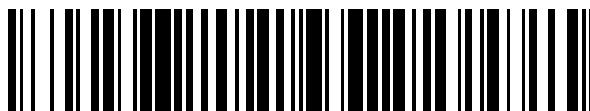


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 955**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.03.2010 PCT/EP2010/052894**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2010 E 10709192 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2403962**

54 Título: **Polimorfismo de CHK2 como marcador del cáncer**

30 Prioridad:

06.03.2009 EP 09154527

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

16.08.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT DUISBURG-ESSEN (100.0%)
Universitätsstrasse 2
45145 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**SIFFERT, WINFRIED y
RIEMANN, KATHRIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 629 955 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

Polimorfismo de CHK2 como marcador del cáncer

La invención se refiere a un procedimiento diagnóstico para determinar una terapia adecuada para el tratamiento de una enfermedad cancerosa.

5 Un aspecto esencial en el tratamiento del cáncer es primero la elaboración de un diagnóstico preciso. Esto conduce a conocimientos sobre en qué estadio se encuentra la enfermedad cancerosa, lo cual decide también a través de las siguientes modalidades terapéuticas, p. ej., extirpación quirúrgica del tumor con eventual irradiación y terapia farmacológica, eventualmente también con el empleo de procesos físicos (p. ej., hipertermia). El procedimiento describe el tamaño del tumor y la invasividad y examina si están afectados los ganglios linfáticos y si están presentes metástasis lejanas (p. ej., sistema TMN). En el caso de la clasificación, las células tumorales son examinadas histológicamente, asignándose a células tumorales altamente diferenciadas un potencial de tumor maligno bajo, como células débilmente diferenciadas o des-diferenciadas. En el caso de esta división, el poder predictivo individual para el paciente individual está limitado, y corresponde a la experiencia clínica el que pacientes con un estadio de tumor igual muestran cursos de la enfermedad claramente distintos y responden de manera diferente a una terapia, lo cual se manifiesta en última instancia en tiempos de supervivencia drásticamente diferentes.

10 Por este motivo, para la práctica clínica es necesario proporcionar marcadores adicionales y precisos que permitan un diagnóstico individual mejorado de una enfermedad cancerosa. Esto puede suceder a través de la incorporación de marcadores histoquímicos tal como tiene lugar en el caso de carcinoma de mama en el marco de la investigación de la expresión de receptores de estrógenos.

15 Una vía alternativa es la búsqueda de defectos génicos, p. ej., mutaciones somáticas en genes supresores de tumores. Estrategias más recientes intentan predecir el curso de la enfermedad con ayuda de perfiles de la expresión génica. Otro problema en el tratamiento del cáncer es la predicción de la eficacia de medicamentos contra el cáncer, la dosificación óptima individual o la duración de la terapia, pero también la predicción de la manifestación de efectos secundarios graves y amenazantes. Por ejemplo, polimorfismos genéticos en el gen *UGT1A1* pueden ser los responsables de que en algunos pacientes bajo terapia con irinotecan se manifiesten efectos secundarios graves. Un análisis previo del gen puede identificar este tipo de pacientes desde el comienzo de la terapia y posibilitar una adaptación de la dosis.

20 Junto a ello, terapias con medicamentos preparados en procedimientos biotecnológicos son caras y en el futuro se limitarán a los pacientes en los que parece probable un efecto en virtud de la disposición individual.

Propiedades básicas de tumores malignos

25 Las células cancerosas se caracterizan por una pérdida de la inhibición por contacto y un crecimiento celular descontrolado. Modificaciones de este tipo se desencadenan espontáneamente o por partes de noxas, los denominados carcinógenos que dañan a la herencia genética. A este tipo de noxas pertenecen muchos productos químicos, el humo del tabaco, pero también la luz UV. Junto a ello, factores genéticos en la formación del cáncer juegan un papel destacado. Característico de células cancerosas es, junto a su crecimiento descontrolado, también la tendencia de establecer en otros órganos tumores secundarios (metástasis). La propagación de las metástasis tiene lugar regularmente a través del torrente sanguíneo o a través de vasos linfáticos. Las enfermedades cancerosas son en una gran parte de los casos no curables y letales. Terapéuticamente se intenta eliminar mediante operación el tumor de origen y las metástasis. Además, los tumores también pueden ser irradiados. Mediante los denominados citostáticos, anticuerpos contra determinadas proteínas o marcadores de superficie o sustancias inmunomoduladoras (citoquinas, interferones), se intenta exterminar las células cancerosas que se multiplican rápidamente o conducir las a una muerte celular programada (apoptosis).

30 Es de gran relevancia médica definir factores de pronóstico para el transcurso de las enfermedades cancerosas, los cuales proporcionan información sobre la respuesta a determinadas formas terapéuticas o son en general predictivos para la manifestación de metástasis, el progreso del tumor y la supervivencia.

35 Evidentemente, existe una pluralidad de variables biológicas individuales y desconocidas que determinan el curso de una enfermedad tumoral, independientemente de la estadificación y la clasificación. A factores de este tipo pertenecen los factores del huésped genéticos. Junto a ello, es deseable desarrollar marcadores genéticos que sean predictivos para la manifestación de tumores. Marcadores de este tipo cumplen la función de aportar a los individuos afectados de manera prematura otras medidas de rastreo (serología, rayos X, ultrasonidos, MRT, etc.). Con ello, las enfermedades cancerosas pueden ser reconocidas en un estadio temprano y pueden ser tratadas, siendo las posibilidades de curación y supervivencia en el caso de tumores en estado temprano mejores que en el caso de tumores avanzados.

Determinación de mecanismos de reparación del ADN

Mediante mecanismos de reparación del ADN, las células pueden eliminar modificaciones nocivas de la estructura del ADN. Daños de este tipo en el ADN pueden ser provocados espontáneamente en el transcurso de la replicación del ADN o mediante la acción de sustancias mutagénicas, calor extremo o radiación ionizante. Los daños en el ADN pueden conducir a que la replicación del ADN tenga lugar de manera errónea para la mitosis, ya no puedan sintetizarse o lo hagan erróneamente las proteínas o importantes regiones de los cromosomas sean disociadas tras roturas de la doble cadena. Si los mecanismos de reparación complejos de la célula no proporcionan éxito alguno, entonces en células somáticas en desarrollo y en reposo se acumulan tantos errores que se perturban las funciones celulares normales. En un célula germinal, las células hijas ya no serían viables, lo cual conduce a una inactivación de la línea celular: la célula o bien la segunda a tercera generación siguiente pierde su capacidad de división y muere. En el transcurso del control del ciclo celular, proteínas de control pueden reconocer como defectuosa a una célula o bien a su ADN e iniciar una detención del ciclo o la muerte celular programada (apoptosis).

Importancia de la quinasa checkpoint (punto de control) 2

La misión más importante de una célula es conservar la integridad genómica. Por este motivo, existen diversos mecanismos de control que garantizan de que todos los procesos se puedan completar correctamente dentro del ciclo celular. Estos mecanismos de control se designan como "checkpoints"^[1]. En este caso, no se trata de un punto firmemente definido, como la propia palabra implica, sino de una cascada de reacciones que puede ser iniciada bajo determinadas circunstancias.

Hasta ahora se han caracterizado varios checkpoints del ciclo celular. Los checkpoints mejor investigados en mamíferos se representan en la Figura 1. Por una parte, existe el checkpoint de daño en el ADN, el cual puede ser activado mediante el daño en el ADN en diferentes fases del ciclo celular. Este daño puede ser provocado tanto por motivos exógenos, tales como radiación, como por procesos endógenos, p. ej., mutaciones espontáneas. Por otra parte, mediante una replicación del ADN no completa o defectuosa entra en funcionamiento el checkpoint de la replicación. El checkpoint del husillo vigila la formación de los husillos bipolares, la acumulación de los cinetocoros y la formación nueva de las estructuras centrómeras.

Hasta que estos procesos no hayan concluido por completo o bien no se haya eliminado la lesión, se inhibe la entrada de la célula a la siguiente fase del ciclo celular, con el fin de garantizar que se conserve la integridad genómica de la célula.

La quinasa checkpoint 2 está implicada en mecanismos de control esenciales en el ciclo celular, que garantizan que se minimice la transmisión de defectos a las células hijas. Las cascadas de reacción de CHK2 determinantes, que son activadas en el caso de diferentes checkpoints, están representadas en la Figura 2. En virtud de las lesiones de ADN se fosforila ATM (*ataxia-telangietctasia mutada*) y, con ello, se activa. ATM activa de nuevo a CHK2 a través de una fosforilación en una treonina (Thr) en la posición 68 del aminoácido. Esta fosforilación es una premisa, para la capacidad de la formación de dímeros, a través de los cuales se puede auto-fosforilar CHK2. Sólo de esta forma puede presentarse CHK2 totalmente activada y activar sus efectores, a través de los cuales en células defectuosas pueden inducirse una detención en el ciclo celular durante la fase G1, S o G2/M, la activación del sistema de reparación del ADN o la apoptosis.

A los efectores de CHK2 pertenece p53 (*proteína tumoral 53*) que es fosforilada por parte de CHK2 en la serina (Ser) 20 y, con ello, es estabilizada. p53 regula a continuación factores que están implicados positivamente en la reparación de daños en el ADN, la apoptosis y el control del ciclo celular. También BRCA1 (*gen del cáncer de mama 1*) pertenece a los sustratos de CHK2. Es fosforilado por parte de CHK2 en Ser988 y, con ello, es liberado de su complejo con CHK2, lo cual conduce de nuevo a la detención del ciclo celular, con el fin de reparar ADN dañado. CDC25C (*ciclo de división celular 25C*) es fosforilado asimismo mediante CHK2 en Ser216, con lo cual se inhibe su propia actividad de fosfatasa y se degrada citoplasmáticamente. Cdk1 (*quinasa dependiente de ciclina 1*) no puede ser entonces activada y se impide que células con ADN dañado entren en la mitosis. Además, mediante CHK2, CDC25A es fosforilada en Ser123, tras lo cual es ubiquitinizada y se degrada de forma dependiente al proteasoma. Esta proteína juega un papel importante para el avance de la célula en el ciclo celular, lo cual se inhibe no obstante por parte de la degradación.

CHK2 juega un papel importante en la transducción de señales iniciada por el daño en el ADN. Se examinó la importancia fisiológica de CHK2, generando ratones *inmunodeficientes*. Tanto ratones *Chk2*^{-/-} como también *Chk2*^{+/-} eran viables. No obstante, después de una irradiación con dosis sub-letales (8 Gy) se manifestaron tiempos de supervivencia de diferente duración: la supervivencia mediana de ratones de tipo salvaje y *Chk2*^{+/-} era significativamente más corta que la de ratones *Chk2*^{-/-}. Por consiguiente, en el caso de ratones *Chk2*^{-/-} se manifestó una radiorresistencia que es provocada por una tasa de apoptosis reducida, inducida por la radiación. Mientras que el checkpoint G2/M en el caso de ratones *Chk2*^{-/-} no estaba mermado, el checkpoint G1/S se puede ciertamente iniciar, pero no mantener. Esto se remonta a una actividad de la transcripción reducida de p53. Además, sólo en el caso de ratones *Chk2*^{-/-} se desarrollaron tumores, a diferencia de ratones que todavía poseen al menos un alelo *Chk2* funcional.

La presente invención tiene, por lo tanto, la misión de proporcionar un método que permita un pronóstico mejor del curso natural de una enfermedad cancerosa y la respuesta a cualquier forma de terapia. En particular, este método debe estar también en condiciones de reconocer a aquellos pacientes en los que mecanismos de reparación del ADN incrementados dificultan una terapia del cáncer.

- 5 Este problema se resuelve mediante un procedimiento in vitro para la predicción del riesgo de enfermedad para una enfermedad cancerosa, del curso de la enfermedad, del aprovechamiento de medicamentos y del riesgo de medicamentos en el caso del tratamiento de una enfermedad cancerosa en la que en una muestra de un paciente después de una o varias modificaciones del gen se busca en la región del promotor del gen *CHK2* el cromosoma humano 22q12.1 y la modificación del gen se elige del polimorfismo -7161G>A, el polimorfismo -7235C>G, el polimorfismo -10532G>A y el polimorfismo -10649(-10621)del 29.

