

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 979**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08783436 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2198296**

54 Título: **Método de uso de la integridad de ARN tumoral para medir la respuesta a quimioterapia en pacientes con cáncer**

30 Prioridad:

05.09.2007 US 935874 P

06.09.2007 US 935903 P

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

01.03.2016

73 Titular/es:

**LAURENTIAN UNIVERSITY (100.0%)
935 RAMSEY LAKE ROAD
SUDBURY, ONTARIO P3E 2C6, CA**

72 Inventor/es:

**PARISSENTI, AMADEO, MARK y
GUO, BAOQING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 561 979 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 uso de la integridad de ARN tumoral para medir la respuesta a quimioterapia en pacientes con cáncer

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de determinación de la respuesta de tumores a quimioterapia al comparar la integridad del ARN de células tumorales antes, durante y después de la quimioterapia.

Antecedentes de la invención

Cáncer es el crecimiento maligno no controlado de células. En un proceso llamado "metástasis", las células cancerosas pueden extenderse desde su sitio de origen a sitios distantes dentro del cuerpo, a través de sistemas linfáticos y/o circulatorios. La metástasis es la causa principal de muerte en seres humanos con cáncer (Bockhom, M. et al., *Lancet Oncol.* 8 (2007) 444- 448).

Existe una cantidad de tratamientos que se usan para tratar o controlar el cáncer, que incluyen cirugía, terapia de radiación y quimioterapia. La cirugía y la terapia de radiación se usan típicamente para remover tumores cancerosos no metastásicos (crecimientos anormales compuestos de células cancerosas). Sin embargo, la presencia de cáncer metastásico necesita el uso de regímenes de quimioterapia sistémica para combatir el crecimiento de tumores primarios (antes o después de una cirugía) y tumores secundarios a través del cuerpo. En el cáncer de mama, los agentes de quimioterapia sistémica eficaz incluyen las antraciclinas (típicamente doxorubicina o epirubicina), los taxanos (paclitaxel o docetaxel), análogos de nucleósidos (5-fluorouracilo) y agentes alquilantes (ciclofosfamida) (Parissenti, A.M. et al. *Anticancer Drugs* 18 (2007) 499-523).

Las antraciclinas interrumpen el desenrollado de ADN por parte de la topoisomerasa II ("topo II"), se intercalan entre cadenas de ADN y provocan daños en el ADN, interfiriendo de ese modo con la replicación de ADN en células tumorales que se dividen rápidamente. Los taxanos, por otra parte, bloquean la despolimerización de microtúbulos, lo que produce una detención del ciclo celular en la mitosis y la posterior inducción de apoptosis (Distefano, M. et al., *Int. J. Cancer* 72 (1997) 844-850; Moos, P.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (1998) 3896-3901). El análogo de nucleósido 5-fluorouracilo bloquea la conversión de dUMP en dTMP, mientras que el agente alquilante ciclofosfamida forma enlaces covalentes con ADN (Parker, W.B. et al., *Pharmacol Ther.* 48 (1990) 381-395; Bignold, L.P., *Anticancer Res.* 26 (2006) 1327-1336). Estos dos últimos fármacos interrumpen la replicación de ADN en células que se dividen rápidamente en la fase S (Zijlstra, J.G. et al. *Oncol. Tumor Pharmacother.* 7 (1990) 11-18; Richardson, D.S. et al., *Blood Rev.* 11 (1997) 201-223; Capranico, G. et al., *Chem. Biol. Interact.* 72 (1989) 113-123; Chazard, M. et al., *Bull. Cancer* 81 (1994) 173-181).

La mayoría de los fármacos que se usan en quimioterapia son altamente citotóxicos y destruyen tanto células normales sanas (particularmente si estas se están dividiendo rápidamente) como células cancerosas. Como tales, los fármacos quimioterapéuticos provocan efectos secundarios importantes, tales como inmunosupresión, náuseas y vómitos, y cardiotoxicidad. Estos efectos secundarios pueden tener un efecto negativo importante en la calidad de vida del paciente.

La respuesta del tumor a los agentes quimioterapéuticos puede variar considerablemente de un paciente a otro, debido a la presencia de mecanismos de resistencia a fármacos en algunos pacientes que bloquean la eficacia de los fármacos. La resistencia a los fármacos puede ser "intrínseca" (es decir, existir previamente en el tumor) o "adquirida" a través de la exposición continua a agentes quimioterapéuticos. Se ha identificado una cantidad de mecanismos que desempeñan una función en la capacidad de respuesta reducida de células tumorales a agentes quimioterapéuticos *in vitro*. En el caso de las antraciclinas y los taxanos, estos incluyen la sobreexpresión de transportadores de fármacos (p. ej., P-glicoproteína) y la proteína de resistencia a múltiples fármacos, la regulación por disminución de topoisomerasa II α , mutaciones en la proteína reguladora del ciclo celular p53, la mayor síntesis de la timidilato sintasa o la enzima conjugadora de fármacos glutatión-S-transferasa y la acumulación de mutaciones en genes que codifican las cadenas α o β de tubulina (Juliano, R.L. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 455 (1976) 152-162; Beck, W.T. et al. *Cancer Res.* 39 (1979) 2070-2076.; Cole, S.P. et al., *Science* 258 (1992) 1650-1654; Fry, A.M. et al., *Cancer Res.* 51 (1991) 6592-6595; Giaccone, G. et al. *Cancer Res.* 52 (1992) 1666-1674; Balcer-Kubiczek, E.K. et al. *Radiat. Res.* 142 (1995) 256-262; Aas, T. et al., *Nat. Med.* 2 (1996) 811-814; Batist, G. et al., *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 15544-15549; Batist, G. et al., *Biochem. Pharmacol.* 35 (1986) 2257-2259; Harris, A.L. et al., *Acta Oncol.* 31 (1992) 205-213; Cabral, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 78 (1981) 4388-4391; Schibler, M.J. et al., *J. Cell Biol.* 113 (1991) 605-614).

Recientemente, algunos enfoques de determinación de perfiles de genomas han proporcionado un conocimiento importante de los genes y mecanismos asociados con la adquisición de resistencia a fármacos en células de tumores de mama. (Parissenti, A.M. et al., *Anticancer Drugs* 18 (2007) 499-523; Villeneuve, D.J. et al., *Breast Cancer Res. Tratamiento.* 96 (2006) 17-39).

La presencia de múltiples y variados mecanismos de resistencia intrínseca o adquirida a fármacos vuelve muy difícil identificar cuáles pacientes responderán a un régimen de quimioterapia determinado y si esta respuesta se mantendrá a lo largo del tratamiento. En los pacientes, un tumor sensible puede revertirse o achicarse durante la

quimioterapia y continuar revirtiéndose luego de la quimioterapia. En otros pacientes, un tumor resistente puede no responder a la quimioterapia a la mitad y después del tratamiento. Finalmente, un tumor puede revertirse durante la quimioterapia en algunos pacientes, pero volver a su estado original (o continuar creciendo) una vez completada la quimioterapia.

- 5 Sería muy beneficioso poder determinar el nivel de capacidad de respuesta del tumor a determinado agente o fármaco quimioterapéutico antes de la administración o en las primeras instancias después de la administración del fármaco. Por ejemplo, solamente 33 % y 35,4 % de los pacientes con cáncer de mama responden al paclitaxel y docetaxel después de la quimioterapia a base de antraciclinas, respectivamente (Seidman, A.D. et al., *J Clin. Oncol.* 13 (1995) 1152-1159; Ando, M. et al., *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 336-342). Sin embargo, aún no se han identificado
 10 los biomarcadores capaces de distinguir entre los tumores sensibles a la quimioterapia y los resistentes a la quimioterapia en pacientes con cáncer. De esta manera, para los pacientes con cáncer que reciben regímenes de quimioterapia que involucran agentes citotóxicos, no existe un método actual para determinar si un tumor responde a la quimioterapia a la mitad del tratamiento o si la viabilidad del/de los tumor/es ha sido erradicada después del
 15 tratamiento. En consecuencia, los pacientes con cáncer experimentan los efectos secundarios negativos graves de tomar fármacos citotóxicos, sin saber si sus tumores responden, de hecho, a estos agentes.

Por consiguiente, se necesita un método para evaluar con rapidez y precisión el nivel de la capacidad de respuesta de los tumores a fármacos quimioterapéuticos particulares (y combinaciones de los mismos), con el fin de adaptar un régimen específico más adecuado para las necesidades de un paciente. Existe una necesidad adicional de indicadores de sensibilidad o resistencia para fármacos quimioterapéuticos.

- 20 Balatsos et al. (2001; *J.Exp. Clin. Cancer Res.* vol. 20 p63-69) describe que el tratamiento *in vitro* de células de linfoma con interferón y 5-fluorouracilo produce apoptosis celular. Ogston et al. (2003; *The Breast* vol. 12 p320-327) describe un método de determinación de la respuesta del cáncer de mama a la quimioterapia mediante la medición de la celularidad tumoral antes y después del tratamiento. Carey et al. (1999; *J. Clin. Oncol* voi. 17 p 3075-3081) describe que determinar la estabilidad del ARN es una manera de medir la celularidad tumoral.

25 **Compendio de la invención**

De acuerdo con la invención, se proporciona un método de determinación de la capacidad de respuesta de tumores a un agente quimioterapéutico en una muestra que comprende ARN de células tumorales, obtenida de un paciente con un tumor canceroso después de que el paciente ha recibido una o más dosis del agente quimioterapéutico, que comprende determinar la integridad del ARN evaluada mediante la degradación de la muestra y comparar la
 30 integridad del ARN de la muestra con un punto en el tiempo antes de la administración de la o las dosis del agente quimioterapéutico;

en donde una disminución en la integridad del ARN a lo largo del tiempo indica que el tumor responde al agente quimioterapéutico y una integridad alta del ARN de la muestra, en donde el ARN extraído presenta una degradación escasa o nula, indica que el tumor es resistente al agente quimioterapéutico.

- 35 En una realización de la invención, la integridad del ARN se determina como una relación de los valores de intensidad de ARNr 28S y 18S, en donde dicha relación se obtiene mediante electroforesis en gel del ARN extraído, la tinción con bromuro de etidio de dicho gel y el cálculo de dicha relación de intensidades de ARNr 28S y 18S visualizadas con luz ultravioleta.

- 40 En otra realización de la invención, la integridad del ARN se determina mediante la electroforesis capilar del ARN extraído y la cuantificación de los diversos ARN separados en la electroforesis. Preferiblemente, la integridad del ARN se cuantifica como un número de integridad de ARN (RIN), en donde el RIN se calcula mediante una evaluación algorítmica de las cantidades de diversos ARN presentes dentro del ARN extraído.

- 45 Se puede administrar más de un agente quimioterapéutico al paciente. El agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos de antraciclinas y taxanos. Preferiblemente, los agentes quimioterapéuticos comprenden una antraciclina y un taxano. En una realización de la invención, se usa epirrubicina y docetaxel en el régimen de quimioterapia.

- 50 En incluso otra realización preferida, el ARN se extrae de una o más biopsias con aguja gruesa de un tumor del paciente. Preferiblemente, la biopsia con aguja gruesa se obtiene a través de medios guiados por imágenes tales como la tomografía computarizada (TC), rayos X, ultrasonido e imagenología por resonancia magnética (IRM). Luego se determina la calidad del ARN a partir de la o las biopsias con aguja gruesa de dicho tumor.

En otra realización de la invención, la magnitud de reducción en la integridad del ARN es proporcional a la capacidad de respuesta del tumor, en donde la capacidad de respuesta del tumor puede evaluarse mediante una disminución correspondiente en la celularidad y/o extensión del tumor y la respuesta clínica del paciente.

