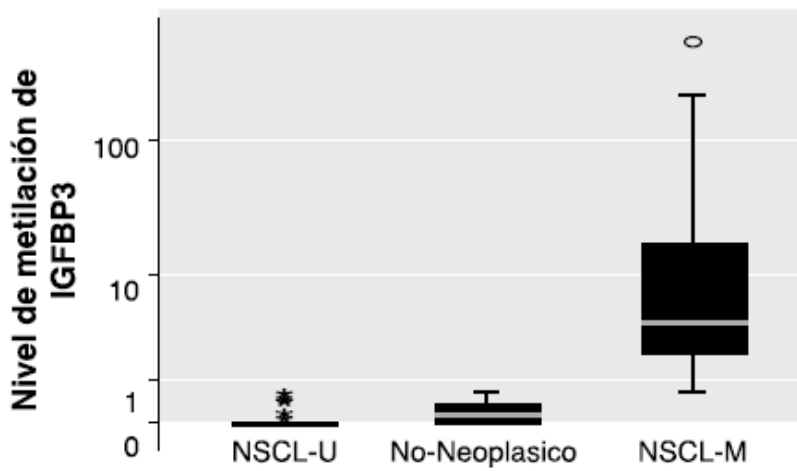
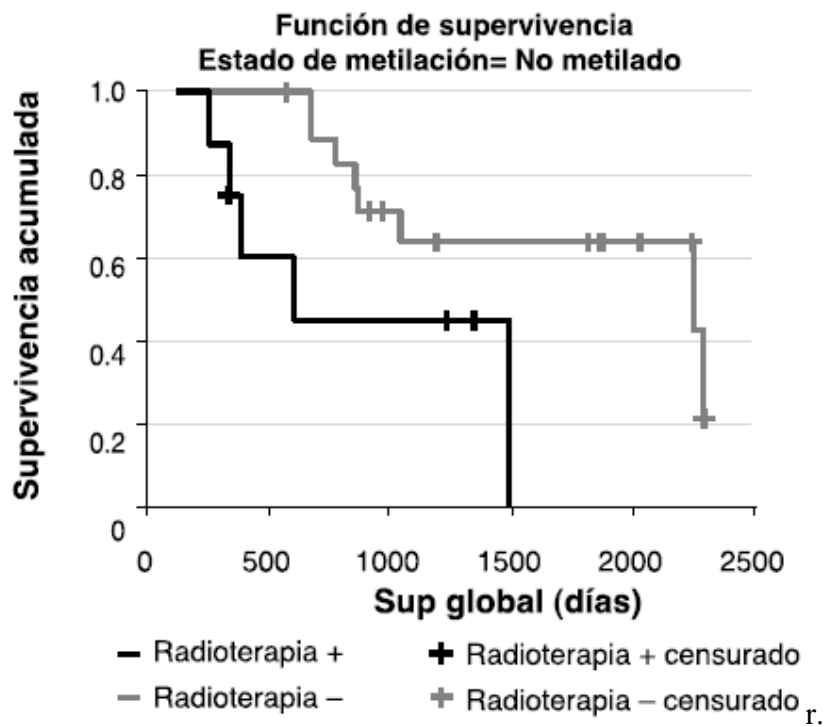


Figura 5 B



# ES 2 527 724 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital  
 Universitario La Paz  
 Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
 Universidad Autónoma de Madrid  
 Fundación Hospital de Madrid

<120> Método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia  
 combinada con quimioterapia basada en cisplatino

<130> ES1660.13

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 688  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 1

agcccagcgg gtgtaaatta aacccccgag tgccttggtc ccctgagacc caaatgtaag	60
tcagaaatgt cccaagactt cgcctgcca cggaaataa ttttagaaag ctccacgagg	120
tacacacgaa tgcggagcgc tgtatgccag tttccccgac accggctcgc cgcagggaga	180
cctcaccgag agagcggag gggtaaaggg ggcgggggtca aggagatcgg ggggtgctgag	240
ttggccagga gtgactgggg tgaccggggg tgctgaggtg gcctggagtg ccgggggtggc	300
cgggcacacc ttggttcttg tagacgaaa ggtgaccgag gctccggggc tgcgcacgag	360
gagcaggtgc ccgggcgagt ctcgagctgc acgccccga gctcggcccc ggctgctcag	420
ggcgaagcac gggccccgc agccgtgcct gcgccgacc gccccctcc caacccccac	480
tcctgggagc gccgttccgg ggcgtgtcct gggccacccc ggcttctata tagcggccgg	540
cgcgcccggg ccgcccagat gcgagcactg cggctggggc ctgaggatca gccgcttctc	600
gcctggattc cacagcttcg cgccgtgtac tgtcgcccca tcctgcgcg cccagcctgc	660
caagcagcgt gccccggttg caggcgtc	688

<210> 2  
 <211> 92  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

agaaagctcc acgaggtaca cacgaatgcg gagcgtgta tgccagtttc cccgacaccg	60
gctcgccgca gggagacctc accccgagag cg	92

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sentido para la detección del gen IGF3P3 metilado

<400> 3 ttttacgagg tatatacgaa tgc	23
<210> 4 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador antisentido para la detección del gen IGFBP3 metilado	
<400> 4 tctcgaata aaatctcct acg	23
<210> 5 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador sentido para la detección del gen IGFBP3 no metilado	
<400> 5 agaaagtttt atgaggtata tatga	25
<210> 6 <211> 23 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> Cebador antisentido para la detección del gen IGFBP3 no metilado	
<400> 6 cactctcaaa ataaaatctc cct	23
<210> 7 <211> 17 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
<220> <223> sonda para detección de la metilación del gen IGFBP-3	
<400> 7 ccgatatcga aaaaact	17