Objeto de la invención es también el uso de los polimorfismos antes mencionados para los fines precedentemente indicados.

Por consiguiente, la invención se dirige a

- 15 a. proporcionar polimorfismos genómicos modificadores de la función en el promotor del gen *CHK2* que conduzcan a la modificación de la expresión de proteínas o a la modificación de la expresión de variantes de corte y empalme, o
- b. que son adecuados para encontrar y/o validar otros polimorfismos o bien haplotipos en el gen *CHK2*,
- c. proporcionar polimorfismos que sean adecuados para predecir riesgos y cursos de las enfermedades en general,
- d. proporcionar polimorfismos que sean adecuados para responder en general a fármacos y terapias contra el cáncer, en particular inhibidores de *CHK2*, y predecir efectos secundarios,
- 20 e. proporcionar polimorfismos que sean adecuados para predecir en general el efecto de otras formas terapéuticas (tales como radiación, calor, frío).

Debido a la importancia fundamental de *CHK2* para el mantenimiento de la integridad genómica, este tipo de polimorfismos son adecuados para predecir en general riesgos de enfermedades o bien transcurros en el caso de enfermedades cancerosas o bien predecir respuestas a la terapia/fracasos de terapia o efectos secundarios indeseados para todos los fármacos o terapias no farmacológicas.

5 DetECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL PROMOTOR DEL GEN *CHK2*

En la región del promotor de *CHK2* se conocen tres polimorfismos y en general se encuentran en bancos de datos accesibles. Mediante la secuenciación sistemática de muestras de ADN del hombre se detectaron y validaron estos tres polimorfismos: -7161G>A (rs2236141), -7235C>G (rs2236142) y -10532G>A (rs5762767) (Figura 5). Para ello, 30 secuencias de genes de la sección del promotor de *CHK2* se amplificaron mediante reacción PCR y se secuenciaron conforme al método de Sanger. Los procedimientos necesarios para ello, p. ej., la derivación de pares de cebadores necesarios para la reacción PCR y la elección de cebadores de secuenciación son habituales para el experto en la materia. En este caso, se encontró un nuevo polimorfismo, en el que se trata de una delección de 29 pares de bases (-10649(-10621)del 29, ningún reconocimiento presente de dbSNP) (Figura 5). La numeración de estos SNPs tiene 35 lugar de manera que al nucleótido A del codón de inicio ATG se le asigna el número +1. Dado que, de manera correspondiente a la convención, no existe el número 0, al nucleótido situado delante de A del codón de inicio ATG se le asigna el número -1.

La detección de estos polimorfismos en el sentido de su uso conforme a la invención puede realizarse según procedimientos arbitrarios, habituales para el experto en la materia, p. ej., secuenciación directa, PCR con 40 subsiguiente análisis de restricción, hibridación inversa, procedimientos de punto-mancha o ranura-mancha, espectrometría de masas, tecnología Taqman[®] o Light-Cycler[®], Pyrosequencing[®], tecnología Invader[®], procedimiento Luminex. Además, estos polimorfismos de genes pueden detectarse al mismo tiempo según la PCR Multiplex e hibridación a un chip de ADN.

En general, todas las células del cuerpo humano pueden degenerar para ser malignas y conducir a una enfermedad cancerosa. Los mecanismos generales descritos aquí y en las realizaciones adicionales de la progresión de tumores, de la metastatización y de la respuesta terapéutica. En este sentido, los mecanismos y reivindicaciones aquí descritos son válidos para todos los tumores del hombre. Los siguientes se mencionan sólo a modo de ejemplo.

50 Tumores del tracto urogenital tal como el carcinoma de células renales, el carcinoma de próstata y el seminoma; tumores de los órganos sexuales femeninos tales como el carcinoma de mama, el carcinoma del cuerpo, el carcinoma de ovario, el carcinoma de cérvix; tumores del tracto gastrointestinal tal como el carcinoma de la cavidad oral, el carcinoma del esófago, el carcinoma del estómago, el carcinoma del hígado, el carcinoma del conducto biliar, el carcinoma del páncreas, el carcinoma del colon, el carcinoma del recto; tumores del tracto respiratorio tal como el carcinoma de laringe, el carcinoma bronquial; tumores de la piel tal como el melanoma maligno, el basalioma y el linfoma de células T; enfermedades tumorales del sistema formador de la sangre tales como linfomas

de Hodgkin y no Hodgkin, leucemias agudas y crónicas, plasmocitoma; enfermedades tumorales del cerebro o bien del tejido nervioso tales como glioblastoma, neuroblastoma, meduloblastoma, sarcoma meníngeo, astrocitoma, así como tumores de partes blandas tales como sarcomas y tumores de cabeza-cuello.

El gen *CHK2*

5 El gen *CHK2* humano está localizado en el cromosoma 22q12.1 (número de acceso a Gene bank NM_007194) y codifica una proteína de 65 kD de tamaño que es expresada de forma nuclear. En este punto, se ha de apuntar que el gen tiene tanto la denominación “*CHK2*” como también la denominación “*CHEK2*”. En lo que sigue, se utilizará aquí la denominación “*CHK2*”. Una representación esquemática de la estructura del gen se encuentra en la Figura 3. La región activa del promotor de *CHK2* fue ya caracterizada. La secuencia del promotor contiene numerosos puntos de unión para el factor de transcripción SP1, cuya unión refuerza la actividad transcripcional. Una regulación positiva de *CHK2* fue observada asimismo mediante una unión de NF-Y a cajas CCAAT.

Mutaciones somáticas en *CHK2*

15 *CHK2* es considerado como un potencial gen supresor de tumores, dado que juega un gran papel en la detención del checkpoint después del daño en el ADN, y diferentes sustratos supresores de tumores son sustratos de *CHK2*. Mutaciones somáticas en este gen pudieron detectarse hasta ahora en algunos pacientes con tumores esporádicos, p. ej., tumores colorrectales, carcinoma de pulmón, próstata y mama, así como en el caso de pacientes con el síndrome de Li-Fraumeni, un fenotipo multitumoral. A diferencia de *polimorfismos de un solo nucleótido* (SNPs), estas mutaciones no se encontraron en los pacientes correspondientes, por ejemplo no en las células de la sangre periférica.

20 **Riesgo de enfermedades tumorales mediante variaciones en *CHK2***

Hasta ahora se ha conseguido reiteradamente detectar variaciones genéticas en *CHK2* en diferentes enfermedades tumorales y asociar éstas con el riesgo de enfermedad. En este caso, no se trata de variantes genéticas frecuentes, sino de mutaciones raras (frecuencia < 1%) que en grandes colectivos de pacientes se podían detectar con mayor frecuencia que en controles sanos. Hasta ahora sólo se ha publicado un estudio en el que se examinaron no sólo estas mutaciones raras, sino también SNPs que se manifiestan a menudo. En este caso, se analizó también el polimorfismo de promotor -7161G>A (rs2236141) en cuanto al riesgo de la formación de un carcinoma de mama. No obstante, no pudo detectarse asociación alguna (Baynes et al. Common variants in the ATM, BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 cancer susceptibility genes are unlikely to increase breast cancer risk. 2007 Breast Cancer Res 9:R27).

30 **Inhibidores de *CHK2* como agentes quimioterapéuticos**

Dado que los checkpoints están implicados en muchas cascadas reguladoras, son una diana adecuada para agentes terapéuticos contra el cáncer. En ello cooperan determinadas propiedades de las proteínas checkpoint: (1) el sistema de transducción de señales complejo de checkpoints ofrece una pluralidad de dianas de ataque, (2) en células sanas, algunos checkpoints parecen carecer de una importancia relativa, lo cual reduce fuertemente la toxicidad de los inhibidores, (3) el restablecimiento de checkpoints defectuosos podría conducir a una ralentización del crecimiento de las células, (4) como sistema de transducción de señales, los checkpoints se someten a la adaptación que podría ser interrumpida y (5) el restablecimiento de checkpoints perjudicados podría aumentar la tasa de apoptosis de células cancerosas y, por consiguiente, aumentar su sensibilidad frente a determinadas sustancias.

40 A diferencia de estos puntos, que se pueden realizar lo más probable a través de una estrategia de terapia génica, otras dos propiedades de los checkpoints representan puntos de ataque más fácilmente realizables. Células con checkpoints defectuosos muestran una sensibilidad fuertemente incrementada o una resistencia incrementada frente a la radiación y sustancias citotóxicas. La inhibición de *CHK2* parece sensibilizar particularmente a células p53-deficientes para los agentes dañinos para el ADN y en este caso proteger al tejido normal frente a un daño y, con ello, frente a efectos secundarios. Por lo tanto, la inhibición de *CHK2* pertenece a una estrategia prometedora para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer.

Diversos inhibidores de *CHK2* son ya conocidos o bien han sido desarrollados. Junto a las sustancias inhibidoras UCN-01 y DBH (debromohimendaldisina), más bien inespecíficas, están ahora disponibles también potentes inhibidores de *CHK2* específicos. A ellos pertenecen el inhibidor de *CHK2* 2(2-(4-(4-clorofenoxi)fenil)-1H-benzo(d)imidazol-5-carboxamida, VRX0466617 (5-(4-(4-bromofenilamino)fenil-amino)-3-hidroxi-N-(1-hidroxiopropan-2-il)isotiazol-4-carboximidamida) y NSC 109555 ((2E,2'E)-2,2-(1,1'-(4,4'-carbonil-bis(azanodiil))bis(4,1-fenilen))bis(etan-1-il-1-iliden))bis(hidrazincarboximidamida), que podrían cooperar en la reducción de efectos secundarios bajo la terapia de radiación (Figura 4).

Activadores de *CHK2* como agentes quimioterapéuticos

55 Bajo determinadas circunstancias, también los activadores de *CHK2* podrían, sin embargo, representar una alternativa en la terapia contra el cáncer. *CHK2* juega un papel en la supresión de la oncogénesis, y su activación

5 puede hacer que células tumorales cesen en el estado proliferativo y mueran, cuando no están presentes agentes que dañen el ADN. Además, con ello se induce una fuerte detención de G2. La estrategia de activación podría compensar un inconveniente de los inhibidores: los tumores son muy heterogéneos y, por lo tanto, puede que no siempre sea suficiente desconectar una cascada de señales. Esta heterogeneidad podría ser contrarrestada con la supra-activación de mecanismos conservados del ciclo celular que comparten muchos tipos de células tumorales.

Distribución de los polimorfismos -7161G>A, -7235C>GT, -10532G>A y -10649-(-10621)del 29, detección de haplotipos y uso de estos tipos de genes para encontrar otros polimorfismos y haplotipos relevantes.

Para ello se genotiparon diferentes muestras de ADN de caucasianos. El resultado se representa en la siguiente tabla:

Polimorfismo	Genotipo		
-7161G>A	GG: 188	GA: 43	AA: 4
-7235C>G	CC: 25	CG: 88	GG: 121
-10532G>A	GG: 188	GA: 43	AA: 4
-10649-(-10621)del 29	II: 56	ID: 109	DD: 56
I: inserción, D: delección			

10 Otros análisis mostraron en el caso de estas muestras de ADN de caucasianos sanos un equilibrio de acoplamiento entre determinados polimorfismos. Por equilibrio de acoplamiento se entiende la aparición de combinaciones de alelos (haplotipos) que se presentan estadísticamente claramente con mayor frecuencia o menor en común que lo que sería de esperar en relación con su frecuencia. En este caso, se comprobó que los polimorfismos -7161G>A y -10532G>A se acoplan entre sí por completo. Por el contrario, los polimorfismos -7235C>G y -10649-(-10621)del 29 no se acoplan entre sí y sólo de forma limitada a las otras dos variantes (Figuras 6A y B). La calidad del acoplamiento se caracteriza por los valores D' y r^2 . Con ello, en el caso de $D' = 1$ y $r^2 = 1$ se habla de un acoplamiento significativo. Cuanto más próximos estén estos valores a 1, tanto más estrecho será el equilibrio de acoplamiento. El cálculo de los haplotipos que pueden ser construidos a partir de estos cuatro polimorfismos proporciona diferentes combinaciones de alelos. No existe un haplotipo preferente que resulte de estas variantes de promotor (Figura 6C). Con el fin de determinar todas las combinaciones posibles, es necesaria la detección de al menos tres de los cuatro polimorfismos.