- 55 En otra realización de la invención, un paciente con un RIN posterior al tratamiento de 3 o menos se identifica como que responde al/a los agentes quimioterapéutico/s y un paciente con un RIN posterior al tratamiento de 3 o más se identifica como que no responde al/a los agente/s quimioterapéutico/s.

Una ventaja de la presente invención es que la integridad del ARN del tumor, cuantificada como un número de integridad de ARN (RIN) es un biomarcador al que se accede fácilmente de la capacidad de respuesta del tumor a un régimen de quimioterapia particular que involucra uno o más agentes quimioterapéuticos.

5 Los métodos que se conocen actualmente para determinar la capacidad de respuesta de los tumores, que generalmente requieren la interpretación visual de fotomicrografías de secciones fijas y teñidas de biopsias con aguja gruesa por parte de un operador humano tal como un patólogo. Esos métodos dependen de la interpretación subjetiva por parte del operador, la cual puede variar de una persona a otra. Esos métodos también son susceptibles a errores humanos. La evaluación del RIN de los tumores proporcionan una ventaja significativa con respecto a métodos conocidos en la actualidad de evaluación de la capacidad de respuesta de tumores a un régimen de quimioterapia determinado, dado que el RIN de los tumores es un biomarcador cuantitativo de la capacidad de respuesta de los tumores preciso y reproducible.

10 Otra ventaja de la presente invención es que la evaluación del RIN de los tumores puede ser llevada a cabo por medios automatizados. Los medios automatizados pueden involucrar análisis de alto rendimiento, lo que permite una rápida evaluación del RIN de los tumores. La rápida evaluación del RIN de los tumores permite de esta manera una evaluación rápida y precisa del nivel de la capacidad de respuesta del tumor de un paciente a un régimen de quimioterapia determinado.

Otra ventaja de la presente invención es que el valor de RIN de las células tumorales puede correlacionarse con el nivel de dosificación del agente quimioterapéutico, permitiendo de esta manera la adaptación de un régimen de quimioterapia a las necesidades o el nivel de capacidad de respuesta de un paciente.

20 Ventajas y características distintas y adicionales de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada de una realización de la misma, en conjunto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se comprenderá además a partir de la descripción detallada de una realización de la invención, con referencia a los dibujos en los que:

25 la Figura 1 es una serie de electroferogramas representativos de preparaciones de ARN tumoral luego de la electroforesis capilar, que demuestran la relación entre los valores de la integridad del ARN tumoral (RIN) y la calidad del ARN;

la Figura 2 es un gráfico de valores de la integridad de ARN tumoral (RIN) según el nivel de dosis para 50 pacientes MA.22 antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel.

30 la Figura 3 es una serie de electroferogramas que muestran patrones típicos de cambio en perfiles de ARN tumoral para pacientes MA.22 antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel.

la Figura 4 es una serie de histogramas que muestran patrones típicos de cambio en valores de RIN de tumores para pacientes MA.22 antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel.

35 la Figura 5 ilustra fotomicrografías de secciones teñidas con hematoxilina/eosina de biopsias con aguja gruesa guiadas por imágenes de pacientes MA.22 representativos antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel; y

la Figura 6 ilustra la relación entre la respuesta patológica completa (pCR) (líneas discontinuas) y los valores de RIN de tumores máximos para 50 pacientes MA.22 en diversos niveles de dosis de fármacos, antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel.

40 Descripción detallada de las realizaciones

Los ácidos ribonucleídos (ARN) desempeñan una cantidad de funciones esenciales en la traducción de información genética en proteínas funcionales dentro de las células eucariotas. Los ARNm son transcritos procesados de genes, que se unen a ribosomas para la traducción en proteínas específicas. Otros ARN forman partes vitales de ribosomas (ARNr) o actúan como portadores para aminoácidos en la síntesis de proteínas (ARNt).

45 Los niveles de ARN celular se regulan de forma precisa, manteniendo un equilibrio entre las vías de transcripción y de degradación de ARN. Existe cada vez más pruebas de que en las células se encuentran presentes sistemas de control para monitorear la calidad del ARN dentro de la célula. Estos sistemas de control se encuentran conectados a vías de degradación de ARN para liberar a las células de una variedad de ARN defectuosos (Houseley, J. et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 529- 539; Parker, R. et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 121-127). Los ARN defectuosos incluyen transcritos primarios procesados de forma inadecuada y ARNm que carecen de codones de terminación de traducción, que contienen codones de terminación prematura o que contienen codones sin sentido. Además, existen pruebas de que la degradación del ARN es una marca distintiva de la apoptosis (muerte celular programada). Se ha demostrado que los agentes inductores de la apoptosis inducen la degradación de ARN en las células (King, K.L. et al, *Cell Death. Differ.* 7 (2000) 994- 1001; Bakhanashvili, M. et al., *J. Mol. Med.* (2007)). En

particular, los agentes quimioterapéuticos, particularmente aquellos que generan especies reactivas de oxígeno, pueden inducir suficiente daño al ADN y/o ARN, de forma tal que se produzca una variedad de ARN defectuosos y se activen las vías de degradación de ARN mencionadas anteriormente.

5 Dada la función fundamental que cumplen los diversos ARN celulares en el funcionamiento de las células, los tipos de ARN y sus concentraciones intracelulares pueden proporcionar una cantidad significativa de información sobre la actividad celular, tal como la expresión génica y la producción de proteínas. Por lo tanto, es conveniente extraer el ARN celular para obtener una "imagen instantánea" de lo que sucede dentro de la célula en un momento determinado. El ARN extraído puede usarse luego para clonar ADNc en vectores de expresión, para identificar y cuantificar transcritos de ARNm mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y determinación de perfiles de expresión génica mediante RT-PCR de alto rendimiento o estudios de micromatrices. Sin embargo, dado que el ARN es susceptible a la degradación extensiva por parte de enzimas ARNasas ubicuas en el entorno, es esencial una evaluación de la calidad o integridad del ARN antes de realizar las aplicaciones anteriores. La "calidad" o "integridad" del ARN (que se usan indistintamente a lo largo de la presente) se refieren, de esta manera, al estado del ARN luego de la extracción de la célula. La alta calidad del ARN significa una degradación escasa o nula del ARN luego de la extracción, mientras que la baja calidad del ARN significa que el ARN extraído presenta una degradación significativa o total.

20 En el pasado, la calidad o integridad del ARN se ha evaluado mediante la visualización de bandas de ARN bajo luz ultravioleta después de la electroforesis en gel y la tinción del gel con bromuro de etidio. Típicamente, los valores de intensidad para las bandas de ARNr 28S y 18S se determinan mediante densitometría de película y una relación calculada entre ARNr 28S/18S. El ARN se considera de alta calidad si la relación entre ARNr 28S/18S es de aproximadamente 2,0 o más. Sin embargo, dado que el enfoque anterior depende de la interpretación de la densitometría de película y/o gel por parte de un operador humano, este es subjetivo y los resultados son difíciles de reproducir entre diferentes operadores. Además, también se requieren grandes cantidades de ARN para este enfoque, lo que vuelve difícil obtener suficiente ARN para un análisis.

25 Recientemente, se ha usado cada vez más la electroforesis microcapilar para evaluar la integridad del ARN, particularmente dado que únicamente se necesitan cantidades de ARN en el entorno de los nanogramos. Una plataforma de ese tipo, el Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., EUA) usa tecnología de microfluidos para llevar a cabo separaciones electroforéticas de ARN de manera reproducible y automatizada (Mueller, O. et al., *Electrophoresis* 21 (2000) 128- 134). El Agilent® 2100 Bioanalyzer se usa actualmente en muchos laboratorios para la evaluación de la calidad del ARN, particularmente luego del desarrollo de software para el Agilent® Bioanalyzer que calcula un número de integridad de ARN (RIN) para cada muestra luego de la electroforesis capilar. (Schroeder, A. et al., *BMC. Mol. Biol.* 7 (2006) 3; Imbeaud, S. et al. *Nucl. Acids Res.* (2005), 33, 6, e56, 1-12). Este software incorpora un algoritmo que cuantifica las cantidades de múltiples ARN en el electroferograma de una muestra de ARN determinada y asigna un valor de RIN en función de esta evaluación. Estudios recientes sugieren que el RIN es mejor que la relación entre el ARNr 28S/18S para medir de manera confiable la calidad del ARN. (Schroeder, A. et al., *BMC. Mol. Biol.* 7 (2006) 3; Weis, S. et al., *J. Neurosci. Methods* 165 (2007) 198-209; Strand, C. et al., *BMC. Mol. Biol.* 8 (2007) 38). El RIN surge como el mejor método para la evaluación de la calidad del ARN en tejidos y líneas celulares mamíferas, incluidos los tumores de mama y otros órganos. (Fleige, S. et al., *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1601-1613; Strand, C. et al., *BMC. Mol. Biol.* 8 (2007) 38).

40 Ahora se ha descubierto que la calidad o integridad del ARN, como se mide a través de la calidad de ARN tumoral, particularmente como se mide con el valor de RIN, puede usarse como una medida directa de la viabilidad celular.

45 Se tomaron un conjunto de biopsias de tumores de 50 pacientes con cáncer de mama, que se estaban sometiendo a un régimen de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel con apoyo de pegfilgrastim (ver Ejemplo 2). Se tomaron dos biopsias de tumores de cada paciente en tres momentos, antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia, para formar dos conjuntos de biopsias para cada paciente (cada conjunto compuesto por una biopsia anterior, una durante y una posterior al tratamiento). Se analizó un conjunto de biopsias para determinar la calidad del ARN (es decir, la determinación del valor de RIN) y el otro conjunto de biopsias se sometió a un análisis inmunohistoquímico para determinar los niveles de proteínas marcadoras de tumores específicos que se sabe que son importantes para el pronóstico del cáncer de mama, el porcentaje de celularidad tumoral y las fotomicrografías. El RIN tumoral se comparó luego con los cambios observados en proteínas marcadoras de tumores (Ejemplo 2(d)), la celularidad tumoral (Ejemplo 2(f)) y las fotomicrografías (Ejemplo 2(g)) que se produjeron durante el transcurso del tratamiento de quimioterapia, y se analizaron para determinar una correlación estadísticamente significativa entre el RIN tumoral y los cambios observados. Finalmente, el RIN tumoral se comparó con la respuesta clínica observada del paciente.

55 Se observó que se produjeron reducciones drásticas en la integridad del ARN de células tumorales en tumores sensibles al fármaco después de la quimioterapia, mientras que se observó que los tumores resistentes al fármaco mantuvieron una integridad del ARN alta, lo que produjo un avance de la enfermedad y un pronóstico malo para el paciente. Tal como se indica en el Ejemplo 2(b), un nivel alto de dosis del fármaco estaba asociado fuertemente a un cambio negativo importante en el RIN del tumor durante el transcurso del tratamiento. Asimismo, un nivel bajo de dosis del fármaco se correlacionaba con reducciones escasas o pequeñas en el RIN del tumor. Esto sugería que una reducción en el RIN del tumor estaba relacionado directamente con la respuesta al fármaco de la quimioterapia en estos pacientes. Se halló una correlación positiva importante entre la extensión del tumor (celularidad) y los

valores de RIN del tumor medidos después del tratamiento (ver Ejemplo 2(e)). Es decir, una disminución en la extensión del tumor era proporcional a la disminución en el RIN del tumor. Finalmente, se halló que el RIN tumoral medido después del tratamiento era un indicador de la respuesta del tumor a la quimioterapia y la respuesta clínica observada (ver Ejemplo 2(f),(g)).

- 5 Por lo tanto, la respuesta de tumores a un régimen de quimioterapia específico en pacientes con cáncer puede determinarse de forma eficaz mediante el monitoreo de la capacidad del régimen de inducir una reducción en la calidad (integridad) del ARN tumoral.

La integridad del ARN tumoral puede medirse mediante electroforesis capilar, seguida por la asignación de un valor de RIN. Las reducciones inducidas por quimioterapia en valores de RIN de tumores indicarían tumores con respuesta, mientras que un cambio pequeño en los valores de RIN de tumores sugerirían que el tumor es resistente al régimen seleccionado.

Con el fin de determinar la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de quimioterapia, se extrae ARN del/de los tumor/es del paciente en al menos dos momentos diferentes durante la administración de un régimen de quimioterapia. Preferiblemente, el ARN se extrae del tumor antes de la administración de un régimen de quimioterapia y durante y/o después de la finalización del régimen.

El régimen de quimioterapia puede consistir en un agente quimioterapéutico o una combinación de dos o más agentes quimioterapéuticos y las dosis de cada agente pueden variar con el tiempo.

Para mejorar la reproducibilidad y precisión, las células tumorales se recolectan preferiblemente en una o más biopsias guiadas por imágenes. Para mejorar la reproducibilidad y precisión de manera adicional, se recolectan tres o más biopsias guiadas por imágenes del tumor. Una biopsia guiada por imagen se obtiene a través de medios guiados por imágenes tales como la tomografía computarizada (TC), rayos X, ultrasonido e imagenología por resonancia magnética (IRM).

Luego se determina la calidad del ARN extraído. Esto puede lograrse a través de medios tradicionales tales como la obtención de la relación entre el ARNr 28S/18S tal como se indicó anteriormente. Sin embargo, la calidad del ARN se determina preferiblemente mediante la electroforesis capilar del ARN extraído y la cuantificación de los ARN en el electroferograma resultante. Se prefiere un sistema analítico automatizado, tal como el Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., EUA) para llevar a cabo esta determinación, dado que un sistema de ese tipo puede evaluar el electroferograma y cuantificar la calidad de una muestra de ARN determinada con un número de integridad de ARN (RIN). El Agilent® 2100 Bioanalyzer calcula el RIN mediante el uso de un algoritmo que se incorpora al software asociado con el Bioanalyzer (Schroeder, A. et al., *BMC. Mol. Biol.* 7 (2006) 3; Imbeaud, S. et al. *Nucl. Acids Res.* (2005), 33, 6, e56, 1-12). Los valores de RIN resultantes se pueden reproducir de un operador al siguiente, y se pueden procesar digitalmente. Asimismo, un sistema analítico automatizado tal como el Agilent® 2100 Bioanalyzer permite análisis rápidos y de alto rendimiento de muestras de ARN. De esta manera, la capacidad de respuesta de un paciente a un régimen de quimioterapia determinado puede determinarse durante o después de un régimen de quimioterapia y el régimen puede cambiarse una vez que no se detecta ninguna respuesta tumoral. Esto es muy beneficioso ya que identifica pacientes que no han respondido al régimen de quimioterapia y que probablemente tendrían un riesgo alto de avance de la enfermedad.

El valor de RIN de las células tumorales recolectadas antes de la administración del régimen de quimioterapia se compara luego con el o los valores de RIN de células tumorales recolectadas después del comienzo del régimen, es decir, durante y/o después de la finalización del régimen de quimioterapia. Si un paciente no presentara cambios en la integridad del ARN tumoral durante el tratamiento (patrón de respuesta A tal como se indica en el Ejemplo 2), el tumor del paciente se consideraría resistente al régimen de quimioterapia usado. Se consideraría que el paciente no responde al régimen de quimioterapia, es decir, con riesgo alto de avance del tumor, y el pronóstico se consideraría malo. Luego pueden considerarse los protocolos de tratamiento o regímenes de quimioterapia alternativos, tales como un cambio en el nivel de dosificación y/o un cambio en el tipo de agente/s quimioterapéutico/s administrado/s. El método definido en la presente puede repetirse luego para determinar la capacidad de respuesta al nuevo régimen, lo que permite la adaptación de un régimen de quimioterapia según la respuesta del paciente.

Si un paciente presentara una reducción drástica en la integridad del ARN tumoral (> 50 %) tanto durante como después del tratamiento (patrón de respuesta C tal como se indica en el Ejemplo 2), se consideraría que el paciente ha respondido a la quimioterapia y tendría un riesgo menor de avance del tumor. El pronóstico del paciente se consideraría bueno. Los valores de RIN del tumor cercanos a cero serían indicadores muy importantes de la respuesta a la quimioterapia y el riesgo bajo de avance del tumor.

Si un paciente presentara una reducción drástica en la integridad del ARN únicamente después del tratamiento (patrón de respuesta B tal como se indica en el Ejemplo 2), se consideraría que el paciente ha respondido a la quimioterapia y tendría un riesgo menor de avance del tumor. El pronóstico del paciente se consideraría bueno.

Si un paciente presenta un cambio drástico en la integridad del ARN tumoral únicamente durante el tratamiento, es probable que haya respondido a la terapia y tendría un riesgo menor de reaparición de la enfermedad. Esto es independiente de un regreso a na integridad del ARN "tumoral" alta después del tratamiento, dado que la calidad alta

del ARN después del tratamiento puede derivar del tejido normal que se haya filtrado en la lesión. Sin embargo, es posible que el tumor reaparezca después del tratamiento.

En los Ejemplos que siguen se ilustran detalles adicionales de las realizaciones preferidas de la invención, que se entiende que son no taxativos con respecto a las reivindicaciones anexas.

5 Ejemplo 1: Materiales y métodos

(a) Aislamiento total del ARN de las biopsias con aguja gruesa de tejido mamario.

El ARN se aisló de las biopsias con aguja gruesa de tumores de pacientes mediante el uso de minikits QIAGEN® RNAeasy® (Qiagen GmbH, Alemania). El protocolo de aislamiento de ARN se modificó ligeramente con respecto al protocolo publicado por Qiagen GmbH (disponible de forma gratuita a través de Qiagen GmbH, Alemania; también disponible en

10 <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=I000291>).

Se tomaron biopsias con aguja gruesa guiadas por imágenes del tumor del paciente, se colocaron inmediatamente en un portaobjetos de vidrio y se prepararon para la determinación de la celularidad tumoral y la biopsia con aguja gruesa se sometió inmediatamente a congelamiento ultrarrápido sobre hielo seco para futuros análisis. Las biopsias con aguja gruesa congeladas se colocaron en 0,5 ml de amortiguador RLT que contenía β -ME (10 μ l en 1 ml) en un tubo Eppendorf. Las biopsias en amortiguador RLT se homogeneizaron con un homogeneizador a motor Coreless™ durante 5 min (Kontes Glass Company, EUA, Cat#:749540-0000).

Luego el lisado se pasó al menos 5 veces a través de una aguja de calibre 20 (0,9 mm de diámetro) instalada en una jeringa libre de RNasa. Luego la muestra se centrifugó a alta velocidad en una microcentrífuga refrigerada a 4 °C durante 3 min, con transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo.

Luego se agregó un volumen (500 μ l) de etanol al 70 % al sobrenadante y la muestra se mezcló bien mediante pipeteado repetido. Si se perdía parte del lisado durante la homogeneización, el volumen de etanol se ajustaba de manera acorde. Los precipitados visibles que se formaron después de la adición de etanol en algunas muestras no afectaron el procedimiento de aislamiento de ARN.

25 Se agregaron un máximo de 700 μ l de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una columna RNeasy mim y se colocó en un tubo de recolección de 2 ml. La columna se centrifugó durante 15 s a \sim 8000 x g (\sim 10 000 rpm) y se descartó el flujo continuo. El resto de la muestra se agregó luego a la columna y la columna se centrifugó nuevamente.

Luego se agregaron setecientos μ l de Amortiguador RW1 a la columna RNeasy® y la columna se centrifugó durante 15 s a \sim 8000 x g (\sim 10 000 rpm) para lavar la columna. El flujo continuo se descartó.

La columna RNeasy® se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se aplicaron 500 μ l de Amortiguador RPE a la columna. La columna se centrifugó luego durante 15 s a \sim 8000 x g (\sim 10 000 rpm) para lavar la columna. El flujo continuo se descartó.

La columna RNeasy® se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 2 ml, descartando el tubo de recolección anterior y el flujo continuo. Luego la columna se centrifugó nuevamente en una microcentrífuga a alta velocidad durante 1 min, descartando el tubo de recolección y el flujo continuo una vez más.

Para eluir el ARN unido, la columna RNeasy® se transfirió a un nuevo tubo de recolección de 1,5 ml. Se aplicaron treinta μ l de agua libre de RNasa directamente a la columna y la columna se centrifugó durante 1 min a \sim 8000 x g (\sim 10 000 rpm).

40 Para obtener una concentración de ARN total mayor para la muestra, se llevó a cabo una segunda etapa de elución mediante el uso del eluato de la etapa 8.

Luego se verificó la concentración y calidad de ARN mediante el uso de un Agilent® 2100 Bioanalyzer y software asociado.

(b) Medición de la cantidad de ARN y la integridad de ARN

45 La muestra total de ARN de la biopsia con aguja gruesa del tumor se aplicó a RNA 6000 Nano Lapchips™ (Agilent Technologies, Inc.) y se sometió a electroforesis capilar mediante el uso de un Agilent® 2100 Bioanalyzer. Se siguió el protocolo para el Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc.) (Agilent® 2100 Bioanalyzer User's Guide, ed. nov. 2003, Manual Part No. G2946-90000, Agilent Technologies, Inc., disponible en

<http://www.chem.agilent.com/temp/rad4DEAE/00000725.PDF>).