25 Un objeto de la invención es que estos nuevos polimorfismos se pueden utilizar con el fin de detectar y validar modificaciones de genes genómicas relevantes adicionales en *CHK2* o genes contiguos que, por ejemplo, están en equilibrio de acoplamiento con los genotipos en el gen *CHK2*. Estos pueden ser también genes que se encuentran asimismo en el cromosoma 22, pero a gran distancia del gen *CHK2*. Para ello, se procede de la siguiente forma:

1. Para determinados fenotipos (tales como propiedades celulares, estados patológicos, cursos de las enfermedades, respuesta a los medicamentos) se crea primero una asociación con los polimorfismos -7161G>A, -7235C>G, -10532G>A y -10649-(-10621)del 29, pudiendo formarse estas asociaciones para cada uno de los genotipos individualmente o utilizando todas las permutaciones de los haplotipos.
2. Para modificaciones de genes detectadas recientes en *CHK2* o genes contiguos se examina si asociaciones ya existentes son potenciadas o debilitadas utilizando los genotipos o haplotipos arriba descritos.

A continuación se explican brevemente las figuras.

Figura 1: Representación esquemática del ciclo celular con los checkpoints más importantes

Figura 2: Representación gráfica de la cascada de reacciones en los checkpoints regulados por *CHK2*

35 **Figura 3:** Estructura del intrón/exón del gen *CHK2* humano (no a escala)

Figura 4: Fórmulas estructurales de algunos inhibidores de *CHK2*

Figura 5: Representación esquemática de los polimorfismos en el gen *CHK2* (no a escala)

40 **Figura 6:** Análisis de acoplamiento de los polimorfismos de promotor de *CHK2* con el programa Haploview; A- representación gráfica del acoplamiento de los polimorfismos entre sí; los cuadrados en negro indican $r^2 = 1$, los cuadrados en gris $r^2 < 0,5$ y los cuadrados en gris claro $r^2 < 0,1$; B- frecuencias y posibilidades de acoplamiento de los distintos alelos; C- frecuencias de los haplotipos construidos; alelos que se caracterizan con un triángulo se designan como los denominados *alelos etiquetadores del haplotipo*, es decir, estos alelos deben ser determinados con el fin de determinar los respectivos haplotipos.

Figura 7: Puntos de unión supuestos para factores de transcripción en el promotor del gen *CHK2*; las bases marcadas en rojo representan los alelos del polimorfismo respectivo.

Figura 8: Resultados del ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) con construcciones que contienen los distintos alelos del polimorfismo -7235C>G de *CHK2*. Después de la adición de extracto celular, se reconoce una unión incrementada de proteína del núcleo en el alelo C. La unión es inhibida específicamente por la presencia de un oligonucleótido represor.

Figura 9: Resultado del ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) con construcciones que contienen los distintos alelos del polimorfismo -10649-(-10621)del 29 de *CHK2*. Después de la adición de extracto del núcleo celular se reconoce que los dos alelos conducen a una unión de un factor de transcripción que puede ser rivalizado en cada caso por el otro alelo. En este caso se trata, sin embargo, de diferentes factores de transcripción.

Figura 10: Actividad del promotor de *CHK2* en función del polimorfismo -10649-(-10621)del 29, determinado mediante el ensayo de informador SEAP; **: $p < 0,01$.

Figura 11: Expresión de ARNm de *CHK2* en función del polimorfismo -7161G>A. Se representa el cociente ARNm de *CHK2*/β-actina. A: carcinoma de mama, B: CLL; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$.

Figura 12: Expresión de ARNm de *CHK2* en función del polimorfismo -7235C>A. Se representa el cociente ARNm de *CHK2*/β-actina. A: carcinoma de mama, B: CLL; *: $p < 0,05$.

Figura 13: Expresión de ARNm de *CHK2* en función del polimorfismo -10649-(-10621)del 29 en pacientes con carcinoma de mama. Se representa el cociente ARNm de *CHK2*/β-actina.

Figura 14: Análisis según Kaplan-Meier para la supervivencia de pacientes con carcinoma colorrectal en función del genotipo del polimorfismo -7161G>A.

Figura 15: Análisis según Kaplan-Meier para la supervivencia de pacientes con leucemia linfática crónica en función del genotipo del polimorfismo -7235C>G; *: $p < 0,05$.

Figura 16: Análisis según Kaplan-Meier de pacientes con carcinoma de células renales de los estadios 3 y 4. A: supervivencia en función del genotipo del polimorfismo -7161G>A, B: supervivencia libre de progreso en función del genotipo del polimorfismo -7161G>A, C: supervivencia en función del polimorfismo -7235C>G; ***: $p < 0,001$; *: $p < 0,05$.

Figura 17: Análisis según Kaplan-Meier para la supervivencia de pacientes con carcinoma de mama en función del genotipo del polimorfismo -10649-(-10621)del 29.

Figura 18: Análisis según Kaplan-Meier de pacientes con glioblastoma. A: supervivencia, B: supervivencia exenta de recidiva en función del genotipo del polimorfismo -10649-(-10621)del 29, C: supervivencia, D: supervivencia exenta de recidiva en función del polimorfismo -7235C>G; ***: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$.

Figura 19: Análisis según Kaplan-Meier para la supervivencia de pacientes con carcinoma de próstata en función del genotipo del polimorfismo -7161G>A; **: $p < 0,01$.

Importancia funcional de los polimorfismos de promotor en el gen *CHK2*

Se investigó qué variaciones funcionales se han de asociar a los polimorfismos de promotor en el gen *CHK2*. Son imaginables en este caso, por ejemplo, una correlación con cortes y empalmes alternativos, la expresión específica para el tejido o una sobre-expresión de la proteína *CHK2* en función de genotipos o bien haplotipos del promotor de *CHK2*. Para ello, se examinó primeramente mediante un programa de ordenador si los intercambios de nucleótidos encontrados pueden influir sobre la unión de factores de transcripción. Los factores de transcripción se unen a secuencias consenso específicas, y pueden aumentar o reducir la actividad del promotor, de modo que resulta una transcripción reducida del gen y, por consiguiente, se aumenta o reduce la expresión de la proteína codificada. Tal como se representa en la Figura 7, todos los SNPs de promotor arriba mencionados se encuentran en una secuencia de consenso para puntos de unión de diferentes factores de transcripción (p. ej., p53, NF-κB o Mef2), cuya unión puede ser perjudicada por los polimorfismos. La aparición de determinados genotipos conduce a una supresión o a una formación renovada de estos puntos de unión mediante la modificación de sus secuencias consenso. Para el examen experimental de este efecto se lleva a cabo un denominado EMSA (ensayo de cambio de movilidad electroforética). En el caso de este ensayo, segmentos cortos de ácidos nucleicos que contienen el respectivo polimorfismo se incuban con extractos de núcleos celulares. Proteínas del factor de transcripción que se encuentran en estos extractos se unen entonces con una intensidad diferente a los segmentos de ácido nucleico. La unión al ADN se visualiza finalmente en una película de rayos X. En este caso, a partir de una fuerte unión resulta una banda intensa. La Figura 8 muestra el resultado de este ensayo con construcciones específicas que contienen el alelo C o el alelo G del polimorfismo -7235C>G. La presencia de la banda de construcción C demuestra una unión de un factor de transcripción a esta región. La construcción G no presenta esta banda, lo cual demuestra que a este alelo no se une factor de transcripción alguno. El debilitamiento de la intensidad de la banda por parte de un

oligonucleótido específico demuestra que en el caso del factor de transcripción que se une se trata de una unión específica. La Figura 9 muestra el resultado de este ensayo con construcciones específicas que contienen el alelo de inserción o el alelo de delección del polimorfismo -10649-(-10621)del 29. Ambos alelos conducen a una unión de un factor de transcripción que puede ser rivalizado en cada caso por el otro alelo. En este caso se trata, sin embargo, de diferentes factores d transcripción. En la Figura 10 se representa, además, que la unión del factor de transcripción al alelo de delección conduce a una activación del promotor más intensa que en el caso de un alelo de inserción.

Seguidamente se examinó la expresión de *CHK2* en el plano del ARNm mediante PCR en tiempo real en tejido humano. Para ello, se obtuvo ARNm de tejido de operación humana en el caso de operaciones de carcinoma de mama, así como de células de la sangre de pacientes de leucemia y se transcribió mediante transcriptasa inversa en ADNc. El procedimiento es habitual para el experto en la materia. Seguidamente, el nivel de expresión se determinó mediante PCR en tiempo real (procedimiento Taqman) y se comparó con el nivel de expresión del gen constitutivo \square -actina.

Los resultados están representados en las Figuras 11 a 13. La Figura parcial 11A muestra que el genotipo GG del SNP -7161G>A presenta una expresión de ARNm significativamente mayor en carcinomas de mama que el genotipo GA. También la Figura 11B muestra una expresión incrementada de ARNm para el genotipo GG en pacientes de CLL. También el polimorfismo -7235C>G muestra una diferencia dependiente del alelo en la expresión del gen. Tal como muestran las Figuras 12A y 12B, portadores del alelo de C tienen claramente menos ARNm de *CHK2* que los portadores del genotipo GG. Esto es cierto para pacientes de carcinoma de mama y para pacientes de CLL. La Figura 13 representa una expresión incrementada de ARNm para la delección homocigótica en el caso de pacientes de carcinoma de mama. La inserción homocigótica presenta la expresión más baja. El genotipo heterocigoto se encuentra entremedias. En este caso, se observa un efecto gen-dosis.

Con ello, se determinó que en el gen *CHK2* existen modificaciones del gen que determinan una variación de la expresión de *CHK2* en tejido de carcinoma. Esto pueden ser los polimorfismos de promotor arriba descritos o polimorfismos que están en equilibrio de acoplamiento con estos SNPs. Componente de la invención descrita en esta memoria es, por consiguiente, también la expresión de cuantificar *CHK2*, asociarlo con polimorfismos conocidos del *CHK2* y descubrir y validar nuevos polimorfismos todavía más adecuados.

Los hallazgos mostrados en esta memoria de una expresión dependiente del genotipo de *CHK2* en tejido de carcinoma humano es sumamente importante, dado que una actividad menor de *CHK2* puede provocar una inestabilidad de microsatélites y cromosomal, las cuales pertenecen ambas a la denominación inestabilidad genómica y, con ello, favorecen la oncogénesis y repercuten negativamente sobre el progreso del tumor (Ahn et al. The *CHK2* protein kinase, 2004 DNA Repair 3: 1039-1047). Además, esta expresión génica de *CHK2* dependiente del genotipo puede repercutir también sobre la respuesta a una terapia con inhibidores de *CHK2*. Es de espesar que una expresión génica baja, predispuesta por un determinado genotipo, p. ej., el genotipo CC del polimorfismo -7235C>G, responda más intensamente a inhibidores de *CHK2* que otros genotipos. Con ello, variaciones génicas en el gen *CHK2* pueden utilizarse para predecir la respuesta a una terapia contra el cáncer con el fin de discriminar, por ejemplo, respondedor frente a no respondedor. Estas variaciones génicas pueden emplearse también para un hallazgo de la dosis o bien para la predicción de la aparición de efectos medicamentosos indeseados. Terapias contra el cáncer de este tipo pueden tener lugar de forma medicamentosa en el sentido más amplio, es decir, mediante la aportación de sustancias al cuerpo, o estos agentes terapéuticos contra el cáncer pueden ser físicamente eficaces (tales como radiación, calor, frío).

Los autores de la invención esperan, por consiguiente, la influencia sobre los cursos de enfermedades, en particular en el caso de enfermedades tumorales, así como una respuesta modificada a sustancias que influyen sobre la cascada de regulación de *CHK2* o sustancias que inhiben directamente *CHK2*.

Usos de variaciones génicas en *CHK2* para la predicción de riesgos de enfermedades y cursos de enfermedades

En virtud de la función clave de la quinasa checkpoint 2 para la regulación del ciclo celular, un componente esencial de la invención es que utilizando variaciones génicas en *CHK2* se puedan predecir riesgos de enfermedades y cursos de enfermedades.

El desarrollo multietapa del cáncer refleja la acumulación de variaciones genéticas que conducen a la transformación de células normales en células cancerosas y de tejido normal a tumores invasivos benignos, y eventualmente, malignos. La acumulación de alteraciones en genes supresores de tumores y proto-oncogenes acelera la génesis del tumor y puede influir tanto sobre la radioterapia como la quimioterapia. No obstante, cada vez resulta más claro que mecanismos de reparación del ADN perturbados así como checkpoints son el motivo de la inestabilidad genómica incrementada de tumores. Dado que los checkpoints poseen un papel central para la obtención de la integridad genómica, se ha de esperar de inmediato que el curso de enfermedades tumorales múltiples y muy diferentes se vea influenciado por una capacidad de activación de checkpoints genéticamente determinada y reducida. Esto significa que mediante variaciones de la expresión de proteínas que son expresadas en todas las células del cuerpo humano y que protegen a la célula frente a daños en el ADN, se regulen funciones celulares que

influyen o al menos modulan de manera decisiva todos los procesos fisiológicos y patofisiológicos. Junto a ello, también se ven afectadas de manera particular respuestas a productos farmacéuticos. Junto a ellas se ven afectados efectos medicamentosos deseados, pero también indeseados.

5 En la bibliografía científica se postuló repetidamente que variaciones funcionales de proteínas checkpoint tienen una influencia duradera sobre múltiples enfermedades o bien sobre el transcurso de múltiples enfermedades, dado que se trata de vías filogenéticamente muy conservadas. Variaciones génicas de este tipo pueden ser mutaciones que modifican la estructura en las proteínas checkpoint que reducen, por ejemplo, la activación de las proteínas mediante fosforilación o la selectividad del sustrato. Además, el nivel de expresión puede estar modificado, con lo cual se reduce el inicio de las cascadas de reacción subsiguientes, que inducen, p. ej., la apoptosis, o pueden aparecer variantes de corte y empalme con una función modificada. Todas estas variaciones se consideran como una predisposición genética para el cáncer.

A partir de los ejemplos mencionados se desprende que

1. Variaciones génicas en genes que codifican proteínas expresadas de forma ubiquitaria provocan múltiples enfermedades o bien influyen sobre múltiples riesgos de enfermedad y

15 2. Proteínas checkpoint son parte de la red compleja para mantener la integridad genómica en el cuerpo humano.

Enfermedades que van acompañadas de una variación génica en *CHK2* y son determinadas, por ejemplo, mediante un nivel de expresión modificado de la proteína *CHK2* son, por ejemplo, neoplasmas benignos y malignos de cualquier tejido de origen.

20 Un componente esencial en la invención es, por consiguiente, la provisión de variaciones génicas relevantes para el diagnóstico en el gen *CHK2* como factor de pronóstico para todas las enfermedades cancerosas del hombre. Esto se ha de explicar en lo que sigue en ejemplos elegidos.

Carcinoma colorrectal – El carcinoma colorrectal es el tipo de tumor más frecuente en el tracto gastrointestinal y una de las causas principales de una muerte condicionada por el tumor en todo el mundo (12-15% de toda la mortalidad de cáncer). La tasa de supervivencia media de cinco años después de la resección del tumor asciende sólo al 50%. El método estándar para la predicción del curso de la enfermedad es el sistema de estudio TNM o bien UICC. Pacientes con los estadios III o IV de UICC tienen un pronóstico generalmente peor que pacientes con los estadios I o II de UICC. Una quimioterapia adyuvante se lleva a cabo en el caso de carcinomas colorrectales metastatizados (estadios III y IV de UICC) y puede potenciar el efecto local de una terapia de radiación. Una gran parte de estos pacientes desarrolla recidiva o metástasis, lo cual hace necesaria una atención post-operatoria intensiva. Por consiguiente, es importante identificar y establecer marcadores moleculares que puedan predecir el curso ulterior de la enfermedad. Otro componente de la invención consiste en aprovechar las variaciones génicas en *CHK2* con el fin de predecir el curso ulterior del carcinoma colorrectal.

35 La Figura 14 muestra una diferencia en relación con la supervivencia en función del polimorfismo -7161G>A en pacientes con tumores colorrectales de los estadios III y IV de UICC. Pacientes con el genotipo GG sobreviven mayor tiempo que los pacientes que poseen el genotipo GA heterocigótico.

Leucemia linfática crónica – Característico de la leucemia linfática crónica (CLL) es un gran número de linfocitos degenerados. En general, el 30% de todas las enfermedades leucémicas son leucemias linfáticas crónicas. La edad media de enfermar se encuentra en los 65 años. Una CLL puede ocurrir de forma benigna hasta durante 20 años, es decir, los pacientes no muestran, a excepción de un ganglio linfático dilatado, cansancio y falta de apetito, síntoma alguno. El tratamiento se inicia cuando el número de los linfocitos aumenta fuertemente, el número de los eritrocitos y trombocitos se reduce o se manifiestan otras complicaciones. Un tratamiento prematuro no tiene influencia alguna sobre el curso de la enfermedad. La medida terapéutica más importante es la quimioterapia. Cuando más haya avanzado la enfermedad, tanto mayores serán los trastornos de salud por parte de la variación del sistema de órganos. En función del estadio Binet de la enfermedad, el médico puede estimar el pronóstico. El estadio de una CLL se caracteriza, entre otros, por el número de linfocitos que se encuentran en la sangre y en la médula ósea, por el tamaño que tenga el hígado y si se presenta una anemia. Una CLL conduce a variaciones en el sistema inmunológico, de modo que personas que padecen esta enfermedad están en mayor riesgo de desarrollar otros tipos de cáncer. En el caso de un estadio Binet igual, los pacientes muestran, sin embargo, cursos de la enfermedad muy diferentes. Misión de la invención es mostrar qué variaciones génicas en el gen *CHK2* son adecuadas para predecir el transcurso de la CLL.

Para ello, pacientes con CLL se genotiparon con relación a las variaciones génicas descritas en *CHK2* y el estado del gen se asoció con la supervivencia libre de progreso. La Figura 15 muestra la supervivencia en función del polimorfismo -7235C>G. Pacientes que son portadores del genotipo CC/GC sobreviven mayor tiempo que pacientes que son GG homocigóticos.

55 **Carcinoma de células renales** – En el caso del cáncer de riñón, las posibilidades de curación dependen del tamaño del tumor y de la expansión del tumor. En el caso de pacientes sin metástasis, la tasa de supervivencia de 10 años alcanza hasta el 80%, no obstante con una variabilidad entre individuos considerable. Mediante el empleo

ampliamente difundido hoy en día de la técnica de ultrasonidos se reconocen muchos de los tumores ya en un estadio temprano no metastatizado y, de esta forma, pueden ser tratados a tiempo. En el caso de la presencia de metástasis lejanas, es posible combinar la extirpación quirúrgica del riñón con una subsiguiente terapia inmunitaria con interleuquina 2 o interferón-alfa. Con ello, se potencia la defensa propia del cuerpo contra células cancerosas.

5 En el caso de carcinoma de células renales metastatizado, con la combinación de interferón, interleuquina-2 y 5-fluorouracilo en estudios puede alcanzarse una tasa de respuesta de 36%. Actualmente no existen marcadores predictivos para la supervivencia en el caso de pacientes con carcinoma de células renales.

La Figura 16A muestra la supervivencia en función del polimorfismo -7161G>A. Pacientes con el genotipo GG sobreviven durante un tiempo claramente mayor que pacientes con los genotipos GA y AA ($p < 0,05$). El tiempo mediano hasta la muerte asciende en el caso de portadores de GG a 115 meses, para pacientes con el genotipo AA, por el contrario, a sólo 9 meses. Algo similar es válido también para la supervivencia libre de progresión en función del polimorfismo -7161G>A (Figura 16B). También aquí los pacientes con el genotipo GG muestran el proceso menor a lo largo del espacio de tiempo de observación. La supervivencia libre de progresión mediana asciende para GG a 52 meses, para AA, por el contrario, a sólo 2 meses ($p < 0,001$). El polimorfismo -7235C>G estaba asociado asimismo con una supervivencia (Figura 16C). Los portadores de alelos G presentaban una supervivencia mayor que pacientes con el genotipo CC ($p < 0,05$).

Carcinoma de mama – El carcinoma de mama es el tumor más frecuente de la población femenina en Europa y en los Estados Unidos. Afecta al 7 a 10% de todas las mujeres y constituye el 25% de toda la mortalidad femenina por el cáncer. La etiología del carcinoma de mama es aún desconocida, pero se describen factores de riesgo tales como una disposición familiar, exposición a la radiación o influencia de estrógenos. La mayoría de las pacientes tienen un carcinoma invasivo. Con pocas excepciones, cada uno de los carcinomas de mama operables es tratado quirúrgicamente incluso en el caso de una metastatización lejana detectada. La primera asistencia operativa radical diferente tiene variaciones de la tasa de recidiva locorregional, pero no tiene como consecuencia una posibilidad de supervivencia a largo plazo. Además, la recidiva o metástasis lejanas se manifiestan con frecuencia sólo después de 5 o incluso de 10 años. Por lo tanto, es importante reconocer prematuramente estas lesiones y asistir cercanamente a las pacientes.

Exámenes de cuidados posteriores se llevan a cabo a intervalos regulares, en el caso de una sospecha en el ínterin también hasta 10 años post-operación. Hasta ahora, apenas existen marcadores válidos que predigan el curso ulterior de la enfermedad. Actualmente, se recurre, por lo tanto, a los factores clásicos tales como tamaño del tumor, metastatización, invasión de los ganglios linfáticos, estado del receptor hormonal, etc. para el pronóstico. Marcadores genéticos para la probabilidad de supervivencia y respuestas a la terapia mejorarían esencialmente la asistencia médica de pacientes con carcinoma de mama. Misión de la invención es demostrar que el uso de variaciones genéticas en *CHK2* es adecuado para predecir el curso ulterior de la enfermedad.

La Figura 17 muestra la supervivencia de pacientes con carcinoma de mama en función del polimorfismo -10649-(-10621)del 29. Pacientes con la inserción homocigótica muestran la mejor supervivencia en comparación con pacientes que portan al menos un alelo de delección.

Glioblastoma – Los gliomas se presentan principalmente en edad adulta. La etiología es desconocida. El cuadro histológico de los gliomas está marcado por una progresión maligna, invasión difusa y fuerte heterogeneidad. El glioma maligno más frecuente es el glioblastoma (OMS grado IV). A menudo se extienden a través del cuerpo calloso a la otra mitad del cerebro. Sólo en el caso de gliomas de grado I (astrocitomas pilocíticos) es posible una terapia operativa curativa. Todos los otros gliomas recidivan. Hasta ahora no son curables. El tiempo de supervivencia mediano en el caso del glioblastoma asciende a 6 a 8 meses. Sin radiación post-operativa, el tiempo de supervivencia mediano asciende sólo a 2 a 3 meses. Hasta ahora no existen marcadores que sean predictivos para el curso de esta grave enfermedad.

Marcadores genéticos para la probabilidad de supervivencia y respuesta a terapias mejorarían esencialmente la asistencia médica de pacientes con glioblastoma. Misión de la invención es demostrar que el uso de variaciones genéticas en *CHK2* es adecuado para predecir el curso ulterior de la enfermedad.

Las Figuras 18A y B muestran que el polimorfismo -10649-(-10621)del 29 influye sobre el curso de la enfermedad en el caso de glioblastoma.