50 Se determinó la cantidad de ARN en la muestra y la calidad del ARN (integridad del ARN) mediante el uso del

algoritmo de RIN descrito por Schroeder et al. (Schroeder, A. et al. "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements", *BMC. Mol. Biol.* 7 (2006) 3.), que se incorpora al software informático asociado con el Agilent® 2100 Bioanalyzer (el software y el manual adjunto se encuentran disponibles de forma gratuita a través de Agilent Technologies Inc., y también en

5 <http://www.chem.agilent.com/scripts/generic.asp?lpage=52241&indcol=N&prodcol=Y>)

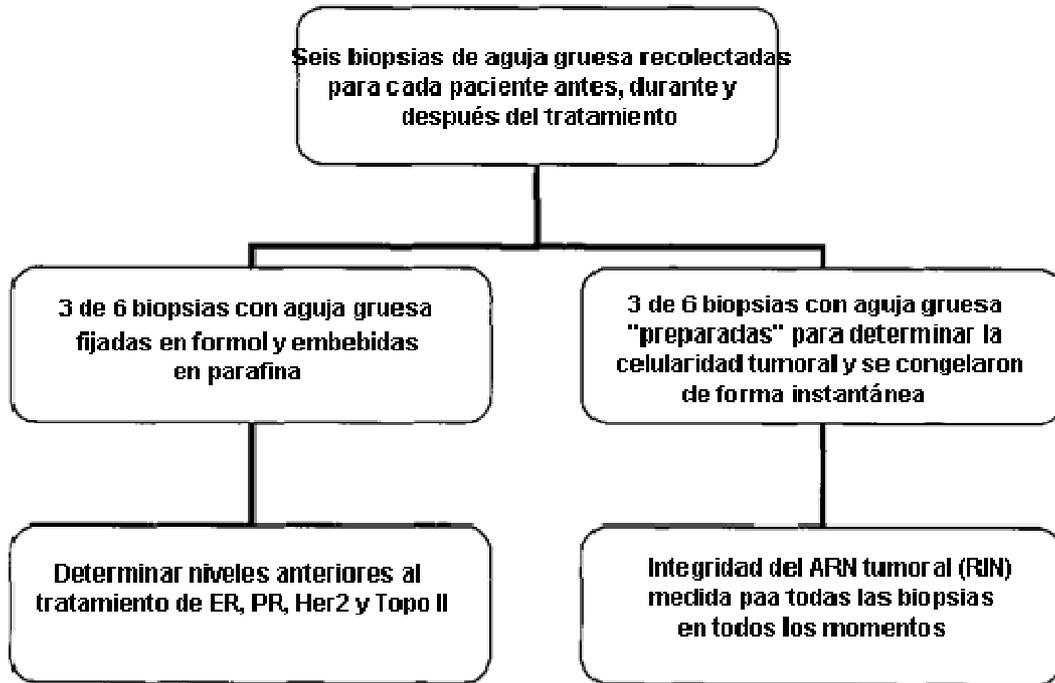
Ejemplo 2: El número de integridad del ARN (RIN) y la medición de la calidad de ARN tumoral en pacientes con cáncer de mama

(a) *Muestras de biopsias de tumores de pacientes con cáncer de mama en un ensayo clínico de quimioterapia*

10 Para evaluar si un tratamiento de pacientes con cáncer de mama con agentes quimioterapéuticos produce la degradación de ARN tumoral, se tomaron seis biopsias con aguja gruesa guiadas por imágenes de tumores de 50 pacientes con cáncer de mama inflamatorio o avanzado localmente antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel. Los pacientes provenían de un ensayo clínico nacional realizado por el Grupo de Ensayos Clínicos del National Cancer Institute of Canada (Instituto Nacional de Cáncer de Canadá) (denominado como grupo "MA.22") y se trataron con niveles crecientes de dosis de epirrubicina y docetaxel, con apoyo de pegfilgrastim para reducir la neutropenia asociada a esta terapia. La quimioterapia se administró en un régimen de dosificación estándar (Grupo A) cada 3 semanas y los niveles de dosificación usados en este estudio se muestran en la Tabla 1. La máxima dosis tolerada para este régimen era el nivel de dosis 6, es decir, 105 mg/m² de epirrubicina y 75 mg/m² de docetaxel (ver Anexo A, Tabla 1).

20 Tabla 1: Niveles de dosis de epirrubicina, docetaxel y pegfilgrastim administrados a pacientes con cáncer de mama inflamatorio/avanzado localmente mediante un régimen trisemanal (anexo A) o bisemanal (anexo B) en asociación con un ensayo clínico (MA.22) por parte del National Cancer Institute of Canada.

Nivel de dosis	Epirrubicina (mg/m ² IV)	Docetaxel (mg/m ² IV)	Pegfilgrastim (mg por ciclo, día 2)
1-Anexo B	50	50	6
2-Anexo B	60	60	6
3-Anexo B	70	70	6
4-Anexo A	75	75	6
5-Anexo A	90	75	6
6-Anexo A	105	75	6
7-Anexo A	120	75	6



Esquema 1

Tal como se indica en el Esquema 1, tres de las seis biopsias tomadas de cada paciente se encontraban recién congeladas para los estudios de la calidad del ARN, mientras que el resto se fijaron en formol para la evaluación de los niveles de marcadores de tumores específicos, incluido el receptor de estrógenos ER (Novacastra® Clone 6G11, Leica Microsystems, Alemania), el receptor de progesteronas PR (Novacastra® Clone 16, Leica Microsystems, Alemania), la topoisomerasa II ("Topo II"; clon SWT3D1, Dako Denmark A/S) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 ("Her2"; Zymed® TAB250, Invitrogen Corp., EUA). Se aisló el ARN de dos de las biopsias con aguja gruesa recién congeladas mediante el uso del minkit RNeasy® (Qiagen GmbH, Alemania), tras lo cual se evaluó la calidad del ARN de la muestra mediante electroforesis capilar mediante el uso de un Agilent® 2100 Bioanalyzer. El Bioanalyzer cuantificó la abundancia de ARN específicos en la muestra y asignó un número de integridad (RIN) a cada muestra. Tal como se muestra en la Figura 1, se observó que la magnitud del RIN era una medida confiable de la integridad del ARN tal como se visualizó mediante la inspección de electroferogramas después de la electroforesis capilar de preparación de ARN tumoral, es decir, las intensidades de las bandas de ARNr 28S y 18S disminuyó notablemente cuanto menor era el valor del RIN.

(b) Asociación entre los cambios en la integridad del ARN y el nivel de dosis del fármaco

Luego se evaluaron los valores de RIN esenciales medios para el ARN aislado de biopsias con aguja gruesa de pacientes para determinar si estos valores disminuían en respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel y si existía una relación entre el nivel de dosis del fármaco y la magnitud de la reducción del RIN. Si bien hubo una variación en los valores medios del RIN de tumores antes del tratamiento para los pacientes, estos rara vez se encontraron por debajo de 5,0, con un valor medio de 6,5 cuando se evaluaron los datos de los 50 pacientes (Tabla 2). Se evaluó la asociación entre el RIN y la dosis de referencia del fármaco mediante el uso de un ANOVA de una vía.

Tal como se esperaba, no existía una asociación entre la magnitud del RIN de los tumores y el nivel de dosis del fármaco en el punto de referencia ($p = 0,45$), dado que los pacientes todavía no habían recibido la quimioterapia. En cambio, los valores del RIN se encontraban correlacionados de forma significativa y negativa con el nivel de dosis del fármaco durante el tratamiento ($p = 0,04$). Se observaron reducciones escasas o nulas en el RIN de los tumores para pacientes que recibieron dosis bajas del fármaco, mientras que los pacientes que recibieron dosis altas del fármaco presentaron reducciones drásticas en el RIN de los tumores (Figura 2). A pesar de la pequeña cantidad de pacientes ($n = 3$), el efecto de la quimioterapia sobre los valores del RIN tumoral fue particularmente notorio para tumores expuestos al nivel de dosis 7, donde los valores medios del RIN eran cero en muestras simultáneas y posteriores al tratamiento, pero 5,0 en muestras anteriores al tratamiento (Tabla 2). El valor del RIN medio durante el tratamiento en todas las dosis fue 3,8. El valor del RIN tumoral medio después del tratamiento fue 4,2, lo que también sugiere una disminución significativa en la integridad del ARN tumoral después de la quimioterapia. Se

5 observó una relación negativa similar entre los valores del RIN de los tumores y los niveles de dosis del fármaco después del tratamiento, pero con una importancia marginal ($p = 0,06$) (Figura 3). El valor de importancia marginal después del tratamiento puede ser el resultado de dos fenómenos posibles: la población de células tumorales se recuperó una vez que los fármacos quimioterapéuticos se retiraron de la circulación (provocando una reaparición de la enfermedad) o el tumor se infiltró en tipos de tejidos y/o células normales. En cualquier caso, se esperaría que los valores de RIN tumorales aumentaran, reduciendo la capacidad de detectar cambios inducidos por la quimioterapia en la calidad del ARN tumoral.

10 **Tabla 2** - Valores de RIN de tumores para pacientes en el ensayo clínico MA.22 antes, durante y después del tratamiento de quimioterapia con epirrubicina/docetaxel en los niveles de dosis indicados en la Tabla 1. ¹Si la cantidad de pacientes ($N = 1$), se proporciona el valor del RIN para ese paciente en lugar de un estimado de la media. ²Si $N=2$, se proporciona el intervalo de valores de RIN en lugar del estimado del límite de confianza del 95 %. ³El superíndice 3 indica un truncamiento en cero.

Momento del tratamiento	Nivel de dosis	N	Media	(Límite de confianza de 95 %)
Punto de referencia	Todos los pacientes	50	6,5	(6,1, 6,8)
	1	3	6,9	(6,7, 7,2)
	2	2	N/A	(6,4, 8,2)
	3	1	7,2	(N/A, N/A)
	4	3	7,3	(6,8, 7,7)
	5	6	6,5	(5,9, 7,0)
	6	32	6,3	(5,8, 6,9)
	7	3	5,2	(0,0, 7,7)
Durante el tratamiento	Todos los pacientes	50	3,8	(3,0, 4,5)
	1	3	7,0	(5,8, 8,1)
	2	2	N/A	(1,0, 4,0)
	3	1	2,4	(N/A, N/A)
	4	3	3,8	(2,2, 5,0)
	5	6	3,3	(0,9, 4,6)
	6	32	3,8	(2,7, 4,6)
	7	3	0,0 ³	(0,0, 0,0) ³

Después del tratamiento	Todos los pacientes	49	4,2	(3,2, 4,5)
	1	3	6,3	(2,9, 8,6)
	2	2	n/a	(1,5, 4,9)
	3	1	8,0	(N/A, N/A)
	4	3	6,5	(3,9, 8,4)
	5	6	4,4	(0,2, 6,4)
	6	31	3,7	(2,2, 4,7)
	7	3	0,0 ³	(0,0, 0,0) ³

(c) Patrones de cambio en la integridad del ARN durante el tratamiento de pacientes con quimioterapia con epirrubicina/docetaxel

5 La Figura 3 ilustra los patrones de cambio en la calidad del ARN tumoral observados en los pacientes MA.22 durante la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel tal como fueron evaluados mediante la inspección visual de electroferogramas después de la electroforesis capilar. Los pacientes no presentaron cambios en la calidad del ARN (patrón A), presentaron una reducción temporal en la calidad del ARN únicamente durante el tratamiento (patrón D), una gran reducción en la calidad del ARN únicamente después del tratamiento (patrón B) o reducciones drásticas en la calidad del ARN durante y después del tratamiento (patrón C). En una cantidad pequeña de pacientes, la calidad del ARN tumoral fue mala en todo momento (patrón E), cuya causa se desconoce. Estos patrones también se reflejaron en los valores de RIN correspondientes de los pacientes antes, durante y después de la quimioterapia (Figura 4). Se estableció que los tumores de los pacientes que presentaron los patrones B y C respondieron a la quimioterapia (~ 55 % de los pacientes), mientras que se estableció que los tumores de los pacientes que presentaron los patrones A y D no respondieron al tratamiento (~ 37 % de los pacientes).

(d) Relación entre los niveles de topoisomerasa II y la integridad del ARN tumoral

Luego se usaron enfoques inmunohistoquímicos para determinar los niveles de referencia de las proteínas marcadores de tumores específicos que eran importantes para el pronóstico del cáncer de mama, y la expresión se clasificó como un porcentaje de tinción positiva en comparación con un estándar conocido. Las proteínas evaluadas mediante inmunohistoquímica incluyeron el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesteronas (PR), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) y la topoisomerasa II ("topo II"). Luego se evaluaron las asociaciones entre los niveles anteriores al tratamiento de marcadores tumorales específicos y valores de RIN en diversos momentos mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Spearman y Pearson, con o sin datos. Los niveles altos anteriores al tratamiento de topo II estaban asociados significativamente con un RIN tumoral alto antes del tratamiento (Tabla 3; valores p entre 0,01 y 0,03). La asociación de valores de RIN altos anteriores al tratamiento con niveles de topo II altos anteriores al tratamiento sugirió que las células con una expresión alta de topo II son muy viables, de proliferación rápida y que producen un ARN de calidad alta. Esta asociación también fue evidente después del tratamiento (ver la Tabla 3). Se estableció que los tumores con valores de RIN altos (es decir, ARN de calidad alta) después del tratamiento representaban o bien tumores muy viables que no respondieron a la quimioterapia o tejido normal sano que se infiltró en el tumor. No se observó ninguna asociación entre los niveles de Her2, ER o PR anteriores al tratamiento y los valores de RIN antes o después del tratamiento (no se muestran los datos).