Pacientes con el alelo de inserción muestran una supervivencia mayor y una supervivencia exenta de recidiva asimismo mayor. Por término medio, pacientes que son homocigóticos para la inserción permanecen exentos de recidiva durante 390 días, pero pacientes con el alelo de delección sólo 206 días. El polimorfismo -7235C>G se correlaciona asimismo con el curso de la enfermedad (Figuras 18C y D). Pacientes con el genotipo CC sobreviven durante mayor tiempo que pacientes con el genotipo GG e individuos heterocigóticos se encuentran entremedias, lo cual habla de un efecto gen-dosis. Pacientes con el genotipo CC permanecen asimismo durante mayor tiempo libres de recidiva comparados con pacientes que portan el alelo G.

Carcinoma de próstata – El carcinoma de próstata es el cáncer maligno masculino más frecuente en segundo lugar. Supone el 9-11% de todas las enfermedades tumorales, aumentando la incidencia. Más del 50% de los casos

afectan a pacientes mayores de 70 años. Para el reconocimiento temprano es posible una determinación del antígeno prostático específico (PSA). Investigaciones de este tipo para el reconocimiento temprano son convenientes en el caso de hombres mayores de 50 años con una esperanza de vida de más de 10 años. La fuerza expresiva del valor PSA es, no obstante, controvertida. El PSA debe ser retirado antes del examen rectal, dado que de lo contrario los valores de PSA son falsos positivos. Además, valores de PSA incrementados pueden presentarse también en el caso de una prostatitis benigna. En los estadios tempranos, el carcinoma de próstata es la mayoría de las veces asintomático dado que se desarrolla alejado de la uretra. Por lo tanto, no existe posibilidad de un autocontrol para el reconocimiento temprano. La tasa de supervivencia de cinco años asciende en el caso de un carcinoma de próstata con estadio Flocks C al 60%, al cabo de 10 años, la probabilidad de supervivencia es ya sólo, sin embargo, de 30% y al cabo de 15 años ya sólo del 20%. Hasta ahora, apenas existen marcadores válidos que sean predictivos para el curso ulterior de la enfermedad.

Marcadores genéticos para la probabilidad de supervivencia y respuestas a la terapia mejorarían esencialmente la asistencia médica de los pacientes. En la Figura 19 se representa la supervivencia en función del polimorfismo -7161G>A. Pacientes con al menos un alelo G muestran una mejor supervivencia que pacientes con el genotipo AA. Mientras que la supervivencia mediana en el caso de portadores de alelos G asciende a 2650 días, en el caso de portadores del genotipo AA es ya sólo de 220 días. Estos resultados confirman de manera inequívoca la utilidad de las variaciones génicas en el gen *CHK2* para la finalidad aquí descrita. Estas enfermedades no están, a priori, relacionadas de modo alguno.

Uso de variaciones génicas en el gen *CHK2* para la predicción de cursos de la enfermedad y respuestas a la terapia.

La farmacogenética en el sentido de la invención se ocupa del diagnóstico de la eficacia de los productos farmacéuticos, la potencia y eficacia de los productos farmacéuticos y la aparición de efectos indeseados. La actividad de medicamentos y/o la aparición de efectos secundarios indeseados se definen, junto a las propiedades específicas de las sustancias de los productos químicamente definidos, por una serie de parámetros. Dos parámetros importantes, la concentración alcanzable en plasma y el tiempo de semi-vida en plasma, determinan en gran medida la eficacia o ineficacia de productos farmacéuticos o la aparición de efectos indeseados. El tiempo de semi-vida en plasma se determina, entre otros, conociendo con qué velocidad determinados fármacos en el hígado u otros órganos corporales son metabolizados para formar metabolitos eficaces o ineficaces y con qué velocidad son secretados del cuerpo, pudiendo tener lugar la secreción a través de los riñones, a través del aire respirado, a través del sudor, a través del líquido seminal, a través de las heces o a través de otras secreciones corporales. Junto a ellos, la actividad se limita en el caso de la administración oral por el denominado "efecto de primer paso", dado que después de la resorción de productos farmacéuticos a través del intestino se metaboliza una determinada proporción en el hígado para formar metabolitos ineficaces.

Mutaciones o polimorfismos en genes de enzimas metabolizantes pueden modificar la actividad de los mismos de manera que se modifique su composición de aminoácido, con lo cual se aumenta o reduce la afinidad hacia el sustrato a metabolizar y, con ello, se acelera o ralentiza el metabolismo. De manera similar, mutaciones o polimorfismos en proteínas de transporte pueden modificar la composición de los aminoácidos de manera que el transporte y, con ello, la secreción del cuerpo se acelerada o ralentizada.

Para la elección de la sustancia óptima adecuada para un paciente, la dosificación óptima, la forma de administración óptima y para evitar efectos secundarios indeseados, en parte nocivos para la salud o letales, es de extraordinaria importancia conocer polimorfismos genéticos o de mutación que conducen a la modificación de los productos génicos.

La importancia de la quinasa checkpoint 2 para agentes quimioterapéuticos y radiación

La inestabilidad genética es un síntoma de todos los tumores y juega también un papel en la oncogénesis, la progresión y el desarrollo de resistencias frente a productos farmacéuticos. La mayoría de las células tumorales poseen un checkpoint G1-S defectuoso, lo cual les proporciona una ventaja de supervivencia. No obstante, este defecto condiciona que las células tumorales dependan mucho del punto de control G2 cuando están presentes estímulos que amenazan a la integridad genómica. *CHK2* es el responsable del mantenimiento del checkpoint G1 cuando se manifiestan daños en el ADN. Por consiguiente, la activación de *CHK2* y, con ello, la restauración del checkpoint G1 ofrece la posibilidad de evitar resistencias a la terapia. Se demostró ya que la supresión de *CHK2* condiciona una resistencia frente a la radiación. Esta podría eliminarse a través de activadores de *CHK2*. Dado que *CHK2* influye también sobre el checkpoint G2, su inhibición y, con ello, la supresión del checkpoint G2 puede ofrecer por consiguiente, la posibilidad de que se puedan acumular daños y variaciones en el ADN que son condicionados por sustancias genotóxicas e irradiación y la célula tumoral muere por ello.

Si se manifiestan variaciones génicas en *CHK2*, que influyen sobre la expresión génica, entonces esto tiene efecto sobre la eficacia de estos inhibidores de *CHK2*. Es de esperar que pacientes con una expresión de *CHK2* baja dependiente del genotipo respondan mejor a los inhibidores que pacientes con una expresión elevada de *CHK2*. Además, esto significa que la terapia de combinación de inhibidores de *CHK2* pueda verse afectada por agentes quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos y/o irradiación. Esto mismo es válido para activadores de *CHK2*. Es de

esperar que pacientes con una expresión de *CHK2* mayor en función del genotipo respondan mejor a activadores que pacientes con una expresión más baja a *CHK2*. De ello resulta la posibilidad de un diagnóstico individual de la capacidad de respuesta general a estos agentes terapéuticos contra el cáncer y medidas terapéuticas, así como una predicción individual del riesgo de efectos indeseados por parte de estas terapias.

- 5 El diagnóstico dependiente del genotipo de la expresión de *CHK2* permite un diagnóstico general de la eficacia de los agentes quimioterapéuticos y la radiación, su dosificación óptima y la aparición de efectos secundarios.

La quimioterapia utiliza sustancias que ejercen su efecto perjudicial de la manera más preestablecida posible sobre determinadas células cancerosas y matan a éstas o las inhiben en su crecimiento. Una dosis de agentes citostáticos determinada puede matar siempre sólo a una determinada proporción de las células diana que se mantiene con el tratamiento progresivo. Por lo tanto, una quimioterapia no debe ser reducida en el curso del tratamiento, aun cuando el tumor ya no sea detectable. Más bien, se ha de contar que con un débil tratamiento se seleccionen precisamente los clones de células tumorales resistentes. La quimioterapia se aplica en una secuencia rápida, y casi siempre se combinan dos o más agentes citostáticos con el fin de aumentar la eficacia. La terapia provoca con ello también efectos secundarios que se clasifican según los criterios de toxicidad comunes. Estos criterios incluyen: número de leucocitos y trombocitos, malestar, vómitos, diarrea y estomatitis.

Por radioterapia se entiende la aplicación de rayos ionizantes de elevada energía con el fin de curar enfermedades tumorales malignas. Tumores malignos de este tipo se tratan a menudo también quimio- y radio-terapéuticamente combinados. Una pluralidad de enfermedades tumorales puede curarse de esta forma también en estadios avanzados. Con el fin de mantener bajos los efectos secundarios, la radiación se divide en muchas dosis individuales diarias y se administra a lo largo de varias semanas. A pesar de ello, se manifiestan efectos secundarios tales como enrojecimientos, malestar, diarreas o alopecia, en función de la dosis, profundidad de penetración y número de dosis individuales.

La invención se basa entonces en que se desarrolló un procedimiento que es adecuado en general para el diagnóstico de la capacidad de activación de la quinasa checkpoint 2 y, ligado con ello, el checkpoint G1 y el G2. Para ello, se examinan uno o varios polimorfismos en el gen *CHK2*. En el caso de una expresión elevada se produce, de manera predecible, una capacidad de activación aumentada del checkpoint y, con ello, un tiempo suficiente con el fin de llevar a cabo mecanismos de reparación en el ADN después del daño. En el caso de una expresión baja de *CHK2*, los checkpoints son menos activables y los daños del ADN no se reparan en absoluto o no lo suficientemente. Con ello, una determinación de la presencia de polimorfismos en *CHK2* permite el diagnóstico de la eficacia y de efectos indeseados de medicamentos, en particular agentes citostáticos, así como de otras formas de terapia que dañan a la herencia genética de las células tumorales, p. ej., radiación. Junto a ello, polimorfismos de este tipo también pueden utilizarse en *CHK2* con el fin de diagnosticar los efectos de agentes farmacéuticos que son combinados con un inhibidor de *CHK2*. Adicionalmente, el diagnóstico del estado de los alelos o del haplotipo en *CHK2* puede emplearse con el fin de determinar individualmente una dosificación óptima y compatible de medicamentos.

Para el diagnóstico de una capacidad de activación aumentada o reducida de la quinasa checkpoint 2 y del checkpoint sirve, en particular, la detección de los polimorfismos del promotor de *CHK2* descritos en esta memoria, ya sean solos o en todas las combinaciones imaginables.

Junto a ello, para el diagnóstico pueden utilizarse todas las otras variaciones génicas en *CHK2* que se encuentren en un equilibrio de acoplamiento con estos polimorfismos y/o fomenten o inhiban adicionalmente el proceso de corte y empalme alternativo o la expresión.

Estas variaciones génicas pueden detectarse con procedimientos arbitrarios, habituales para el experto en la materia tales como la secuenciación directa, análisis de restricción, hibridación inversa, procedimientos de punto-mancha o ranura-mancha, espectrometría de masas, tecnología Taqman® o Light-Cycler®, pirosecuenciación, etc. Además, estos polimorfismos de genes pueden detectarse al mismo tiempo según la PCR Multiplex e hibridación en un chip de ADN. Junto a ello, para el diagnóstico de una capacidad de activación incrementada de proteínas G pueden emplearse también otros procedimientos que posibiliten la detección directa del nivel de expresión de *CHK2* o variantes de corte y empalme de *CHK2*.

El procedimiento mencionado se adecúa, en particular, para el diagnóstico del efecto de sustancias que dañan el ADN de las células tumorales. A estas sustancias pertenecen oxaliplatino, 5-fluorouracilo, ácido fólico, irinotecan, capecitabina y cisplatino, pudiendo ampliarse arbitrariamente la lista. Junto a ello, se pueden predecir los efectos de agentes inmunoterapéuticos (p. ej., interferones o interleuquinas) o inhibidores de la transducción de señales en células tumorales.

Se pueden predecir, además, los efectos de medidas radioterapéuticas tales como radiación gamma, de rayos X, electrones, neutrones, protones e iones carbono, pudiendo prolongarse arbitrariamente la lista. En un sentido amplio, por terapia de radiación se entiende también la aplicación médica de rayos de microondas y de calor, la terapia con luz y UV, así como el tratamiento con radiación por ultrasonidos.