Tabla 3 - Relación entre el número de integridad del ARN tumoral (RIN) y la expresión de topoisomerasa II para pacientes MA.22 antes de la quimioterapia (de referencia), durante el tratamiento y después del tratamiento. La expresión porcentual de topoisomerasa II fue determinada por un patólogo a través de experimentos de inmunohistoquímica que investigaron secciones fijas de biopsias con aguja gruesa de tumores de los pacientes con un anticuerpo específico de topoisomerasa II α . Los datos se evaluaron mediante el uso de valores transformados o no transformados para controlar la varianza de datos. Se determinaron los coeficientes de Pearson y Spearman y los valores p que indicaron una importancia estadística se resaltan en negrita.

Factores	Correlación de Pearson	Valor P	Correlación de Spearman	Valor P
RIN y Topo II máximos				
RIN transformado, Topo2 sin transformar				
RIN de referencia	0,39	0,01	0,30	0,03
RIN durante el tratamiento	0,22	0,13	0,16	0,28
RIN después del tratamiento	0,35	0,02	0,27	0,07
RIN, Topo2 sin transformar				
RIN de referencia	0,34	0,02	0,30	0,03
RIN durante el tratamiento	0,23	0,12	0,16	0,28
RIN después del tratamiento	0,30	0,04	0,27	0,07

(e) Relación entre los valores de RIN tumoral y la celularidad tumoral

Una medida de la respuesta al fármaco en los pacientes implica evaluar la magnitud de la reducción en la cantidad de células tumorales que comprenden un post-tratamiento de lesiones. Tal como se resume en la Tabla 4 más adelante, los cambios en los valores de RIN correspondían a diversos patrones de cambio en los valores de celularidad tumoral. En general, los pacientes presentaron respuestas significativas a la quimioterapia, dado que la celularidad o extensión total de los tumores cayó de 90,94 % \pm 2,17 % a 50,69 % \pm 5,79 % durante el tratamiento y 39,6 % \pm 5,78 % después del tratamiento (ver la Tabla 4). Los pacientes que presentaron los siguientes patrones de respuesta se colocaron en los Grupos A a E según se detalla a continuación: (A) sin cambios en la celularidad tumoral; (B) una gran reducción en la celularidad tumoral únicamente después del tratamiento; (C) reducciones drásticas en la celularidad tumoral durante y después del tratamiento; y (D) una reducción temporal en la celularidad tumoral únicamente durante el tratamiento. Los pacientes para los cuales los datos se encontraban incompletos se colocaron en el Grupo E. Cuando se evaluaron todos los pacientes de forma simultánea, se observaron reducciones significativas estadísticamente en la celularidad tumoral durante y después de la quimioterapia.

Tabla 4. Variaciones en respuesta de los pacientes MA.22 a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel, según se midieron a través de grandes reducciones en la celularidad tumoral durante y después del tratamiento.

Celularidad tumoral			
Número de identificación del paciente	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento	Después del tratamiento
Grupo A - Sin respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel			
CAMN004	100	100	100
CAMN002	100	90	100
CAMN006	100	90	100
CAMN024	100	100	100
CAMN028	100	100	90
CAMN031R	100	100	50
CAMN043	100	100	100

ES 2 561 979 T3

Celularidad tumoral			
Número de identificación del paciente	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento	Después del tratamiento
CAGS005	80	80	80
CAMN007	100	50	70
CAMN018	100	80	90
CAMN029	100	90	100
CAMN034	70	50	90
CAMN036	100	90	50
CAGS002	80	80	50
CAMN013	60	60	70
CAMN021	70	90	50
MEDIA (± E. E.)	91,25 ± 3,52	84,38 ± 4,28	80,63 ± 5,20
Grupo B - Respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel únicamente después del tratamiento			
CAMN035	80	80	10
CAMN041	100	80	0
CAMN037	100	80	30
CAMN008	50	100	0
CAMN009	90	70	10
CAMN015	100	90	10
CAMN017	100	90	0
CAMN020	100	50	0
CAMN026	90	50	30
CAMN045	90	90	5
MEDIA (± E. E.)	90,00 ± 4,94	78,00 ± 7,55	9,5 ± 3,69

Grupo C - Respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel durante y después del tratamiento			
CAMN039	90	2	0
CAMN027	100	0	0
CAMN005	100	1	0
CAGS004	90	0	0
CAMN023	100	0	0
CAMN030	100	30	0
CAMN044	100	0	20
CAMN011	100	0	0
CAMN012	90	0	0

CAMN016	100	0	0
CAMN033	90	20	0
CAMN038	100	0	0
CAGS001	90	20	5
MEDIA (± E. E.)	96,15 ± 1,40	5,62 ± 2,88	1,92 ± 1,55
Grupo D - Respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel únicamente durante el tratamiento			
CAMN003	40	10	50
CAMN010	100	0	50
CAMN001	60	20	50
CAMN025	100	0	100
Celularidad tumoral			
Número de identificación del paciente	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento	Después del tratamiento
CAMN040	50	1	70
CAMN047	60	0	50
MEDIA (± E. E.)	68,33 ± 10,47	5,17 ± 3,37	61,67 ± 8,33
Grupo E - Datos incompletos			
CAMN042	100	100	
CAMN032	100	100	
CAMN014	100	50	
CAMN019	100	0	
CAMN022	100		
MEDIA DE TODAS LAS MUESTRAS (± E. E.)	90,94 ± 2,17	50,69 ± 5,79	39,6 ± 5,78

5 Dada la gran correspondencia entre los patrones de cambio en los valores de RIN y los valores de celularidad tumoral durante el tratamiento, se evaluaron los valores de RIN de los tumores para ver si los cambios en el RIN reflejaban de forma precisa la respuesta al tratamiento en los pacientes (medida a través de los cambios en la celularidad o extensión de los tumores). Se analizó la relación entre el porcentaje de células tumorales en biopsias con aguja gruesa y el valor máximo de RIN para biopsias con aguja gruesa antes, durante y después del tratamiento, que se resume en la Tabla 5.

Tabla 5 - Relación entre el número de integridad del ARN (RIN) tumoral y la extensión del tumor para pacientes MA.22 antes de la quimioterapia (de referencia), durante el tratamiento y después del tratamiento. La extensión de los tumores (celularidad tumoral porcentual) fue determinada por un patólogo a través de la visualización microscópica de secciones fijas de biopsias con aguja gruesa de los pacientes teñidas con hematoxilina/eosina. Los datos se evaluaron mediante el uso de valores transformados o no transformados para controlar la varianza de datos. Se determinaron los coeficientes de Pearson y Spearman y los valores p que indicaron una importancia estadística se resaltan en negrita.

Factores RIN máximo	Correlación de Pearson	Valor P	Correlación de Spearman	Valor P
RIN transformado, extensión tumoral sin transformar				
RIN de referencia	0,15	0,29	0,09	0,55
RIN durante el tratamiento	0,06	0,69	-0,01	0,95
RIN después del tratamiento	0,52	0,0003	0,42	0,004
RIN. extensión tumoral sin transformar				
RIN de referencia	0,20	0,17	0,09	0,55
RIN durante el tratamiento	0,01	0,93	-0,01	0,95
RIN después del tratamiento	0,49	0,001	0,42	0,004

Tal como se muestra en la Tabla 5, existía una relación positiva muy fuerte entre los valores de extensión de los tumores y los valores de RIN después del tratamiento (los valores p oscilaron entre 0,0003 y 0,004 dependiendo de si se computaron los coeficientes de Spearman o Pearson y si los datos se transformaron para mejorar la simetría y estabilizar las varianzas). La gran correlación entre los valores de PIN y la respuesta del paciente a la quimioterapia (medida a través de los niveles de celularidad tumoral) no se observó durante el tratamiento, posiblemente porque no se tenía conocimiento completo de los efectos de los agentes quimioterapéuticos sobre el RIN de los tumores a la mitad del tratamiento.

Se muestran fotomicrografías de secciones de tumores antes, durante y después del tratamiento de pacientes de cada uno de los grupos A (CAMN-006; CAMN-018), B (CAMN-009), C (CAMN-047) y D (CAMN-030) en la Figura 6. Como se puede ver en la Figura 5, el nivel observado de celularidad tumoral correspondía a los cambios observados en el RIN tumoral.

(f) Capacidad de los valores de RIN de los tumores para identificar la respuesta de los tumores a la quimioterapia

Se examinaron los valores de RIN recolectados para ver si los valores de RIN tumorales máximos después del tratamiento $\leq 3,1$ podían identificar con precisión los pacientes cuyos tumores respondían a la quimioterapia (según se midió a través de las celularidades tumorales después del tratamiento $\leq 10\%$). Se seleccionó un valor de RIN de 3,1, puesto que este representaba la mitad del valor medio de RIN de todas las biopsias con aguja gruesa de tumores antes del tratamiento excepto las del Grupo E (ver la Tabla 4 anterior). Tal como se muestra en la Tabla 6 (ver más adelante), los pacientes que tenían un valor medio de RIN tumoral después del tratamiento de 3,1 o menos también tenían una celularidad tumoral posterior al tratamiento $< 10\%$ en 19 de los 20 pacientes (95 % de acuerdo). Asimismo, 16 de los 25 pacientes que tenían valores de RIN tumoral después del tratamiento $> 3,0$ tenían valores de

celularidad tumoral posterior al tratamiento $\geq 10\%$ (64 % de acuerdo). De esta manera, dados algunos valores límites específicos, hubo una buena correlación entre los valores de RIN después del tratamiento y los valores de celularidad tumoral después del tratamiento, en particular para los que respondieron. Sin embargo, se produjeron discrepancias en esta relación en cuatro casos en los que se observó que los niveles de celularidad tumoral eran altos ($\geq 50\%$) y los valores de RIN eran cero. Dado que se sabe los tumores mamarios son heterogéneos, algunas regiones del tumor pueden tener una celularidad tumoral alta, mientras que otras regiones no, lo que produce una discordancia entre el RIN tumoral y la celularidad tumoral. De manera alternativa, esto puede deberse a que las células tumorales retienen su morfología celular pero no son viables con ARN completamente hidrolizado. Por lo tanto, las mediciones del RIN de los tumores pueden ser superiores a las mediciones de celularidad tumoral a la hora de determinar la respuesta de los tumores a agentes quimioterapéuticos, dado que el RIN de los tumores sirve como un biomarcador funcional.

Tabla 6 - Capacidad del RIN tumoral máximo de predecir la respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel en pacientes MA.22 (según se determina mediante una reducción en la celularidad tumoral a $\leq 10\%$). El RIN máximo es el mayor de los dos valores de RIN obtenidos de ARN aislado de dos biopsias con aguja gruesa de tumores independientes de cada paciente. Los valores significativos se indican según se detalla a continuación:

Grupo A							
	Ciclo 0			Ciclo 3/4		Ciclo 6/8	
Pacientes (13)	RIN máx.	% de celularidad tumoral	Her2	RIN máx.	% de celularidad tumoral	RIN máx.	% de celularidad tumoral
CAMN001	7,1	60	0	5	20	7,2 ^b	50 ^b
CAMN002	7	100	0	3,7	90	4,1 ^b	100 ^b
CAMN006	7,4	100	80	6,7	90	7,9 ^b	100 ^b
CAMN010	7,4	100	80	5,4	0	7,1 ^b	50 ^b
CAMN024	8,7	100	80	6,5	100	9,5 ^b	100 ^b
CAMN025	5,9	100	0	7,6	0	7,9 ^b	100 ^b
CAMN028	6,8	100	0	6,5	100	6,2 ^b	90 ^b
CAMN031R	6,9	100	0	6,5	100	6,7 ^b	50 ^b
CAMN037	8,6	100	0	6,6	80	7,7 ^b	30 ^b
CAMN040	6,7	50	0	5,8	1	7,1 ^b	70 ^b
CAMN043	7	100	0	7,7	100	7,9 ^b	100 ^b
CAMN044	7,8	100	0	3,5	0	4,3 ^b	20 ^b
CAGS005	8	80	0	7,5	80	7,8 ^b	80 ^b
Media RIN \pm EE	7,33 \pm 0,22			6,08 \pm 0,38		7,03 \pm 0,41	

Grupo B							
	Ciclo 0			Ciclo 3/4		Ciclo 6/8	
Pacientes (8)	RIN máx.	% de celularidad tumoral	Her2	RIN máx.	% de celularidad tumoral	RIN máx.	% de celularidad tumoral
CAMN007	5,7	100	0	5,3	50	2,9 ^c	70 ^c
CAMN023	5,6	100	0	5,6	0	0 ^a	0 ^a

ES 2 561 979 T3

CAMN030	6,8	100	0	4,5	30	0 ^a	0 ^a
CAMN035	7,0	80	0	3,5	80	0 ^a	10 ^a
CAMN041	7,1	100	0	7,5	80	3 ^a	0 ^a
CAMN046	5,2	0	0	5,5	100	3,1	
CAGS003	5,3	40	0	4,6		0	
CAGS004	7,6	90	100	4,4	0	3,1 ^a	0 ^a
Media	6,29 ± 0,33			5,11 ± 0,42		1,51 ± 0,57	
RIN ± EE							

Grupo C							
	Ciclo 0			Ciclo 3/4		Ciclo 6/8	
Pacientes (19)	RIN máx.	% de celularidad tumoral	Her2	RIN máx.	% de celularidad tumoral	RIN máx.	% de celularidad tumoral
CAMN004	5,9	100	0	1,8	100	2 ^c	100 ^c
CAMN005	6,8	100	80	0	1	3,1 ^a	0 ^a
CAMN009	7,1	90	0	2,7	70	0 ^a	10 ^a
CAMN011	5,1	100	80	2,9	0	3 ^a	0 ^a
CAMN012	6,4	90	80	0	0	0 ^a	0 ^a
CAMN014	5,7	100	0	0	50	0	
CAMN015	7,2	100	90	0	90	0 ^a	10 ^a
CAMN016	7,1	100	0	0	0	2,9 ^a	0 ^a
CAMN017	7,7	100	80	2,9	90	0 ^a	0 ^a
CAMN020	7,4	100	0	0	5?	0 ^a	0 ^a
CAMN026	6,4	90	0	2,6	50	0 ^c	30 ^c
CAMN029	5,8	100	80	0	90	0 ^c	100 ^c
CAMN033	6,9	90	0	2,7	20	2,6 ^a	0 ^a
CAMN034	7,7	70	0	2,5	50	2,8 ^c	90 ^c
CAMN036	8,3	100	0	0	90	0 ^c	50 ^c
CAMN038	8,6	100	80	0	0	3 ^a	0 ^a
CAMN045	6,9	90	0	2,1	90	2,7 ^a	5 ^a
CAGS001	5,7	80/100		0	20	0 ^a	5 ^a
CAGS002	7,1	80		0	80	2,4 ^c	50 ^c
Media	6,83 ± 0,21			1,06 ± 0,3		1,29 ± 0,32	
RIN ± SE							

Grupo D							
	Ciclo 0			Ciclo 3/4		Ciclo	6/8
Pacientes (5)	RIN máx.	% de celularidad tumoral	Her2	RIN máx.	% de celularidad tumoral	RIN máx.	% de celularidad tumoral
CAMN003	7,7	40	80	2,8	10	7,8 ^b	50 ^b
CAMN008	6,1	50	80	2,7	100	6,5 ^c	0 ^c
CAMN018	6,4	100	0	2,8	80	5,2 ^b	90 ^b
CAMN032	4,7	100	0	0	100	5,9	
CAMN047	7,2	60	0	2,4	0	8 ^b	50 ^b
Media RIN ± EE	6,42 ± 0,52			2,14 ± 0,54		6,68 ± ,54	

Grupo E							
	Ciclo 0					Ciclo 6/8	
Pacientes (4)	RIN máx.	% de celularidad tumoral	Her2		Ciclo 3/4	RIN máx.	% de celularidad tumoral
CAMN013	0	60	0	0	RIN máx.	0 ^c	70 ^c
CAMN021	0	70	0	0	90	0 ^c	50 ^c
CAMN027	2,8	100	80	2,9	0	0 ^a	0 ^a
CAMN039	2,8	90	0	1,9	2	2 ^a	0 ^a
Media RIN ± EE	1,4 ± 0,81			1,2 ± 0,72		0,5 ± 0,5	

^a La reducción en el RIN máximo después del tratamiento a $\leq 3,1$ identificó correctamente a quienes respondieron en 19 de 20 casos (concordancia de 95 %);

5 ^b Los valores de RIN tumoral máximos por encima de 3,1 identificaron correctamente a quienes no respondieron en 16 de 25 casos (64 % de precisión);

^c Discrepancia entre el RIN máximo y la celularidad tumoral.

(g) Relación de la integridad del ARN tumoral y la respuesta clínica a la quimioterapia

10 Se examinó la relación entre la integridad del ARN tumoral y la respuesta clínica real a la enfermedad, dado que se consideró una medida importante de la utilidad de la integridad del ARN tumoral como biomarcadora de la respuesta a agentes quimioterapéuticos.

15 La respuesta de los pacientes al tratamiento de quimioterapia se midió de distintas maneras. Se consideró que los pacientes tuvieron una respuesta clínica (CR) completa si no se encontraban tumores después del tratamiento. Se consideró que los tumores cuyo volumen disminuyó en más de un 50 % tuvieron una respuesta parcial (PR) a la terapia. Los pacientes con tumores que no presentaron cambios en su tamaño se clasificaron con enfermedad estable (SD), mientras que los pacientes con tumores nuevos o cuyos tumores aumentaron en tamaño se consideraron con enfermedad progresiva (PD). Se consideró que los pacientes que tuvieron una resolución completa de la enfermedad a nivel microscópico presentaban una respuesta patológica completa (pCR). Mediante el uso de

20 de ARN tumoral promedio o máximos y la respuesta clínica a la terapia. Se calcularon los valores de RIN promedio y máximos, dado que uno o ambos pueden tener la mayor correlación con la respuesta clínica. Dentro de los

pacientes MA.22, se observó que 13 pacientes tuvieron CR, mientras que se consideró que 37 pacientes no respondieron (PR, SD o PD). Solamente 7 de los 50 pacientes presentaron una pCR. En particular, un RIN tumoral promedio bajo después del tratamiento se asoció de forma significativa con una CR ($p = 0,01$), mientras que un RIN máximo bajo se asoció con una pCR durante el tratamiento ($p = 0,01$), pero no después del tratamiento ($p = 0,28$).

5 La Figura 6 indica el valor de RIN tumoral máximo para cada paciente antes, durante y después del tratamiento. Los pacientes que presentaron una pCR después de la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel se muestran con líneas discontinuas. Todos los pacientes que tuvieron una pCR después de la quimioterapia presentaron una reducción en el RIN tumoral máximo durante el tratamiento. Asimismo, se observaron pCR y reducciones en los RIN tumorales preferiblemente en pacientes expuestos a niveles altos de dosis de fármacos (niveles 5 o superiores).

10 Se advirtió que si bien se observó una gran reducción en el RIN tumoral máximo durante el tratamiento en pacientes que presentaron pCR después del tratamiento, los valores del RIN tumoral aumentaron o se mantuvieron iguales, a pesar de la resolución completa de la enfermedad a nivel microscópico. Después de que se observaron descensos iniciales en el RIN durante el tratamiento, los valores del RIN tumoral aumentaron después del tratamiento en una cantidad de pacientes MA.22. Esto puede deberse a que puesto que los tumores mamarios son heterogéneos, el RIN tumoral medido reflejó la calidad del ARN de todas las células que componían al tumor, incluidos los tejidos mamarios normales y otros tipos de células. Tal como se muestra en la Tabla 4, la celularidad tumoral de la amplia mayoría de los tumores de los pacientes antes del tratamiento era muy alta ($90,94 \pm 2,17$).

Tal como se mencionó anteriormente, los valores de RIN muy reducidos observados durante el tratamiento reflejaron una pérdida de ARN y calidad de ARN específicamente en células tumorales. Habida cuenta de los resultados, sería de esperar que un valor de RIN tumoral bajo se correlacionaría con una pCR durante el tratamiento. Sin embargo, una vez que se retiran los fármacos quimioterapéuticos de los sistemas circulatorios de los pacientes después del tratamiento, es posible que tejidos mamarios normales y otros tejidos se infiltren en la lesión en aquellos que responden a la terapia y ya no tienen celularidad tumoral detectable. Por consiguiente, el ARN aislado de lesiones después del tratamiento puede derivar tanto de células normales como de células tumorales y un valor de RIN tumoral alto después del tratamiento puede no necesariamente indicar una reaparición de la enfermedad. Esto puede explicar por qué la relación entre los valores de RIN tumorales máximos y la pCR es más significativa cuando los pacientes se evalúan durante el tratamiento. Además, este puede ser el motivo por el cual los valores de RIN tumorales después del tratamiento son más confiables para predecir quiénes responden a la quimioterapia con epirrubicina/quimioterapia que quiénes no responden. Si las biopsias tumorales después del tratamiento incluyeran células no tumorales, lo cual sería de esperar, los pacientes que responden a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel (en particular, una pCR) serían aquellos pacientes que presentarían una gran reducción en el RIN tumoral durante o después del tratamiento.

Ejemplo 3: Uso de la calidad del ARN tumoral para determinar la capacidad de respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de quimioterapia

35 Según el método del Ejemplo 1, se extrae ARN de células tumorales de un paciente con cáncer con uno o más tumores en dos o más momentos diferentes durante la administración de un régimen de quimioterapia, antes de la administración de un régimen de quimioterapia y durante y/o después de la finalización del régimen.

Las células tumorales se recolectaron en una o más biopsias guiadas por imágenes. Se obtuvo una biopsia guiada por imágenes con medios guiados por imágenes tales como la tomografía computarizada (TC), rayos X, ultrasonido e imagenología por resonancia magnética (IRM).

Luego se determinó la calidad del ARN extraído mediante electroforesis capilar del ARN extraído y la cuantificación de los ARN en el electroferograma resultante. Se usa un sistema analítico automatizado, tal como el Agilent® 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., EUA) para realizar la determinación de la calidad del ARN, con el fin de obtener un número de integridad del ARN (RIN) para cada muestra de ARN (Schroeder, A. et al., *BMC. Mol. Biol.* 7 (2006) 3; Imbeaud, S. et al. *Nucl. Acids Res.* (2005), 33, 6, e56, 1-12).

El valor del RIN de las células tumorales recolectadas antes de la administración del régimen de quimioterapia se compara luego con el o los valores del RIN de las células tumorales recolectadas después del comienzo del régimen, es decir, durante el régimen y/o después de la finalización del régimen de quimioterapia. Si un paciente no presentara cambios en la integridad del ARN tumoral durante el tratamiento (patrón de respuesta A tal como se indica en el Ejemplo 2), el tumor del paciente se consideraría resistente al régimen de quimioterapia usado. Se consideraría que el paciente corre un riesgo alto de avance del tumor y el pronóstico se consideraría malo. Por lo tanto, se deberían considerar protocolos de tratamiento o regímenes de quimioterapia alternativos. El método definido en la presente puede repetirse para determinar la capacidad de respuesta al nuevo régimen.

Si un paciente presenta una reducción drástica en la integridad del ARN tumoral ($> 50\%$) antes y después del tratamiento (patrón de respuesta C indicado en el Ejemplo 2), se consideraría que el paciente ha respondido a la quimioterapia y correría un riesgo menor de avance del tumor. El pronóstico del paciente se consideraría bueno. Los valores de RIN del tumor cercanos a cero serían indicadores muy importantes de la respuesta a la quimioterapia y el riesgo bajo de avance del tumor.

Si un paciente presentara una reducción drástica en la integridad del ARN únicamente después del tratamiento (patrón de respuesta B tal como se indica en el Ejemplo 2), se consideraría que el paciente ha respondido a la quimioterapia y tendría un riesgo menor de avance del tumor. El pronóstico del paciente se consideraría bueno.

- 5 Si un paciente presenta un cambio drástico en la integridad del ARN tumoral únicamente durante el tratamiento, es probable que haya respondido a la terapia y tendría un riesgo menor de reaparición de la enfermedad. Esto es independiente de un regreso a una integridad del ARN "tumoral" alta después del tratamiento, dado que la calidad alta del ARN después del tratamiento puede derivar del tejido normal que se haya filtrado en la lesión. Sin embargo, en este caso, es posible que el tumor haya reaparecido después del tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de determinación de la capacidad de respuesta de tumores a un agente quimioterapéutico en una muestra que comprende ARN de células tumorales, obtenida a partir de un paciente con un tumor canceroso después de que el paciente ha recibido una o más dosis del agente quimioterapéutico, que comprende determinar la integridad del ARN evaluada mediante la degradación de la muestra y comparar la integridad del ARN de la muestra con un punto en el tiempo antes de la administración de la o las dosis del agente quimioterapéutico;

en donde una disminución en la integridad del ARN a lo largo del tiempo indica que el tumor responde al agente quimioterapéutico y una integridad alta del ARN de la muestra, en donde el ARN extraído presenta una degradación escasa o nula, indica que el tumor es resistente al agente quimioterapéutico.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la integridad del ARN se determina mediante: el cálculo de una relación del ARN ribosomal (ARNr) 28S:18S; o el uso de i) electroforesis capilar y ii) la cuantificación de diversos ARN separados en el electroferograma.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la integridad del ARN se expresa como un número de integridad del ARN (RIN), en donde el RIN comprende un cálculo de la integridad de ARN de múltiples ARN.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra es una muestra posterior al régimen de quimioterapia y/u obtenida durante un régimen de quimioterapia.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde un RIN de 3 o menos indica que el tumor responde al agente quimioterapéutico.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 5, en donde un RIN mayor a 3 indica que el tumor es resistente al agente quimioterapéutico.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra comprende células tumorales o una biopsia de tumor.
8. El método según la reivindicación 7, en donde el tumor canceroso es cáncer de mama.
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de antraciclinas, taxanos y/o combinaciones de estos.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el agente quimioterapéutico comprende epirrubicina y docetaxel.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde se aísla el ARN de células tumorales.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11, en donde el paciente es parte de un ensayo clínico.
- 30 13. Un método para determinar la capacidad de respuesta de un paciente a un agente quimioterapéutico, en un paciente con un tumor canceroso, que comprende determinar una integridad de ARN evaluada mediante la degradación de ARN en una muestra de células tumorales obtenida del paciente antes de la administración del agente quimioterapéutico, y compararla con la integridad del ARN de células tumorales determinada después de la administración del agente quimioterapéutico, en donde una disminución en la integridad del ARN después de la administración del agente quimioterapéutico indica que el paciente responde al agente quimioterapéutico.
- 35 14. Un método para adaptar un tratamiento de quimioterapia en un paciente con un tumor canceroso que comprende determinar la capacidad de respuesta del tumor a un agente quimioterapéutico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde una disminución en la integridad del ARN evaluada mediante la degradación del ARN en la muestra proporciona una indicación de que la quimioterapia debería continuar y en donde una ausencia de una disminución en la integridad del ARN de la muestra proporciona una indicación de que el tratamiento del cáncer debería alterarse, por ejemplo, mediante la alteración del nivel de dosificación y/o el cambio del agente quimioterapéutico.
- 40

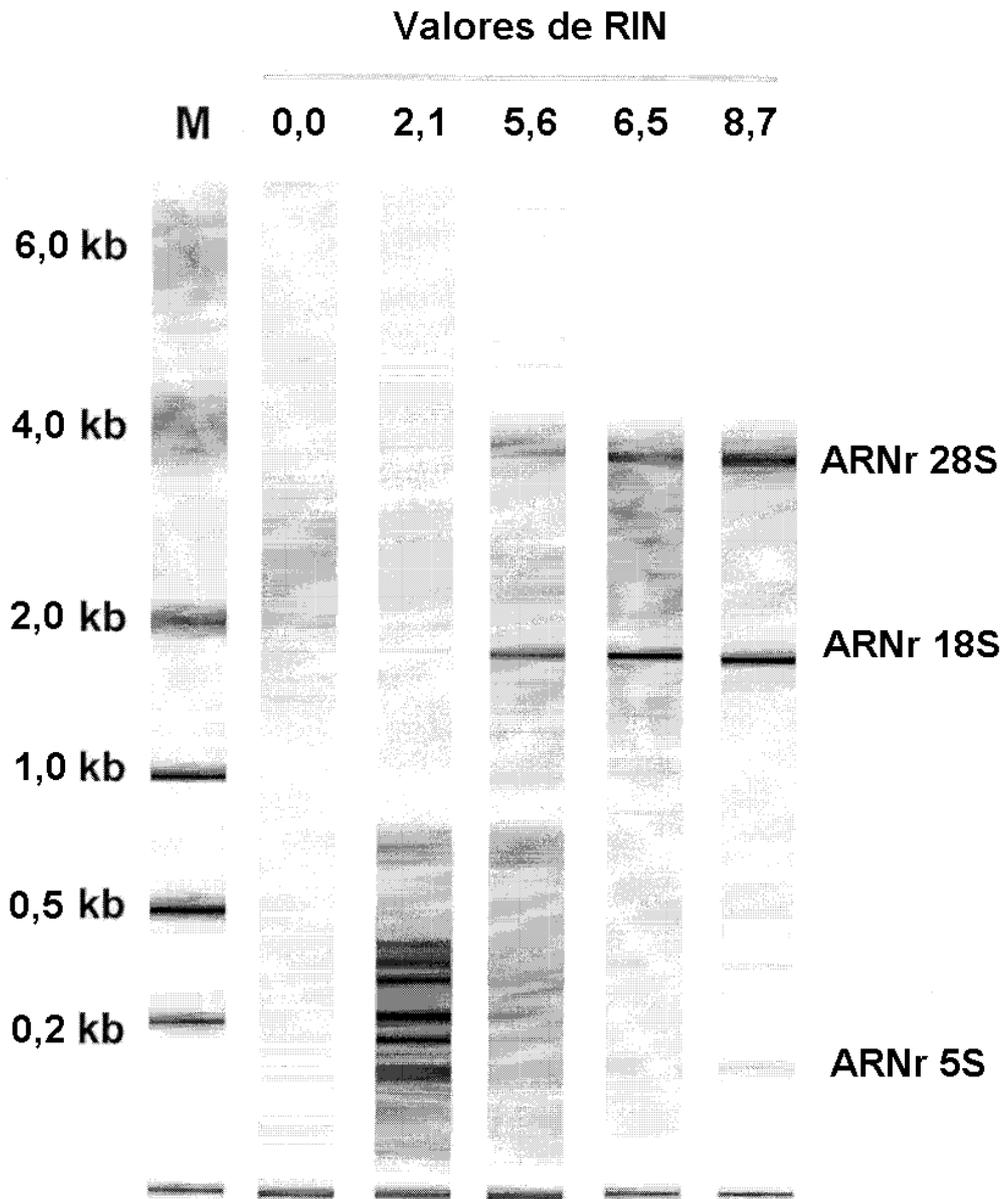


FIGURA 1

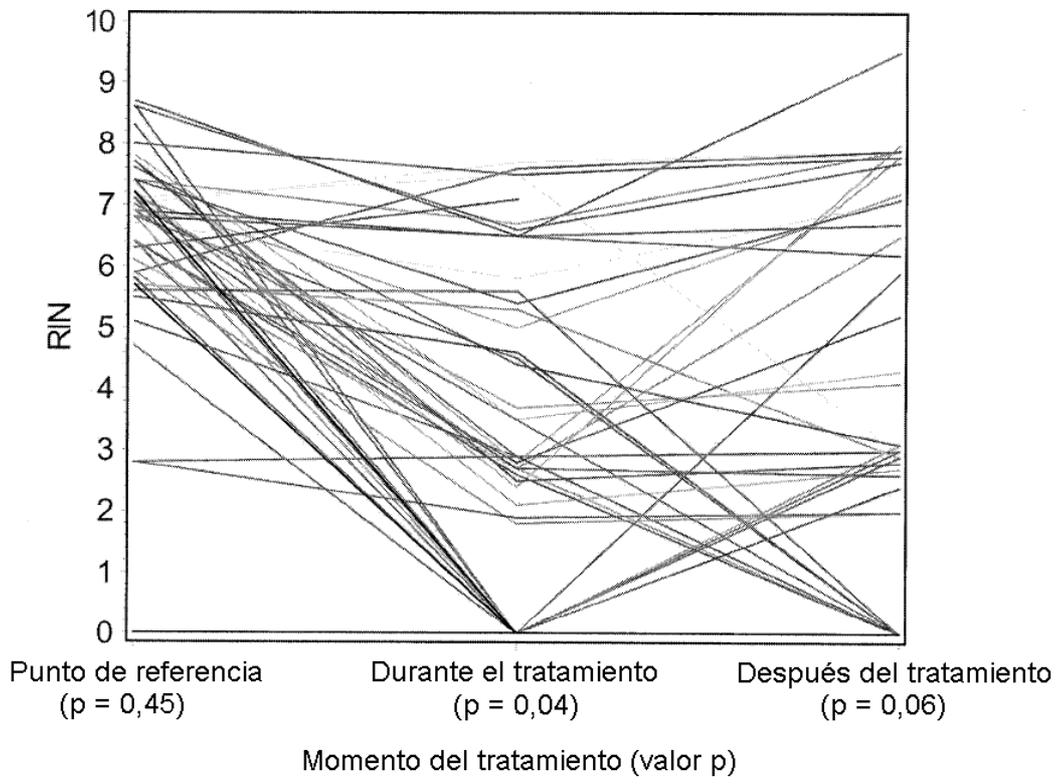


FIGURA 2

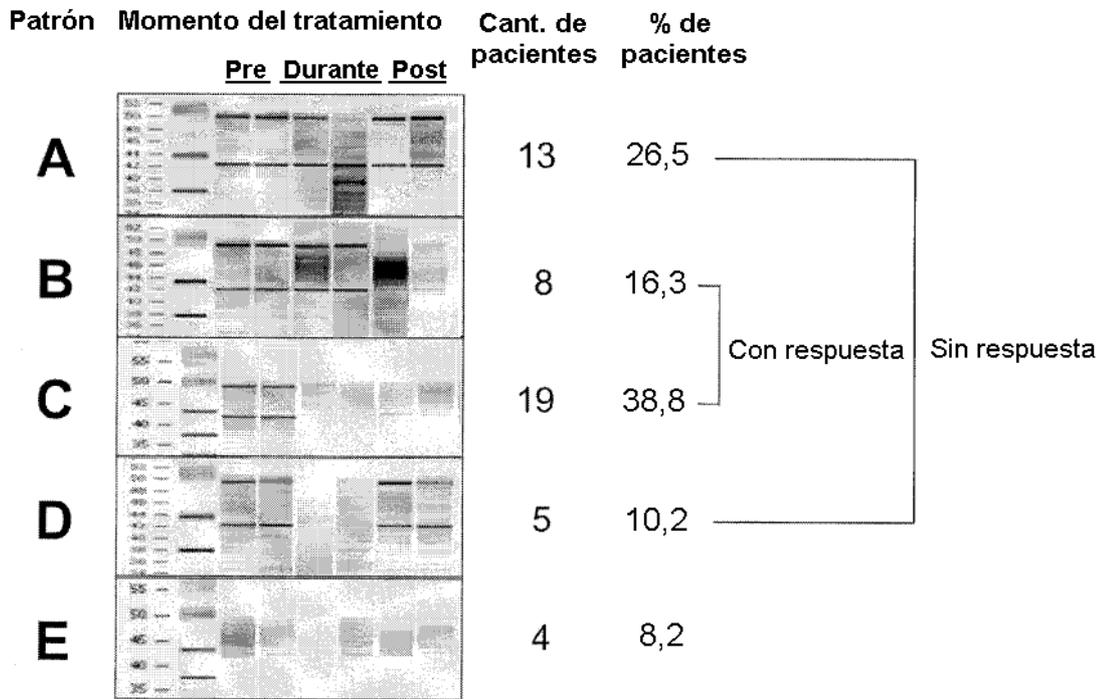


FIGURA 3

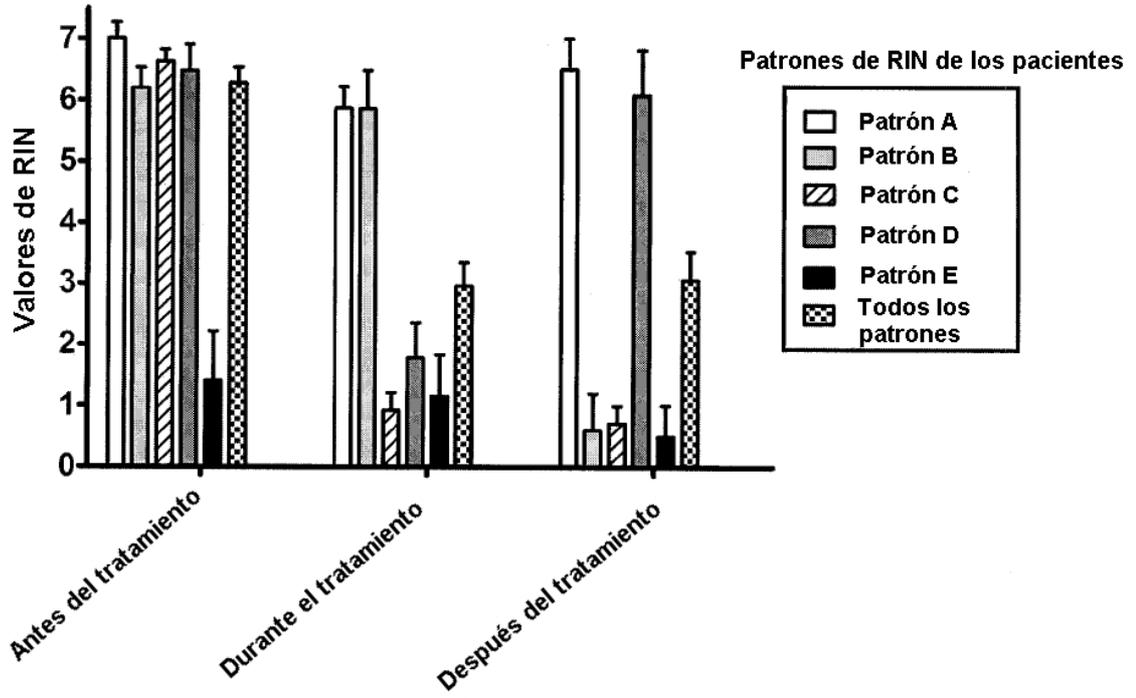


FIGURA 4

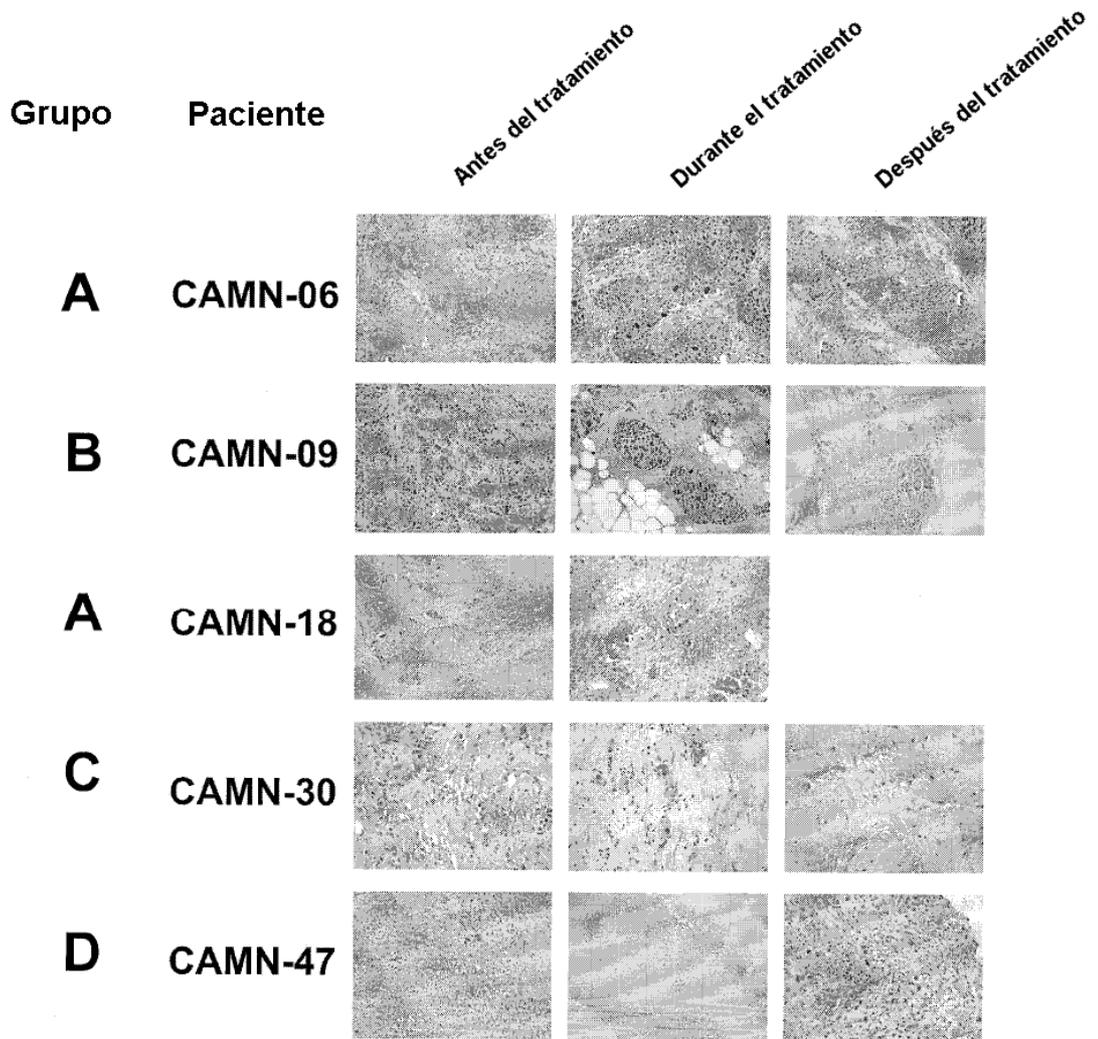


FIGURA 5

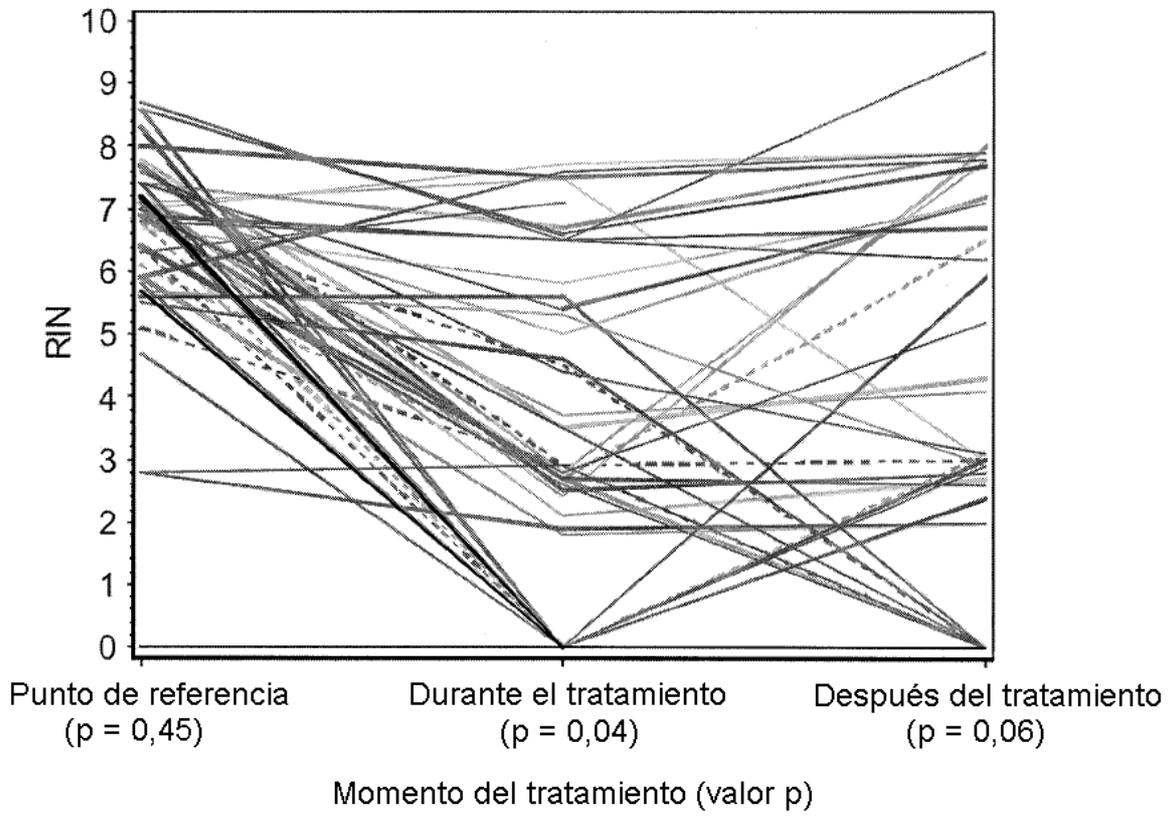


FIGURA 6