Los siguientes ejemplos sirven para la explicación adicional del uso de variaciones génicas en *CHK2* para la predicción de riesgos de enfermedades y cursos de enfermedades.

Ejemplos

5 Para ello se genotiparon diferentes colectivos de tumores y controles sanos para los polimorfismos de *CHK2* y se compararon las distribuciones del genotipo y/o alelos. En este caso, se comprueban diferencias significativas en la distribución de los genotipos y los alelos. En general, no se puede predecir si una expresión incrementada de *CHK2* es favorable o desfavorable. Con ello, los polimorfismos en *CHK2* se adecúan para predecir un riesgo de enfermedad. El riesgo de enfermedad para el alelo de riesgo o para genotipos de riesgo (solos o combinados) se indica como “razón de momio” (OR) junto con el intervalo de confianza del 95% (95% CI) y el valor p.

10 **Ejemplo 1**

Pacientes con carcinoma colorrectal (n = 143) frente a controles (n = 235)

-7161G>A			-7235C>A		
Alelo	Carcinoma de colon	Controles	Genotipo	Carcinoma de colon	Controles
G	241 (84,3%)	419 (89,2%)	CC	8 (5,6%)	25 (10,7%)
A	45 (15,7%)	51 (10,8%)	CG	70 (49,0%)	88 (37,6%)
			GG	65 (45,5%)	121 (51,7%)

P = 0,050

P = 0,048

Las distribuciones de alelos o genotipos son significativamente diferentes (p = 0,05 o bien 0,048);

OR A frente a G = 1,534 (95% CI = 0,997-2,361) p = 0,05;

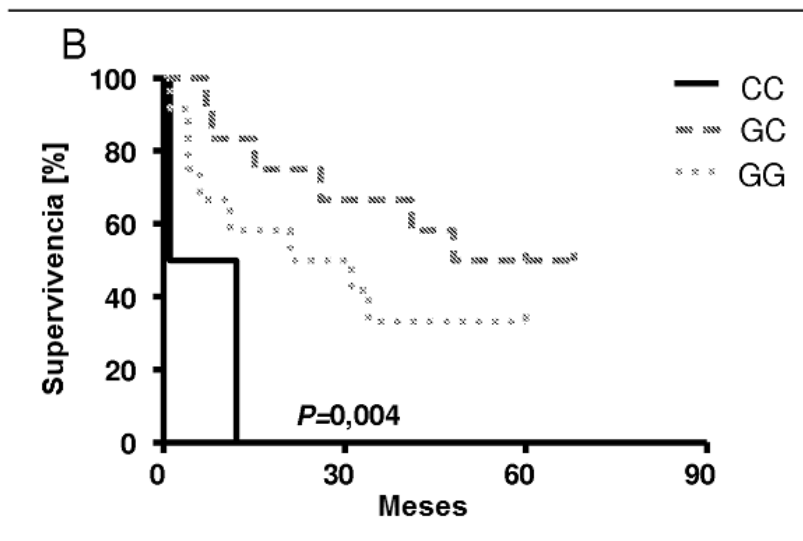
OR CG frente a CC = 2,486 (95% CI = 1,056-5,851) p = 0,034;

15 Con ello, a los portadores de alelos -7161A se les puede asociar un riesgo incrementado de enfermar por un carcinoma de colon. Por lo tanto, una expresión reducida de ARNm de *CHK2* está asociada con un riesgo incrementado de la enfermedad.

Ejemplo 2

Relación entre el polimorfismo -7235C>G y la supervivencia en el caso de carcinoma colorrectal

20 Además, se investigó si existe una relación entre los genotipos del polimorfismo -7235C>G y la supervivencia de pacientes con carcinoma colorrectal. Esto se representa en la siguiente Figura 20.



Aquí se reconoce una supervivencia claramente peor de pacientes con el genotipo -7235 CC.

ES 2 629 955 T3

Con ello, a portadores de alelos -7161A o bien genotipos -7235 CG se les puede asociar un riesgo incrementado de enfermar por un carcinoma de colon. Una expresión reducida de ARNm de CHK2 está asociada, por lo tanto, con un riesgo incrementado de enfermedad.

Ejemplo 3

- 5 Pacientes con leucemia linfática crónica (CLL, n = 166) frente a controles (n = 234)

-7235C>G		
Genotipo	CLL	Controles
CC	7 (4,2%)	25 (10,7%)
CG	75 (54,2%)	88 (37,6%)
GG	84 (50,6%)	121 (51,7%)

Las distribuciones de alelos y genotipo son significativamente diferentes ($p = 0,039$). Se pueden calcular los siguientes riesgos (OR) para una CLL:

OR frente a CC = 3,044 (95% CI = 1,246 – 7,435), $P = 0,012$;

OR GG más CG frente a CC = 2,7 (95% CI = 1,2 – 6,4) $P = 0,024$;

- 10 Ejemplo 4

Pacientes con glioblastoma (n = 198) frente a controles (n = 235)

-7161G>A						
Alelo	Glioblastoma	Controles		Genotipo	Glioblastoma	Controles
G	331 (83,6%)	419 (89,2%)		GG	145 (73,2%)	188 (80,0%)
A	65 (16,4%)	51 (10,8%)		GA	41 (20,7%)	43 (18,3%)
				AA	12 (6,1%)	4 (1,7%)

Las distribuciones de alelos y genotipos son significativamente diferentes ($P = 0,017$ o bien $p = 0,039$)

Se pueden calcular los siguientes riesgos:

OR A frente a G: 1.613 (95% CI = 1,088-2,393); $p = 0,021$;

- 15 OR AA frente a GG: 3.980 (95% CI = 1.229-12.31); $P = 0,019$;

OR AA más AG frente a GG: 3,73 (95% CI = 1,2 – 11,8); $P = 0,021$;

Por consiguiente, a portadores de alelos -7161A o bien genotipos -7161AA/AG se les puede asociar un riesgo incrementado de enfermar por un glioblastoma. Una expresión disminuida de ARNm de CHK2 está, por lo tanto, asociada con un riesgo incrementado de enfermedad.

- 20 Ejemplo 5

Regresión de Cox para la supervivencia de pacientes con glioblastoma en función del polimorfismo -7235C>G

La siguiente Tabla muestra los resultados de un modelo de regresión COX m-multivariante para el fallecimiento condicionado por el tumor de pacientes con glioblastoma después de resección total (HR = relación Hazard, * = referencia, CI = intervalo de confianza, ED = diagnóstico primero, M = varón, W = hembra).

Variables	HR (95% CI)	Valor <i>P</i>
-7235C>G		
CC	1*	
GC	1,918 (0,73-5,02)	0,185
GG	2,711 (1,05-7,03)	0,040
KPI	0,600 (0,11-3,29)	0,557

Variables	HR (95% CI)	Valor <i>P</i>
Terapia		
- Ninguna	1*	
- Radioterapia	0,090 (0,03-0,28)	< 0,001
- Radioterapia/Quimioterapia	0,091 (0,03-0,31)	< 0,001
Edad en primer diagnóstico	1,030 (1,01-1,05)	0,008
Edad ED: 58,84 ± 13,38		
Distribución de sexos: V: 65,4%; W: 34,6%		

5 Con el fin de confirmar el polimorfismo -7235C>G examinado como factor de pronóstico independiente para la supervivencia en el caso de pacientes de glioblastoma, se llevó a cabo una regresión COX multi-variante en la que se han incluidos todos los factores de riesgo potenciales para la supervivencia de los pacientes. El riesgo de un fallecimiento condicionado por el tumor era en el caso de los portadores de GG homocigóticos 2,7 veces más alto que en el caso de los portadores del alelo C (CI: 1.05-7,03; *P* = 0,040).

Como era de esperar, el tipo de terapia (radioterapia; radioterapia/quimioterapia) se manifestó como el factor de pronóstico mejor (*P* = < 0001) seguido de la edad en el caso de primer diagnóstico (*P* = 0,008) y el polimorfismo -7235C>G, es decir, una terapia reduce el riesgo de fallecimiento.

Ejemplo 6

10 Con respecto al polimorfismo -10621del 29 y supervivencia en el caso de glioblastoma

La siguiente tabla muestra los resultados de un modelo de regresión COX multi-variante para el fallecimiento condicionado por el tumor en caso de pacientes con glioblastoma después de resección total (HR = relación Hazard, * = referencia, CI = intervalo de confianza, ED = diagnóstico primero, M = varón, W = hembra).

Variables	HR (95% CI)	Valor <i>P</i>
-10621del 29		
Ins/Ins	1*	
Ins/Del	1,579 (0,84-2,98)	0,158
Del/Del	2,837 (1,31-6,12)	0,008
KPI	0,662 (0,12-3,60)	0,883
Terapia		
- Ninguna	1*	
- Radioterapia	0,103 (0,03-0,32)	< 0,001
-Radioterapia/Quimioterapia	0,109 (0,03-0,37)	< 0,001
Edad	1,033 (1,01-1,06)	0,005
Edad ED: 58,84 ± 13,38		
Distribución de sexos: V: 65,4%; H: 34,6%		

15 Pacientes que portan una delección homocigótica tienen, en comparación con los portadores de alelos de inserción, un riesgo casi 3 veces incrementado de fallecer antes de esta enfermedad (*P* = 0,008). Como es de esperar, el tipo de terapia es el factor de pronóstico mejor para la supervivencia de los pacientes (*P* = < 0,001), seguido de la edad en el caso de diagnóstico primero (*P* = 0,005) y el polimorfismo examinado.

Ejemplo 7

Pacientes con carcinoma de mama (n = 240) frente a controles femeninos (n = 78)

20

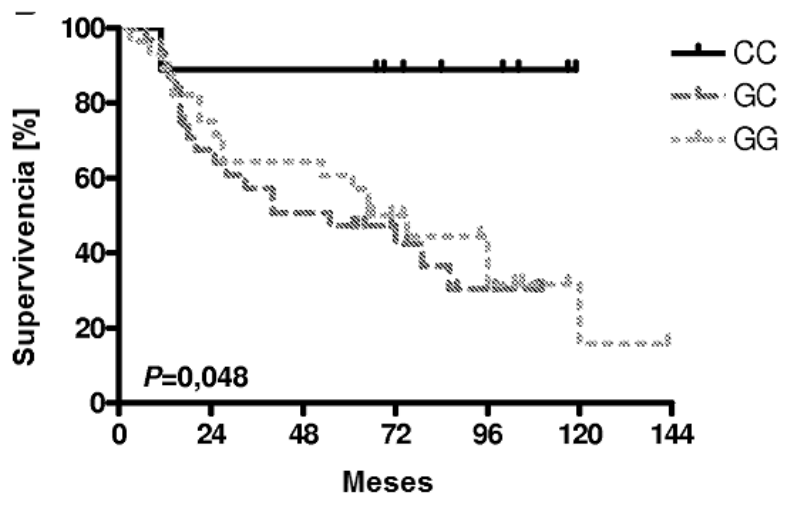
-10649-(-10621)del 29		
Genotipo	Carcinoma de mama	Controles
II	29 (12,1%)	21 (26,9%)
ID	162 (67,5%)	38 (48,7%)
DD	49 (20,4%)	19 (24,4%)

La distribución del genotipo es significativamente diferente ($p = 0,003$). Se pueden calcular los siguientes riesgos: OR ID frente a II: 3,087 (95% CI = 1,590 – 5,995), $p = 0,001$.

Ejemplo 8

5 Supervivencia de pacientes con carcinoma de laringe en función de genotipos del polimorfismo -7235C>G

La siguiente Figura 21 muestra la curva de supervivencia de pacientes con carcinoma de laringe que han obtenido una radioquimioterapia combinada.



10 También en este caso, las curvas de Kaplan-Meier eran significativamente diferentes ($p = 0,048$). Después de una radioquimioterapia obtenida, los pacientes con el genotipo CC mostraron una supervivencia significativamente mejor que los pacientes que portan un alelo G ($P = 0,048$). Al cabo de cinco años vivían todavía aproximadamente el 90% de los portadores de CC, mientras que, por el contrario, casi el 70% de los portadores de alelos G habían fallecido en este momento. Esto se confirmó también en la regresión COX.

15 Se llevó a cabo la regresión COX multi-variante para la confirmación del polimorfismo examinado como factor de pronóstico independiente para la supervivencia de pacientes de carcinoma de laringe. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla.

Variables	Supervivencia HR (95% CI)	Valor P
-7235C>G		
CC	1*	
GC	9,142 (1,17-71,34)	0,035
GG	7,834 (1,01-60,70)	0,049
Edad ED	1,059 (1,01-1,11)	0,013
Sexo		
- Varones	1*	
- Hembras	< 0,001 (< 0,001-<0,001))	0,975

Variables	Supervivencia HR (95% CI)	Valor <i>P</i>
AJCC		
-1	1*	
-2	2,126 (0,49-9,28)	0,316
-3	3,376 (0,97-11,72)	0,550
-4	2,864 (0,89-9,19)	0,077
Grado		
-1	1*	
-2	0,422 (0,05-3,56)	0,428
-3	0,695 (0,07-6,56)	0,751

5 En comparación con los portadores de CC homocigóticos, el riesgo de un fallecimiento condicionado por el tumor en el caso de portadores GC heterocigóticos había aumentado en más de 9 veces (CI: 1,17-71,34; *P* = 0,035) y en el caso de genotipos GG homocigóticos en 7,8 veces (CI: 1,01-60,70; *P* = 0,049). El polimorfismo respectivo se manifiesta como el único factor de pronóstico independiente. La variación del riesgo por la edad de los pacientes es baja. En este caso, no es relevante la edad del paciente como factor del pronóstico.

Para los pacientes con radioquimioterapia se manifestó la edad en el caso de un diagnóstico primero (*P* = 0,013) como mejor factor de pronóstico, seguido del polimorfismo -7235C>G.

10 En el campo AJCC se enumeran los estadios de tumores, indicando 1 el estadio más favorable para el éxito del tratamiento y 4 el estadio más desfavorable. Grado 1 representa un tejido maligno bien diferenciado ("low-grade") con una elevada coincidencia con tejido de origen. El grado 3 representa un tejido maligno malamente diferenciado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento in vitro para la predicción del riesgo de enfermedad de una enfermedad cancerosa, así como del curso de la enfermedad, caracterizado por que en una muestra de un paciente después de una o varias variaciones génicas en la región del promotor del gen CHK2 se busca el cromosoma humano 22q12.1 y se elige la variación génica a partir del polimorfismo -7161G>A (rs 2236141), el polimorfismo -7235C>G (rs2236142), el polimorfismo -10532G>A (rs5762767) y el polimorfismo -10649-(-10621)del 29; utilizándose al menos uno de los polimorfismos -7161G>A y/o -7235C>G y/o -10532G>A para la predicción del riesgo de enfermedad y/o del curso de la enfermedad para un carcinoma colorrectal; y/o utilizándose al menos el polimorfismo -7235C>G para la predicción del riesgo de enfermedad y/o del curso de la enfermedad para una leucemia linfática crónica; y/o utilizándose al menos uno de los polimorfismos -7161G>A y/o -10532G>A para la predicción del riesgo de enfermedad y/o del curso de la enfermedad para un glioblastoma; y/o utilizándose al menos uno de los polimorfismos -7235C>G y/o -10649-(-10621)del 29 para la predicción del curso de la enfermedad para un glioblastoma; y/o utilizándose al menos el polimorfismo -10649-(-10621)del29 para la predicción del riesgo de enfermedad y/o del curso de la enfermedad para un carcinoma de mama; y/o utilizándose al menos el polimorfismo -7235C>G para la predicción del curso de la enfermedad para un carcinoma de laringe; y/o utilizándose al menos uno de los polimorfismos -7161G>A y/o -7235C>G y/o -10532G>A para la predicción del curso de la enfermedad para un carcinoma de células renales de los estadios 3 y/o 4; y/o utilizándose al menos uno de los polimorfismos -7161G>A y/o -10532G>A para la predicción del curso de la enfermedad para un carcinoma de próstata.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en una muestra del paciente se buscan uno, dos, tres o cuatro de los polimorfismos -7161G>A; -7235C>G; -10532G>A y -10649-(-10621)del 29.

Figura: 1



Figura: 2

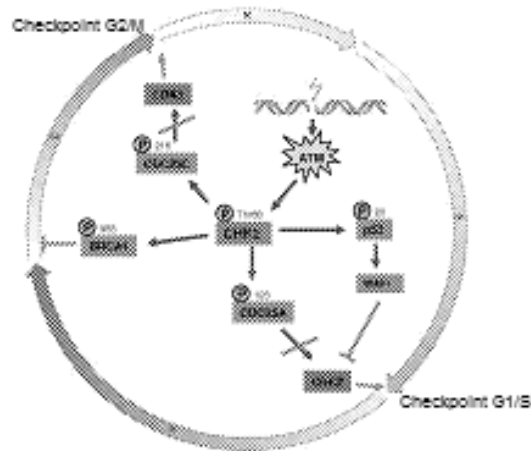


Figura: 3

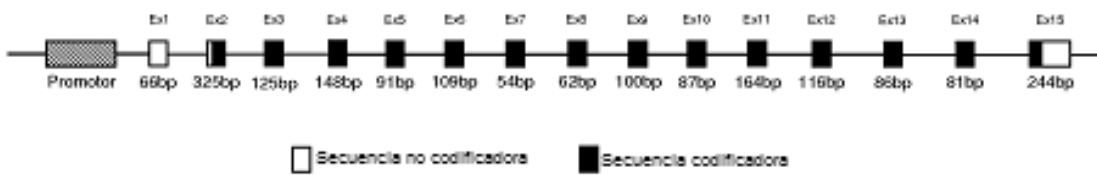


Figura 4:

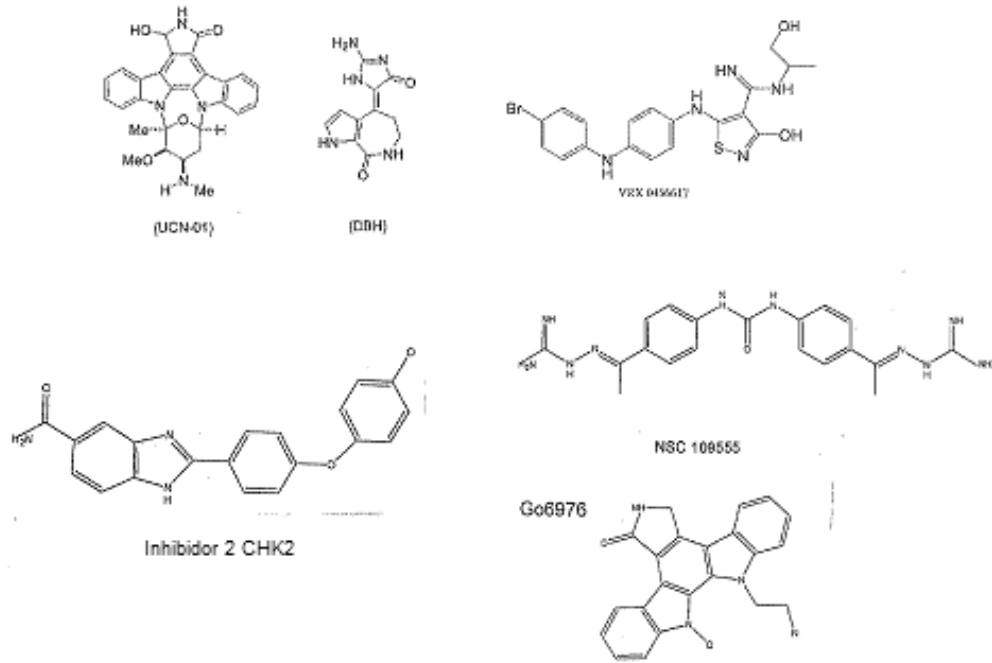


Figura 5:

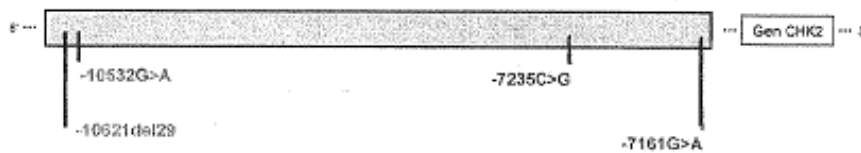


Figura 6:

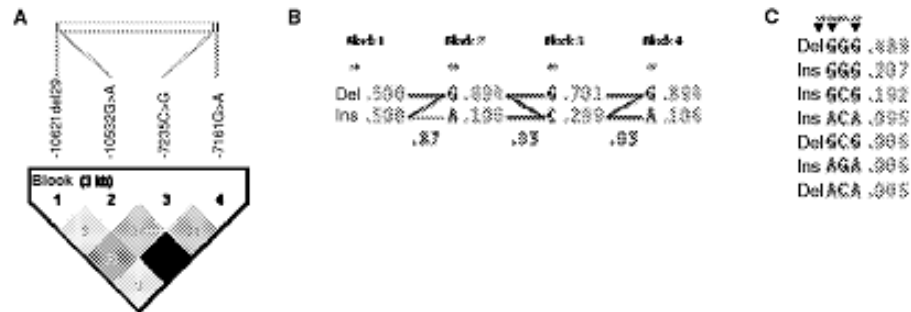


Figura 7:

-7161G>A
GCGGCAG: E74A [+]
GGTCGGCGG: Thap1-E67 [+]
 CCTCATTGGTCCGCGGCAG

GCGGCAG: E74A [+]
 CCTCATTGGTCCGCGGCAG

-7235C>G
CTCTCCCTTCTAAC: 2AP [-]
CTCTCCCTTC: MAF-2 [-]
GCTCTCCCTTCT: E1E-3 [-]
 TCCGCTCTGCCTTCTAACT

CTGCCTT: p21E919 [+]
 TCCGCTCTGCCTTCTAACT

-10532G>A
ACTCTGGAGA: Thap1-E47 [+]
 TAAGATACTCTAGAGAGGAA

CTCTAGAGAG: MAF-2 [-]
 TAAGATACTCTAGAGAGGAA

-10649-(-10621)del29
CATCTGACCA: p53 [+]
GGTCTTGAAC: p53 [+]
 GTAGAGGGGGGTTTCACCACTCTGACGAGGCTGGTCTTGAACCTCTGAC

GGGTTTCCT: NK-KappaB [+]
 GTAGAGGGGGGTTTCCTGAC

Figura 8:

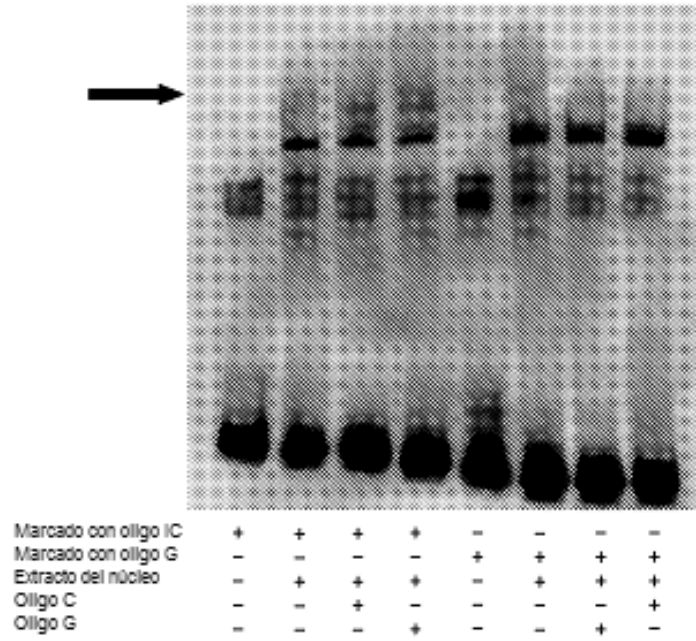


Figura 9:

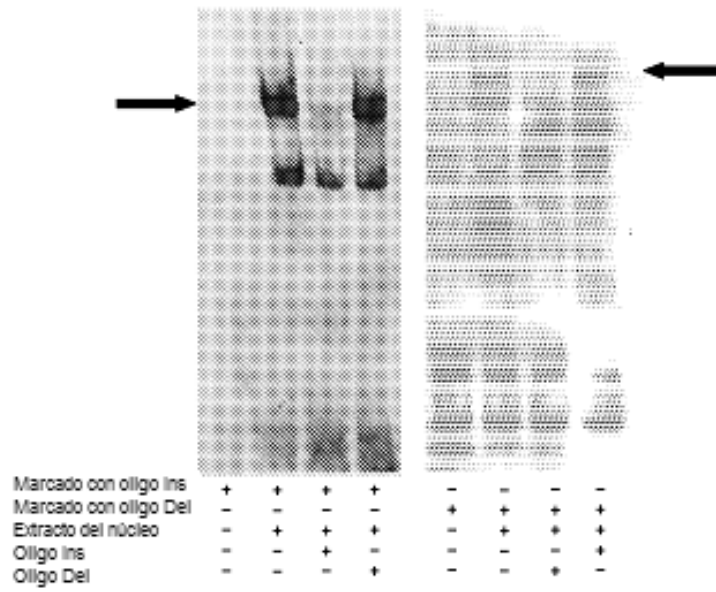


Figura 10:

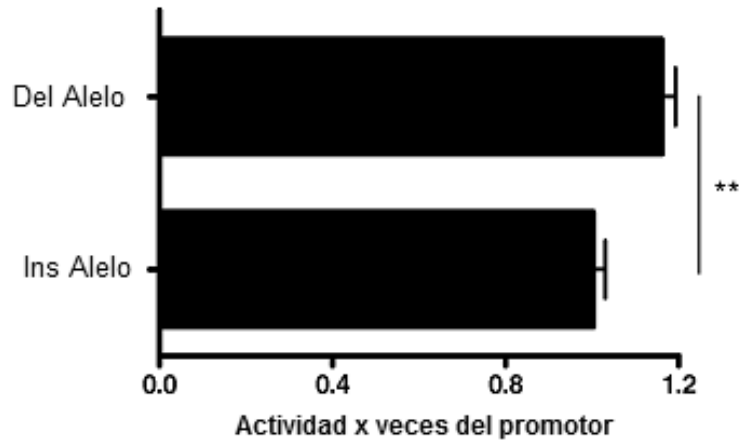


Figura 11:

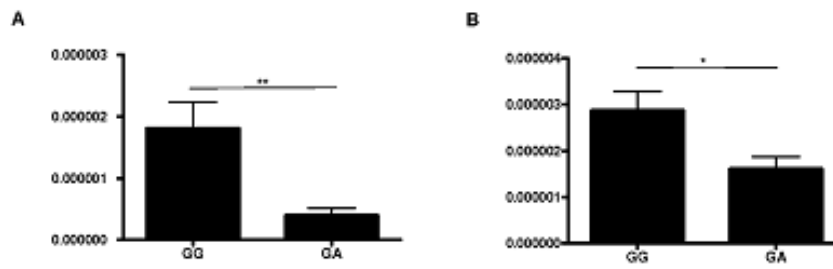


Figura 12:

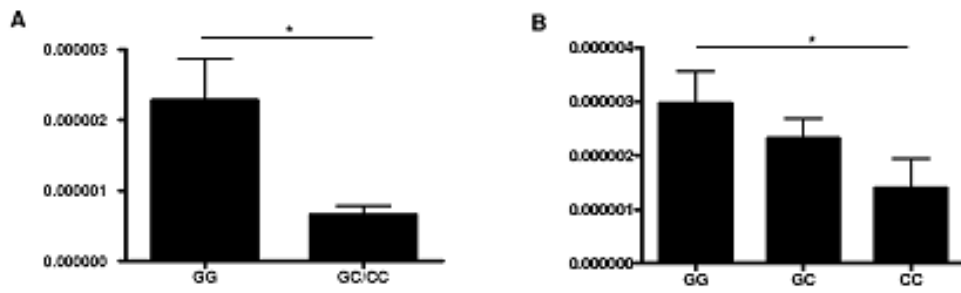


Figura 13:

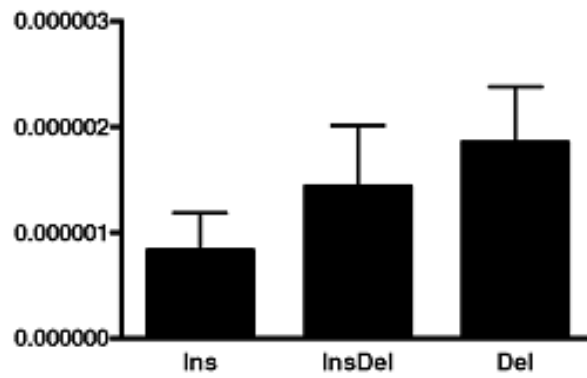


Figura 14:

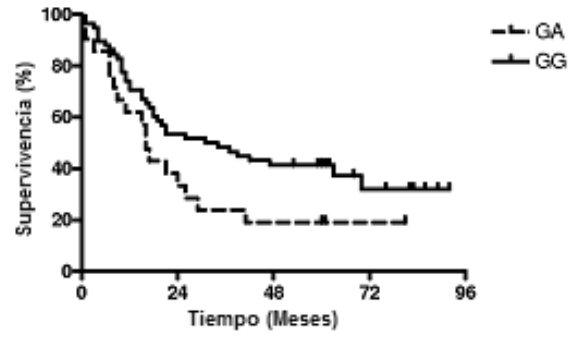


Figura 15:

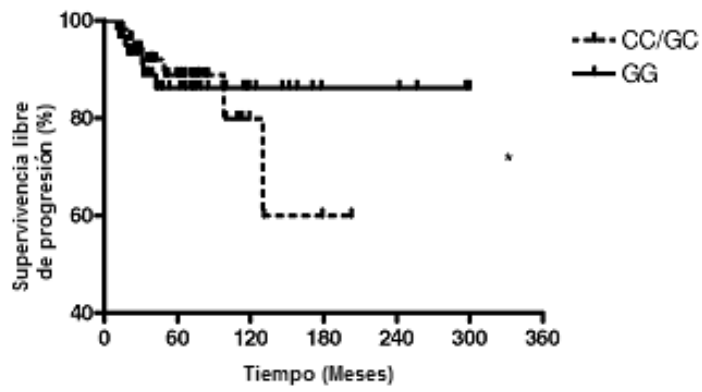


Figura 16:

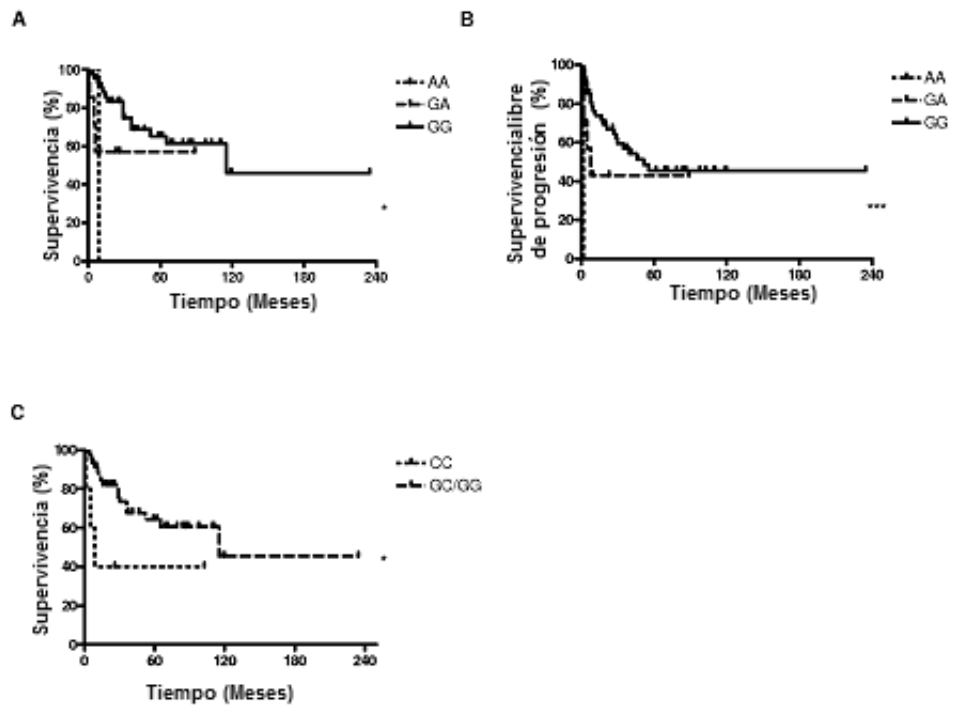


Figura 17:

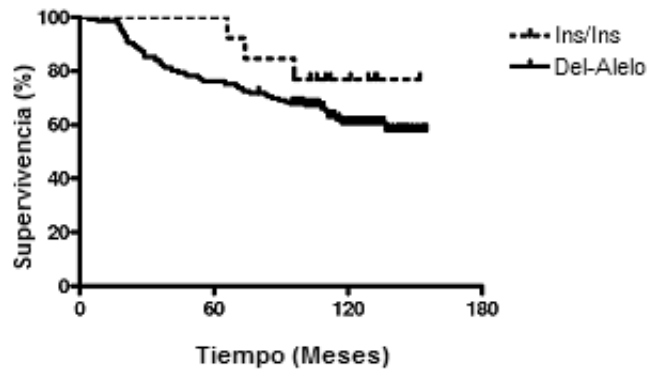


Figura 18:

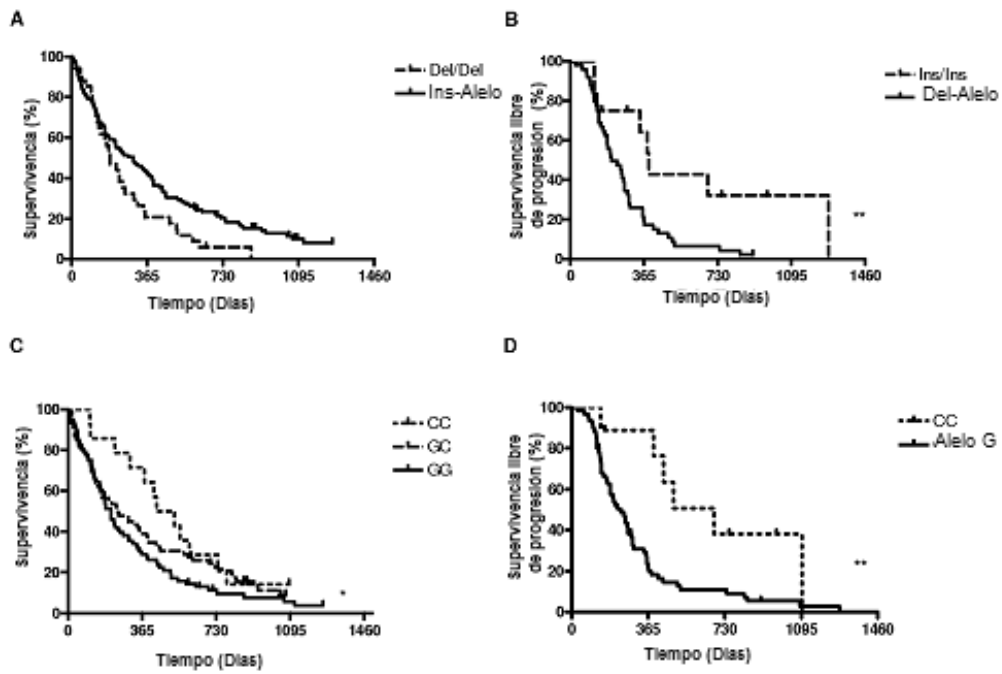


Figura 19:

