



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 279 266**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04020100 .6**

86 Fecha de presentación : **25.08.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1510588**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54

Título: **Correlación del cociente de los niveles de expresión del mRNA de la timidina fosforilasa y la dihidropirimidina dehidrogenasa en el cáncer colorrectal con supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con 5-FU.**

30

Prioridad: **28.08.2003 EP 03018783**

73

Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

72

Inventor/es: **Lutz, Verena;**
Krause, Friedmann;
Poignee-Heger, Manuela;
Walter, Thomas;
Porstmann, Baerbel;
Werner, Martin y
Lassmann, Silke

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 279 266 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

Correlación del cociente de los niveles de expresión del mRNA de la timidina fosforilasa y la dihidropirimidina dehidrogenasa en el cáncer colorrectal con supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con 5-FU.

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con el campo de la predicción de susceptibilidad al tratamiento farmacológico del cáncer utilizando análisis de biomarcador. En particular, la presente invención se relaciona con el campo de la predicción de susceptibilidad al 5-FU o análogos del 5-FU en pacientes que padecen cáncer colorrectal.

10 **Conocimientos previos en el campo**

El cáncer colorrectal (CCR), que continúa siendo uno de los cánceres con mayor índice de mortalidad en el mundo occidental, puede curarse aproximadamente en un tercio de los pacientes mediante una resección quirúrgica únicamente del tumor primario. Sin embargo, el resto de los pacientes ya habrán desarrollado una metástasis oculta o distante cuando se produzca la manifestación clínica del tumor primario y en este caso recibirán un tratamiento adyuvante (después de la intervención quirúrgica) de quimioterapia y/o radioterapia. Lo que determina los criterios a seguir sobre el tratamiento adyuvante es la clasificación histopatológica del tumor y la estadificación de acuerdo con la clasificación TNM junto con los datos clínicos del paciente.

Según los criterios actuales, los tumores con ganglios negativos (T1-4, N0, M0) se tratan mediante una resección completa únicamente del tumor primario, mientras que en los casos donde se observa en los datos histopatológicos una implicación de los ganglios linfáticos (T1-4, N1-2, M0) recibirán quimioterapia y/o radioterapia después de la extracción quirúrgica del tumor primario. A pesar de un perfeccionamiento constante de las herramientas de diagnóstico y de los marcadores principales, así como de las diferentes estrategias de tratamiento [Ragnhammar, P., *et al.*, Acta Oncol. 40 (2001) 282-308], aún existen cuestiones sin resolver respecto al pronóstico exacto y/o la predicción de respuesta ante un tratamiento adyuvante [Iqbal, S., y Lenz, H.J., Curr. Oncol. Rep. 3 (2001) 102-108; Kumar, S.K., y Goldberg, R.M., Curr. Oncol. Rep. 3 (2001) 94-101].

Las enzimas timidina fosforilasa (TF), dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) y timidilato sintasa (TS), están implicadas en el metabolismo de las pirimidinas, y por lo tanto se ven involucradas finalmente en la proliferación normal de las células así como en la transformación patológica de las mismas. La TS es la enzima central y limitante para la síntesis de novo de piridinas y por lo tanto también para la síntesis de novo del RNA/DNA; la DPD está implicada en la degradación del uracilo y la timidina para desactivar los productos de deshecho; y la TF controla los niveles intracelulares de timidina [Diasio, R.B., y Jonson, M.R., Pharmacology 61 (2000) 199-203]. Además, se demostró que la TF es idéntica al factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECGF) [Furukawa, T., *et al.*, Nature 356 (1992) 668; Sumizawa, T., *et al.*, J. Biochem. 114 (1993) 9-14] y manifiesta propiedades angiogénicas en un gran número de tumores sólidos [Takebayashi, Y., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 88 (1996) 1110-1117; Griffiths, L., y Stratford, I.J., Br. J. Cancer 76 (1997) 689-693]. Dichas propiedades pueden convertir la expresión de la TF, la DPD y/o la TS en marcadores pronóstico y quimiopredictivos valiosos en el CCR.

Además, debido a su implicación en el metabolismo de la pirimidina, estas tres enzimas también son importantes para la eficacia del 5-FU y agentes quimioterapéuticos 5-FU [Diasio, R.B., y Johnson, M.R., Pharmacology 61 (2000) 199-203; WO 02/44423]. Mientras la TS es el primer objetivo de dichos quimioterapéuticos, las enzimas TF y DPD actúan en la activación y degradación de estos fármacos y sus intermediarios respectivamente. De tal manera que las tres enzimas de forma individual o los cocientes TS/DPD y TF/DPD, están implicadas como marcadores para los pronósticos y/o predicción de respuestas al tratamiento adyuvante de quimioterapia en el CCR y otros tipos de cáncer. [Metzger, R., *et al.*, Clin. Cancer Res. 4 (1998) 2371-2376; Salonga, D., *et al.*, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 1322-1327; Takenoue, T., *et al.*, Ann. Surg. Oncol. 7 (2000) 193-198; Araki, Y., *et al.*, Kurume Med. J. 48 (2001) 93-98; Edler, D., *et al.*, J. Clin. Oncol. 20 (2002) 1721-1728; Kornmann, M., *et al.*, J. Gastrointest. Surg. 6 (2002) 331-337; Terashima M. *et al.*, Europ. J. of Cancer (2002) 2375-2381; Fujwaki R. *et al.*, J. of Clinical Oncology (2000) 3946-3951]. De hecho, la resistencia de los tumores expuestos a quimioterapia con 5-FU está vinculada a altos niveles de TS [Copur, S., *et al.*, Biochem. Pharmacol. 49 (1995) 1419-1426; Wang, W., *et al.*, Cancer Res. 61 (2001) 5505-5510; Johnston, P.G., *et al.*, Cancer Res. 55 (1995) 1407-1412; Bathe, O.F., *et al.*, Cancer J. Sci. Am. 5 (1999) 34-40] y la intensa toxicidad a los agentes quimioterapéuticos 5-FU está correlacionada con una baja expresión de DPD [Wei, X., *et al.*, J. Clin. Invest. 98 (1996) 610-615, Johnson, M.R., *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (1999) 2006-2011]. El amplio rango en los niveles de expresión de TS y de DPD y los efectos asociados a la respuesta a la quimioterapia parecen ser debidos, por lo menos en cierta manera, a un polimorfismo en la región estimuladora del promotor de TS [Marsh, S., *et al.*, Int. J. Oncol. 19 (2001) 383-386; Iacopetta, B., *et al.*, Br. J. Cancer 85 (2001) 827-830] y a una mutación puntual y habitual dentro del intrón 14 del gen de la DPD respectivamente [van Kuilenburg, A.B., *et al.*, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 4705-4712; Raida, M., *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (2001) 2832-2839]. A pesar de que un gran número de estudios investigan la expresión de la TF, la DPD y la TS en el CCR, el papel que desempeñan las enzimas aún es conflictivo. Esto se debe principalmente a los diversos protocolos de estudio que analizan la expresión de la TF, la DPD y la TS con respecto a cualquier 1) actividad del mRNA, proteína o enzima, 2) en los tumores primarios o en metástasis distantes, y 3) en pacientes que son tratados con varios protocolos de neo o radio/quimioterapia adyuvante.

En vista de los conocimientos previos señalados, debía resolverse el problema de la identificación de aquellos factores, de entre todos aquellos factores potenciales sugeridos anteriormente en los conocimientos previos, que finalmente son indicativos de susceptibilidad al 5-FU y/o a los análogos del 5-FU y que determinan bajo qué condiciones estos factores proporcionan la mayor especificidad posible.

Breve descripción de la invención

De esta manera, la presente invención se refiere a un método para determinar si un paciente que padece cáncer colorrectal es susceptible a un tratamiento con 5-fluorouracilo o con análogos del 5-fluorouracilo que consta de los siguientes pasos:

- a) determinación en una muestra clínica de la expresión del mRNA de la timidina fosforilasa
- b) determinación en dicha muestra clínica de la expresión del mRNA de la dihidropirimidina deshidrogenasa
- c) determinación del cociente del valor obtenido en el paso a) y del valor obtenido en el paso b)
- d) determinación de si el cociente obtenido en el paso c) sobrepasa un valor de corte predeterminado.

Con el fin de evitar demasiados resultados falsos positivos, se ha probado que es muy útil que el valor de corte sea al menos 3 o preferiblemente 3,7 para las proporciones de TF y DPD.

Por otro lado, para evitar demasiados resultados falsos negativos, se ha probado que es muy útil que el valor de corte no sea mayor que 10 y que preferiblemente no sea mayor que 8,2 para las proporciones de TF y DPD.

En una realización particular, existe una determinación adicional del nivel de expresión absoluto o relativo de la dihidropirimidina deshidrogenasa y del valor de expresión por debajo de un cierto valor de corte, es un indicativo adicional para comprobar la susceptibilidad al 5-fluorouracilo o a sus respectivos análogos.

Descripción detallada de la invención

En el estudio que subyace a la invención, la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS se examinó en un único grupo de 102 pacientes con CCR, donde se utilizaron muestras de tumores primarios microdisseccionadas, fijadas en formalina e incluidas en parafina para la RT-PCR cuantitativa (QRT-PCR) en el sistema LightCycler®. Nos dirigimos específicamente a la correlación de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS y las proporciones de la TS/DPD y la TF/DPD de la histología del tumor así como del pronóstico y la predicción a la respuesta del paciente al tratamiento adyuvante de quimioterapia con 5-FU.

Los inventores investigaron en detalle la expresión del mRNA de la timidina fosforilasa (TF), la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) y la timidilato sintasa (TS) en el CCR, haciendo mayor énfasis en su valor como marcadores de pronóstico en general y como marcadores predictivos para la quimioterapia con 5-FU. Para esto, se desarrolló y aplicó un novedoso enfoque de la cuantificación RT-PCR del mRNA de la TF, la DPD y la TS que utiliza el sistema LightCycler® (Roche Applied Science) para los tejidos tumorales microdisseccionados, fijados en formalina e incluidos en parafina en 102 pacientes con CCR. En comparación con otros estudios [Johnston, P.G., *et al.*, *Cancer Res.* 55 (1995) 1407-1412] [Metzger, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2371-2376; Salonga, D., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1322-1327] y considerando su desarrollo anterior, los inventores examinaron la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en tumores primarios y evaluaron el impacto del pronóstico y la respuesta clínica de los pacientes a la quimioterapia con 5-FU mediante la correlación de los niveles de enzimas para el seguimiento de los pacientes. Aunque se haya analizado la expresión de la TF, la DPD y la TS en los tumores primarios del CCR en lo que a pronósticos se refiere [Takebayashi, Y., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1110-1117; Araki, Y., *et al.*, *Kurume Med. J.* 48 (2001) 93-98; Edler, D., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1721-1728; Sanguedolce, R., *et al.*, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1515-1520; Paradiso, A., *et al.*, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 560-567; Findlay, M.P., *et al.*, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 903-909; Allegra, C.J., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1735-1743], nuestro estudio es el primero en examinar el valor predictivo y de pronóstico de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS dentro de un grupo de casos de CCR con un tamaño de muestra único, subgrupos de tratamiento, datos de seguimiento y la utilización de un método normalizado para el muestreo de tejidos y la conservación de los mismos.

El análisis detallado de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en 102 casos de CCR, nos mostró una amplia variedad de niveles de expresión para las tres enzimas. Esto ya se había observado anteriormente [Iqbal, S., y Lenz, H.J., *Curr. Oncol. Rep.* 3 (2001) 102-108; Metzger, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2371-2376; Mori, K., *et al.*, *Int. J. Oncol.* 17 (2000) 33-38], y junto con estos resultados se subraya el concepto de heterogeneidad intertumoral.

Por último cabe destacar que mediante el cociente de la TF/DPD y la TS/DPD, también se ha expresado la asociación de los niveles del mRNA de la TF y la TS con la histopatología de un tumor determinado. La explicación para entender estos datos podría estar relacionada con las funciones biológicas de dichas enzimas: Mientras la TF, también conocida como factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas [Furukawa, T., *et al.*, *Nature* 356 (1992) 668; Sumizawa, T., *et al.*, *J. Biochem.* 114 (1993) 9-14], se asocia con la angiogénesis en un gran número de tumores sólidos [Takebayashi, Y., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1110-1117; Griffiths, L, y Stratford, I.J., *Br. J.*

Cancer 76 (1997) 689-693], la TS puede ser considerada como un marcador de actividad metabólica y de proliferación celular [Pestalozzi, B.C., *et al.*, Br. J. Cancer 71 (1995) 1151-1157; Backus, H.H., *et al.*, J. Clin. Pathol. 55 (2002) 206-211; Pestalozzi, B.C., *et al.*, Br. J. Cancer 71 (1995) 1151-1157]. Por tanto, una mayor expresión del mRNA de la TF y la TS en los tumores “tempranos” puede reflejar su actividad para facilitar el mantenimiento vascular y la proliferación de las células tumorales, la cual se produce a medida que progresa para favorecer por ejemplo, la invasión celular tumoral y la metástasis. De hecho, se han asociado bajos niveles de expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS a la respuesta favorable a la quimioterapia con 5-FU [Metzger, R., *et al.*, Clin. Cancer Res. 4 (1998) 2371-2376; Salonga, D., *et al.*, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 1322-1327]. Además, también partiendo de nuestros datos, es exactamente este grupo de tumores con estadios avanzados según la UICC, como por ejemplo aquellos pacientes que reciben un tratamiento adyuvante de quimioterapia, el que produce bajos niveles del mRNA de la TF y la TS.

Los datos previos han tratado de manera aislada o combinada la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS, como marcadores potenciales para pronósticos [Takenoue, T., *et al.*, Ann. Surg. Oncol. 7 (2000) 193-198; Edler, D., *et al.*, J. Clin. Oncol. 20 (2002) 1721-1728; Sanguedolce, R., *et al.*, Anticancer Res. 18 (1998) 1515-1520; Paradiso, A., *et al.*, Br. J. Cancer 82 (2000) 560-567; Allegra, C.J., *et al.*, J. Clin. Oncol. 20 (2002) 1735-1743] y/o como predicción de respuesta ante la quimioterapia con 5-FU en el CCR [Metzger, R., *et al.*, Clin. Cancer Res. 4 (1998) 2371-2376; Salonga, D., *et al.*, Clin. Cancer Res. 6 (2000) 1322-1327; Araki, Y., *et al.*, Kurume Med. J. 48 (2001) 93-98; Johnston, P.G., *et al.*, Cancer Res. 55 (1995) 1407-1412]. Además, últimamente los cocientes de la TF/DPD y/o la TS/DPD se han mostrado como marcadores de pronóstico y/o predictivos [Kornmann, M., *et al.*, J. Gastrointest. Surg. 6 (2002) 331-337; Ishikawa, T., *et al.*, Cancer Res. 58 (1998) 685-690. Terashima M. *et al.*, Europ. J. of Cancer (2002), 2375-2381; Fujiwaki R. *et al.*, J. of Clinical Oncology (2000) 3946-3951]. En el presente estudio, los inventores podrían identificar al cociente de la TS/DPD como un marcador de pronóstico, con cocientes más altos de la TS/DPD correlacionados con un total de supervivencia bajo en pacientes con CCR a los que sólo se les ha practicado una resección.

Lo más importante es que el presente estudio revela una correlación muy significativa entre los niveles del mRNA de la DPD y el cociente de la TF/DPD con una supervivencia libre de enfermedad después de seguir quimioterapia con 5-FU, a través de la cual se desvelan bajos niveles del mRNA de la DPD y un alto cociente de la TF/DPD que predice una mayor supervivencia libre de enfermedad. Esto puede estar relacionado con el hecho de que sólo los bajos niveles de la DPD o de que los bajos niveles de la DPD y los altos niveles de la TF (alto cociente de la TF/DPD) estabilizarán el nivel activo del 5-FU. Por el contrario, ni los niveles del mRNA de la TF, la DPD o la TS, ni los cocientes de la TF/DPD o la TS/DPD tenían ningún valor predictivo en cuanto a la supervivencia total.

Mientras los estudios previos han dirigido la expresión de la proteína de la TF, la DPD y la TS en los tumores de los CCR mediante inmunohistoquímica [Takebayashi, Y., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 88 (1996) 1110-1117; Edler, D., *et al.*, J. Clin. Oncol. 20 (2002) 1721-1728; Paradiso, A., *et al.*, Br. J. Cancer 82 (2000) 560-567; Findlay, M.P., *et al.*, Br. J. Cancer 75 (1997) 903-909; Allegra, C.J., *et al.*, J. Clin. Oncol. 20 (2002) 1735-1743], el contenido de proteína [Sanguedolce, R., *et al.*, Anticancer Res. 18 (1998) 1515-1520] o la actividad de la enzima [Araki, Y., *et al.*, Kurume Med. J. 48 (2001) 93-98], los inventores se decidieron por el análisis del mRNA de la TF, la DPD y la TS mediante la RT-PCR cuantitativa, porque este método es rápido, fiable, fácil de normalizar y funciona correctamente si se utiliza para largas series de muestras de tejidos microdisecionados, incluidos en parafina y fijados con formalina. Debido a las modificaciones postranscripcionales y a las relacionadas con la fijación (y funcionalmente asociadas), se podría haber supuesto alguna dificultad para detectar cualquier valor de pronóstico y/o predictivo de estas enzimas en los niveles del RNA [Kawakami, K., *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (2001) 4096-4101].

No obstante, muchos investigadores han demostrado una buena correlación entre por ejemplo, el gen de la DPD y la TS y la expresión de la proteína [Johnston, P.G., *et al.*, Cancer Res. 55 (1995) 1407-1412; Uetake, H., *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (1999) 2836-2839; Tanaka-Nozaki, M., *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (2001) 2783-2787]. A fin de validar nuestro método, los inventores sometieron a las células microdisecionadas procedentes de tejidos control a una revisión. Los resultados reflejaron los datos publicados anteriormente con por ejemplo, altos niveles de la TF en células inflamatorias [Fox, S.B., *et al.*, J. Pathol. 176 (1995) 183-190] y altos niveles de la DPD en el hígado [Guimbaud, R., *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 45 (2000) 477-482; Johnston, S.J., *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (1999) 2566-2570]. Además, los tumores presentaron tener niveles más bajos de la DPD [Johnston, S.J., *et al.*, Clin. Cancer Res. 5 (1999) 2566-2570; Miyamoto, S., *et al.*, Int. J. Oncol. 18 (2001) 705-713] y más altos de la TF [Takebayashi, Y., *et al.*, Eur. J. Cancer 32 (1996) 1227-1232; Miwa, M., *et al.*, Eur. J. Cancer 34 (1998) 1274-1281] que los tejidos sanos, un concepto que subyace a la especificidad de los tumores para los profármacos de 5-FU.

Mientras los inventores también detectaron niveles más bajos de la DPD en las células “tumorales” que en las células “epiteliales normales” aisladas, los resultados no revelaron diferencias entre los niveles del mRNA de la TS y la TF en células tumorales y “normales”. Posiblemente lo que más determine esto sea el hecho de cómo defina cada uno a una población de células “normales” con la mayor precisión posible. Para interpretar la expresión de la TF, la DPD y la TS, será importante la adquisición de tejido controlado morfológicamente, ya que las células no epiteliales pueden poseer una importancia relevante en los resultados. Por lo tanto, como anteriormente se ha comentado, cuando los inventores compararon las células normales de músculo liso del colon (en lugar de las muestras de células epiteliales normales) con células tumorales, estas últimas manifestaron una expresión del mRNA de la TF y la TS más elevada [Takebayashi, Y., *et al.*, Eur. J. Cancer 32 (1996) 1227-1232; Miwa, M., *et al.*, Eur. J. Cancer 34 (1998) 1274-1281].

En resumen, la presente invención está dirigida a un novedoso método de RT-PCR cuantitativa para determinar la susceptibilidad al 5-FU y/o a análogos del 5-FU en pacientes con cáncer colorrectal. Este nuevo método se caracteriza

por la determinación del cociente de la TF/DPD y opcionalmente de la expresión del mRNA de la DPD en biopsias de FFPE de pacientes. El cociente de la TF/DPD tiene un valor predictivo para la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer colorrectal a los que se les asigna un tratamiento adyuvante con 5-FU.

- 5 Los siguientes ejemplos, figuras y referencias se proporcionan para facilitar la comprensión del invento, cuyo verdadero alcance se establece en las reivindicaciones anexadas.

Descripción de la figuras

- 10 Figura 1 *Expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en los tejidos microdisecionados*. Mucosa normal del colon (n=8) y muscularis propia (n=3), colitis crónica (n=3), cáncer colorrectal (CCR; n=102) e hígado sano (n=1, duplicado). Los niveles del mRNA se expresan mediante el cociente relativo (media \pm desviación estándar).

- 15 Figura 2 *Expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en los 102 pacientes con CCR*. Cada símbolo refleja un caso, con barras y números que indican la mediana de los niveles del mRNA (cociente relativo) para: todos los casos (cuadrados, n=12), los No-CTX (triángulos, n=4) y los CTX (círculos, n=52).

- 20 Figura 3 *Expresión del mRNA asociado a la histología del tumor*. Visión general en el gráfico de las correlaciones importantes estadísticamente, con columnas que representan la mediana del nivel dentro de cada subgrupo. El eje Y indica niveles del mRNA relativos o cocientes de enzimas. Para visualizar los valores de p dirigirse a la Tabla 2.

- 25 Figura 4 *Correlación del cociente de la TF/DPD con la supervivencia total e indemne*. Análisis de Kaplan-Meier respecto a la supervivencia total para los grupos (A) de pacientes No-CTX (n=40) y los CTX (n=52). Ni los niveles del mRNA de la TF y la DPD, ni los de la TS tenían un valor predictivo para la supervivencia total en pacientes tratados con 5-FU (CTX) (B, con un valor de corte equivalente a la mediana de la expresión del mRNA). Sin embargo, el cociente de los niveles bajos del mRNA de la DPD estaban correlacionados de una forma muy significativa con la supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con 5-FU (C, con valores de corte como los indicados).

- 30 Figura 5 *Correlación de los niveles del mRNA del cociente de la TF/DPD con la supervivencia total e indemne*. Análisis de Kaplan-Meier respecto a la supervivencia indemne y su correlación con el cociente de la TF/DPD. Los cocientes elevados de la TF/DPD estaban correlacionados de una forma considerable con la supervivencia libre de enfermedad en pacientes tratados con 5-FU (Valores de corte: A=0,39; B=3,7; C=5,0; D=6,2; E=8,1).

Ejemplos

- 35 Ejemplo 1

Pacientes y tejidos

- 40 Las muestras de cáncer colorrectal se han obtenido del archivo del Instituto de Anatomía Patológica *Klinikum rechts der Isar* en Munich, Alemania. Se analizaron muestras de los tumores primarios extraídos de un total de 102 pacientes mediante la microdissección de células tumorales (Tabla 1; la mediana del seguimiento clínico equivale a 63,5 meses en un intervalo de 8 a 125 meses).

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 279 266 T3

TABLA 1

Resumen de las características de los pacientes

	Todos		No-CTX ¹		CTX ¹	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pacientes	102		40		52	
Edad	62 años		68 años		60 años	
Sexo						
Hombre	67	65,7	25	62,5	35	67,3
Mujer	35	34,3	15	37,5	17	32,7
Localización del tumor:						
Colon	65	63,7	21	52,5	42	80,8
Recto	37	36,3	19	47,5	10	19,2
Clasificación						
T1	4	3,9	3	7,5	1	1,9
T2	14	13,7	9	22,5	5	9,6
T3	64	62,8	26	65	29	55,8
T4	20	19,6	2	5	17	32,7
Clasificación N:						
N0	52	51	38	95	4	7,7
N1	32	31,4	1	2,5	31	59,6
N2	18	17,6	1	2,5	17	32,7
Estadio según la UICC:						
I	12	11,8	12	30	-	-
II	40	39,2	26	65	4	7,7
III	50	49	2	5	48	92,3
Grado diferencial						
2	70	68,6	31	77,5	31	59,6
3	31	30,4	9	22,5	20	38,5
4	1	1	-	-	1	1,9
Datos clínicos						
Enfermedad recurrente	33	32,4	11	27,5	22	42,3
Supervivencia libre de enfermedad²	59 meses		64 meses		56 meses	
Supervivencia total²	63,5 m.		65,5 m.		57 m.	
Seguimiento²	63,5 m. (8-125)		65,5 m. (14-125)		57 m. (8-125)	

¹ = 10 casos excluidos del análisis estadístico para terapias combinadas; ² = Números que representan la mediana estadística (intervalo) de supervivencia en meses.

ES 2 279 266 T3

Tenemos 40 pacientes que sólo se sometieron a una resección del tumor (grupo No-CTX), 52 pacientes que recibieron un tratamiento adyuvante con quimioterapia después de una resección (grupo CTX) y 10 pacientes que recibieron un tratamiento adyuvante de quimioterapia y radioterapia combinada. El tratamiento adyuvante en el grupo CTX fue el siguiente: Se trataron 25/52 pacientes bajo el protocolo de Mayo (6 meses con 425 mg/m² de 5-FU y 20 mg/m² de leucovorina) [O'Connell, M.J., *et al.*, J. Clin. Oncol. 15 (1997) 246-250], 7/52 pacientes bajo el tratamiento "Mörtel" (450 mg/m² de 5-FU y 50 mg/m² de levamisol) [Moertel, C.G., *et al.*, N. Engl. J. Med. 322 (1990) 352-358], 5/52 pacientes bajo el protocolo de tratamiento Ardan (24 h. de 2.600 mg/m² de 5-FU y 500 mg/m² de leucovorin) [Ardalan, B., *et al.*, J. Clin. Oncol. 9 (1991) 625-630], 14/52 pacientes bajo un protocolo de tratamiento Ardan modificado y 1/52 pacientes bajo el protocolo de tratamiento SAKK (500 mg/m² de 5-FU y 10 mg/m² de mitomicina C) [SAKK, Lancet 345 (1995) 349-353]. Se utilizaron muestras de tejidos de colon sano, colitis crónica (ver arriba) e hígado sano como control. Todos los tejidos se han fijado con formalina (una solución amortiguadora con formalina al 10%) e incluido en parafina (FFPE) de acuerdo con las directrices habituales. Antes de realizar el análisis se confirmó la histopatología de cada muestra mediante secciones seriadas teñidas de hematoxilina.

15 Ejemplo 2

Microdissección

Antes de la extracción del RNA de los tejidos FFPE, las secciones de micrótopo (5 µm) se trataron con xileno y alcoholes graduados bajo condiciones libres de ribonucleasa. Para la microdissección posterior, las secciones se tiñeron de forma individual con hematoxilina instantánea (Shandon, Frankfurt, Alemania) y las células tumorales se diseccionaron bajo observación microscópica utilizando agujas finas (calibre 18). La pureza de la población de células tumorales diseccionadas fue de un 80-90%.

Los tejidos control se diseccionaron bajo las mismas condiciones e incluyen mucosa normal del colon (n=8; células epiteliales) y muscularis propia del colon (n=4; células musculares), lesiones reactivas de colitis crónica (n=3; Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y diverticulitis del colon sigmoideo) e hígado sano (n=1; todas las poblaciones de células). Para los últimos dos grupos de control se realizó una duplicación de los análisis mediante la elaboración de dos secciones de series de cada muestra de tejido de forma separada.

30 Ejemplo 3

Aislamiento del RNA

Como ya se ha descrito anteriormente, las muestras de tejido microdisseccionado estuvieron sujetas a un aislamiento del RNA en 52 casos de CCR [Lassmann, S., *et al.*, J. Pathol. 198 (2002) 198-206]. En resumen, las células tumorales microdisseccionadas se colocaron inmediatamente dentro de tubos Eppendorf con tampón de digestión (TrisHCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; SDS al 2% y 0,5 mg de proteinasa K, todas de Sigma, Taufkirchen, Alemania). La incubación se hizo durante la noche (60°C, 350-400 rpm) seguida de una extracción con fenol-cloroformo y una precipitación de ácidos nucleicos en isopropanol. Posteriormente, el botón de RNA resultante se purificó mediante una incubación (45 min., 37°C) con 10 U de desoxiribonucleasa I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), 20 µl de tampón de desoxiribonucleasa (TrisHCl 0,4 M; MgCl₂ 60 mM; NaCl 0,1 M) y H₂O hasta 200 µl. Más tarde se obtuvo de nuevo RNA mediante una extracción de fenol-cloroformo, una precipitación y una resuspensión en H₂O. En 50 casos de CCR y en las muestras control, se aislaron las células control o tumorales microdisseccionadas con un equipo "HighPure RNA Paraffin Kit" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo establecido. Este método también consiste en una fase de digestión de proteinasa K, una purificación de los ácidos nucleicos, una fase de digestión de desoxiribonucleasa y una nueva purificación del RNA. En experimentos preliminares se obtuvieron resultados similares mediante los dos métodos a partir de tres secciones seriadas de tejido de una mucosa normal y de una muestra de tumor aislada (no se muestran los datos). El RNA se almacenó a -70°C hasta que se vuelva a utilizar.

50 Ejemplo 4

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (QRT-PCR)

La PCR cuantitativa con transcripción inversa en el sistema LightCycler[®] se realizó mediante reactivos y equipos de la Roche Applied Science de acuerdo con las instrucciones del proveedor. En resumen, las muestras del RNA se distribuyeron en 4 alícuotas iguales, y todas recibieron la misma mezcla de reactivos del cDNA y también de la TF, la DPD, la TS o cebadores de referencia específicos de gen (Números de catálogo 3 302 946, 3 302 938, 3 302 954). En esta fase se incluyó un control positivo del RNA (calibrador, de los equipos de cuantificación del mRNA con el sistema LC para la TF, la DPD y la TS). Un calibrador del RNA junto con 4 muestras desconocidas siempre se ha tomado como un conjunto individual para controlar la calidad y la capacidad de reproducción. En un mismo ensayo de la PCR cuantitativa siempre se han analizado simultáneamente los conjuntos de 3 cDNA utilizando el equipo de cuantificación del mRNA con el sistema LC para la TF, la DPD y la TS. Para el análisis de datos se empleó el programa informático *Relative Quantification Software* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Dicho programa calcula el cociente relativo de los Cp(enzima : gen de referencia)_{muestra} entre los Cp(enzima : gen de referencia)_{calibrador}, de ese modo se controlan ambos para la carga de la muestra (datos del RNA) y el rendimiento de la PCR respecto al punto constante de referencia (calibrador). Para asegurar una cuantificación exacta, únicamente se incluyeron los datos sobre las preparaciones del RNA que incluían de 20 a un máximo de 33 puntos de cruce de la

curva (intervalo de amplificación lineal). La varianza de la expresión del mRNA de la TF, la DPD, la TS y del gen de referencia (media \pm desviación estándar) fue mínima, con $26,62 \pm 0,36$, $28 \pm 0,51$, $22 \pm 0,23$ y $23,19 \pm 0,7$ para 29 calibradores respectivamente (contando con $29 \times 4 = 116$ muestras de tejido).

5 Ejemplo 5

Estadísticas

10 Los parámetros cuantitativos se describieron empleando la media o la mediana con la desviación estándar y los intervalos respectivamente. Los parámetros cualitativos se examinaron mediante tablas de frecuencia. Se llevaron a cabo pruebas no paramétricas (con la aplicación informática SAS[®]; versión 8.02) dado que se observó una desviación de la distribución normal para todos los marcadores.

15 En el grupo de los 102 casos, tanto la expresión de la TF, la DPD y la TS, como el cociente de la TS/DPD y la TF/DPD estaban correlacionadas con 1) la edad y el sexo de los pacientes, y 2) la localización del tumor primario, la clasificación TNM, el estadio según la UICC y el grado de diferenciación. Esto se realizó mediante el coeficiente de correlación de Spearman y la prueba de correlación nula. Para comparar subgrupos individuales, se empleó el test de Wilcoxon para las muestras independientes y la prueba de Kruskal-Wallis. Se dividieron los 102 casos en los grupos No-CTX (n=40) y CTX (n=52) para evaluar el impacto del pronóstico y/o el valor de predicción de respuesta de las tres enzimas. Se excluyeron los pacientes que recibieron una terapia combinada de radioterapia y quimioterapia (n=10). Dentro de los dos subgrupos se llevó a cabo un análisis estadístico por separado para observar la correlación de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS y el cociente de la TS/DPD y la TF/DPD con: la incidencia de la enfermedad recurrente, la incidencia de mortalidad, así como la supervivencia libre de enfermedad o total. Los análisis de supervivencia se obtuvieron mediante una regresión de Cox y una prueba de log-rank (prueba de rango logarítmico), estableciendo el nivel de significación al 5%.

Ejemplo 6

Resultados

30 *Expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en el colon sano, la colitis crónica y el CCR*

35 Inicialmente, los niveles de expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS se examinaron a través de series de muestras control microdisecionadas y FEPP mediante una RT-PCR cuantitativa y utilizando el sistema LightCycler[®]. Como se observa en la figura 1, en todas las muestras se detectó la expresión del mRNA para la TF, la DPD y la TS, pero los niveles de expresión del mRNA eran diferentes entre los tejidos: Se pudo apreciar una expresión elevada del mRNA de la TF en las lesiones reactivas de colitis crónica, acompañada de unos niveles moderados en la mucosa del colon sano (células epiteliales) y en un hígado sano (población de células mixtas) e incluso una baja expresión en la muscularis propia de un colon sano (células musculares). La expresión del mRNA de la DPD es mayor en un hígado sano, acompañada de una muscularis propia normal mayor que las lesiones reactivas de la colitis crónica y mayor o igual que la mucosa normal. La TS se expresó de una manera muy pronunciada en la mucosa normal más que en las lesiones reactivas de colitis crónica y más que en la muscularis propia y el hígado sano.

45 En comparación, la media de los niveles de expresión de la TF, la DPD y la TS de las muestras de tumor de colon (n=102, véase más arriba) reveló una baja expresión del mRNA de la DPD en las muestras de tumores cuando se comparaban con las células epiteliales de la mucosa normal. Por el contrario, no se detectó una diferencia importante en los niveles del mRNA de la TF y la TS entre la mucosa normal y los tejidos tumorales.

50 *Cribado de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en 102 pacientes con cáncer colorrectal*

55 El grupo de pacientes examinado incluye 102 casos de CCR en distintas fases (Tabla 1, Materiales y Métodos), a los que solamente se les ha practicado una resección (40 casos en el grupo No-CTX), o una resección y la posterior quimioterapia con 5-FU (52 casos en el grupo CTX) o con una resección y una combinación de radioterapia y quimioterapia (10 casos).

60 Los análisis de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en todos los 102 casos de CCR mostraron una amplia variedad en los niveles de expresión de las enzimas (Figura 2). Expresados como cociente relativo, los intervalos para la TF, la DPD y la TS eran 1,52-166,29, 0-24,39 y 0,21-3,71, respectivamente. Tras la división de los casos en grupos de No-CTX y CTX, la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS era similar en ambos grupos, excepto en el caso en que se presenta una disminución en la expresión del mRNA de la TF en el grupo CTX. Esto se ve reflejado mediante una mediana estadística de los niveles de expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS (Figura 2).

65 *Correlación de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS con los datos y la histología del paciente*

Como se recoge en la Tabla 2A, no se reveló una correlación importante estadísticamente entre los niveles del mRNA de la TF, la DPD y la TS o los cocientes de la TS/DPD y la TF/DPD con la edad o el sexo del paciente y la situación del tumor primario (colon o recto).

ES 2 279 266 T3

TABLA 2

Los números representan los valores p de la prueba de Kruskal-Wallis para los pacientes y los parámetros del tumor

5

10

15

20

25

30

A	TF	DPD	TS	Cociente de la TF/DPD	Cociente de la TS/DPD
Paciente	-	-	-	-	-
Edad	-	-	-	-	-
Sexo	-	-	-	-	-
Tumor Localización	-	-	-	-	-
Clasificación T	0,03	-	-	0,007	0,014
Clasificación N	0,04	-	-	0,001	-
Estadio según la UICC	0,009	-	-	0,001	-
Grado Diferencial	-	-	0,0014	-	0,033

35

40

45

No obstante, sí se apreciaron diferencias significativas respecto a 1) la expresión del mRNA de la TF con la clasificación T ($p=0,03$) y N ($p=0,04$) del tumor y el estadio según la UICC ($p=0,009$); 2) la expresión del mRNA de la TS con el grado de diferenciación ($p=0,001$); 3) el cociente de la TS/DPD con la clasificación T del tumor ($p=0,014$) y el grado de diferenciación ($p=0,033$); y 4) el cociente de la TF/DPD con la clasificación T ($p=0,007$) y N ($p=0,001$) del tumor y el estadio de la UICC ($p=0,001$). Como se muestra en la figura 3, la expresión del mRNA de la TF y el cociente de la TF/DPD descienden de forma considerable en las clasificaciones del tumor T y N avanzadas así como también lo hace en los estadios avanzados según la UICC. La expresión del mRNA de la TS era notablemente más baja en el grado 3 de diferenciación de los tumores que en el grado 2. Finalmente, el cociente de la TS/DPD era más bajo en los tumores con una clasificación T avanzada, así como también en el grado 3 de diferenciación de los tumores más que en el grado 2.

Expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS en el CCR - correlación con los pronósticos

50

55

Para correlacionar la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la TS con pronósticos, se excluyeron los pacientes que recibieron un tratamiento adyuvante de quimioterapia y radioterapia ($n=10$) de los análisis estadísticos. Además, como los pacientes que tienen afectados los nódulos linfáticos (N+) en general tienen peor pronóstico que aquellos a los que clasificamos como N0 [1], los 92 pacientes restantes se dividieron en aquellos que no han recibido una terapia adyuvante ($n=40$; No CTX) y aquellos que recibieron un tratamiento adyuvante de quimioterapia ($n=52$; CTX), como se muestra en la figura 4A. Por lo tanto, el análisis estadístico se realizó de forma independiente dentro de los dos grupos respecto a la incidencia de una enfermedad recurrente y la muerte, así como de la supervivencia total o libre de enfermedad. En primer lugar, no se ha revelado ninguna correlación importante entre la expresión del mRNA de la TF, o la DPD, o la TS o los cocientes de la TS/DPD y la TF/DPD, y la incidencia de una enfermedad recurrente o la muerte (Tabla 2B).

60

65

TABLA 2

Números que representan los valores p de la regresión de Cox para parámetros de seguimiento

B	TF	DPD	TS	Cociente de la TF/DPD	Cociente de la TS/DPD
Grupo No-CTX					
Enfermedad Recurrente	-	-	-	-	-
Supervivencia total	-	-	-	-	0,032
Grupo CTX					
Enfermedad recurrente	-	-	-	-	-
Supervivencia libre de enfermedad	-	0,05	-	0,002	-
Supervivencia total	-	-	-	-	-

En segundo lugar, ninguna de las enzimas o el cociente de la TF/DPD tuvieron gran influencia en el total de supervivientes (Análisis de Kaplan-Meier). En tercer lugar, el análisis multivariante de la expresión del mRNA de la TF, la DPD y la supervivencia total no revelaron ninguna correlación importante, aunque en el grupo CTX sí que se correlacionaron considerablemente la expresión del mRNA de la TF y la DPD ($p < 0,0001$). Estos datos fueron reales tanto en el grupo No-CTX como en el CTX (Tabla 2).

Por el contrario, dentro del grupo No-CTX la supervivencia total sí que se relaciona de una manera significativa con el cociente de la TS/DPD, a través del cual el riesgo de muerte aumenta cuanto más grande son los cocientes de la TS/DPD.

Expresión del mRNA de los marcadores TF, la DPD y la TS - para una respuesta de predicción

Para evaluar si los niveles del mRNA de la TF, la DPD y la TS o el cociente de la TF/DPD o la TS/DPD pueden predecir la respuesta clínica a la quimioterapia con 5-FU, se realizó un análisis estadístico detallado para los pacientes que pertenecen al grupo CTX. Tras la subdivisión de los pacientes del grupo CTX en aquellos con bajos y altos niveles del mRNA de la TF, la DPD y la TS (valor de corte=mediana, como se indica en la figura 2) y los análisis de Kaplan Meier posteriores, no se encontró ninguna correlación respecto a la supervivencia total (Figura 4B). Asimismo, ni los bajos ni los altos cocientes de la TF/DPD o la TS/DPD predijeron la supervivencia total en ninguno de los 2 subgrupos de CTX (no se muestra).

No obstante, sí que se observaron significantes correlaciones en los niveles de mRNA de la DPD y en el cociente de la TF/DPD respecto a la supervivencia libre de enfermedad (figura 4C). Por lo tanto, utilizando un valor de corte de 8,2 para el mRNA, se correlacionó una baja expresión del mRNA de la DPD con la supervivencia libre de enfermedad con $p=0,05$.

Además, también se registró una correlación positiva entre la supervivencia indemne y el cociente de la TF/DPD. Como se muestra en la figura 5, utilizando unos valores de corte de 3,7 (figura 5b); 5,0 (figura 5c); 6,2 (figura 5d); y 8,1 (figura 5d), un cociente elevado de la TF/DPD se correlacionaba considerablemente con la supervivencia libre de enfermedad con $p=0,002$.

Lista de referencias

- Allegra, C.J., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1735-1743.
- 5 Araki, Y., *et al.*, *Kurume Med. J.* 48 (2001) 93-98.
- Ardalan, B., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 9 (1991) 625-630.
- Backus, H.H., *et al.*, *J. Clin. Pathol.* 55 (2002) 206-211.
- 10 Bathe, O.F., *et al.*, *Cancer J. Sci. Am.* 5 (1999) 34-40.
- Copur, S., *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 49 (1995) 1419-1426.
- 15 Diasio, R.B., and Johnson, M.R., *Pharmacology* 61 (2000) 199-203.
- Edler, D., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 1721-1728.
- Findlay, M.P., *et al.*, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 903-909.
- 20 Fox, S.B., *et al.*, *J. Pathol.* 176 (1995) 183-190.
- Fujiwaka R. *et al.*, of *Clinical Oncology* (2000) 3946-3951.
- 25 Furukawa, T., *et al.*, *Nature* 356 (1992) 668.
- Griffiths, L, and Stratford, I.J., *Br. J. Cancer* 76 (1997) 689-693.
- Guimbaud, R., *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45 (2000) 477-482.
- 30 Iacopetta, B., *et al.*, *Br. J. Cancer* 85 (2001) 827-830.
- Iqbal, S., and Lenz, H.J., *Curr. Oncol. Rep.* 3 (2001) 102-108.
- 35 Ishikawa, T., *et al.*, *Cancer Res.* 58 (1998) 685-690.
- Johnson, M.R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2006-2011.
- Johnston, P.G., *et al.*, *Cancer Res.* 55 (1995) 1407-1412.
- 40 Johnston, S.J., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2566-2570.
- Kawakami, K., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 4096-4101.
- 45 Kornmann, M., *et al.*, *J. Gastrointest. Surg.* 6 (2002) 331-337.
- Kumar, S.K., and Goldberg, R.M., *Curr. Oncol. Rep.* 3 (2001) 94-101.
- Lassmann, S., *et al.*, *J. Pathol.* 198 (2002) 198-206.
- 50 Marsh, S., *et al.*, *Int. J. Oncol.* 19 (2001) 383-386.
- Metzger, R., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2371-2376.
- 55 Miwa, M., *et al.*, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1274-1281.
- Miyamoto, S., *et al.*, *Int. J. Oncol.* 18 (2001) 705-713.
- Moertel, C.G., *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 352-358.
- 60 Mori, K., *et al.*, *Int. J. Oncol.* 17 (2000) 33-38.
- O'Connell, M.J., *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 246-250.
- 65 Paradiso, A., *et al.*, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 560-567.
- Pestalozzi, B.C., *et al.*, *Br. J. Cancer* 71 (1995) 1151-1157.

ES 2 279 266 T3

Pestalozzi, B.C., et al., *Br. J. Cancer* 71 (1995) 1151-1157.

Ragnhammar, P., et al., *Acta Oncol.* 40 (2001) 282-308.

5 **Raida, M., et al.,** *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2832-2839.

SAKK, *Lancet* 345 (1995) 349-353.

Salonga, D., et al., *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1322-1327.

10

Sanguedolce, R., et al., *Anticancer Res.* 18 (1998) 1515-1520.

Sumizawa, T., et al., *J. Biochem.* 114 (1993) 9-14.

15

Takebayashi, Y., et al., *Eur. J. Cancer* 32 (1996) 1227-1232.

Takebayashi, Y., et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1110-1117.

Takenoue, T., et al., *Ann. Surg. Oncol.* 7 (2000) 193-198.

20

Tanaka-Nozaki, M., et al., *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2783-2787.

Terashima M. et al., *Europ. J. of Cancer* (2002) 2375-2381.

25

Uetake, H., et al., *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2836-2839.

Van **Kuilenburg, A.B., et al.,** *Clin. Cancer Res.* 6 (2000). 4705-4712

Wang, W., et al., *Cancer Res.* 61 (2001) 5505-5510.

30

Wei, X., et al., *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 610-615. WO 02/44423.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 279 266 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para determinar si el paciente que padece un cáncer colorrectal es susceptible al tratamiento con 5-Fluorouracilo y/o análogos del 5-Fluorouracilo que consta de los siguientes pasos:

a) determinación de la expresión del mRNA de la timidina fosforilasa en una muestra clínica

b) determinación de la expresión del mRNA de la dihidropirimidina deshidrogenasa en dicha muestra clínica

10 c) determinación del cociente del valor obtenido en el paso a) y el valor obtenido en el paso b)

d) determinación de si el cociente obtenido en el paso c) excede un determinado valor de corte.

15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho valor de corte es al menos 3 y preferiblemente al menos 3,7.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho valor de corte no sea mayor que 10 y preferiblemente no sea mayor que 8,2.

20 4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 3, que además se **caracteriza** en que un nivel de expresión del mRNA absoluto o relativo de la dihidropirimidina deshidrogenasa y un valor de expresión por debajo de un cierto valor de corte es adicionalmente indicativo de susceptibilidad al 5-Fluorouracilo y/o análogos del 5-Fluorouracilo.

25 5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 4, **caracterizado** por un nivel de expresión del mRNA de la timidina fosforilasa y/o la dihidropirimidina deshidrogenasa, que se determina mediante la PRC con transcripción inversa.

30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** en que una secuencia específica de cebador de timidina fosforilasa y/o una secuencia específica de cebador de dihidropirimidina deshidrogenasa que se elonga durante el paso de la síntesis del cDNA.

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

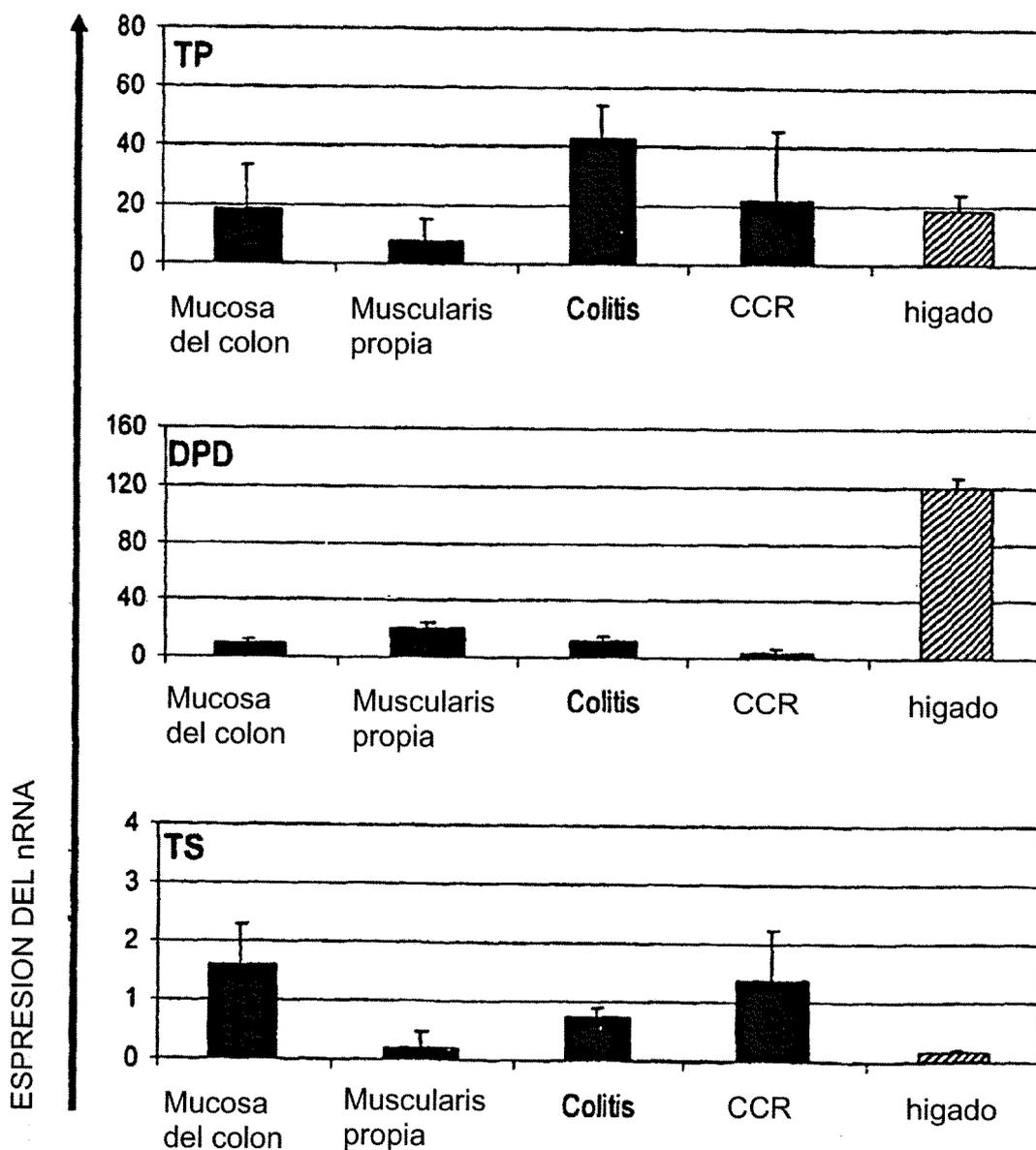


Fig. 2

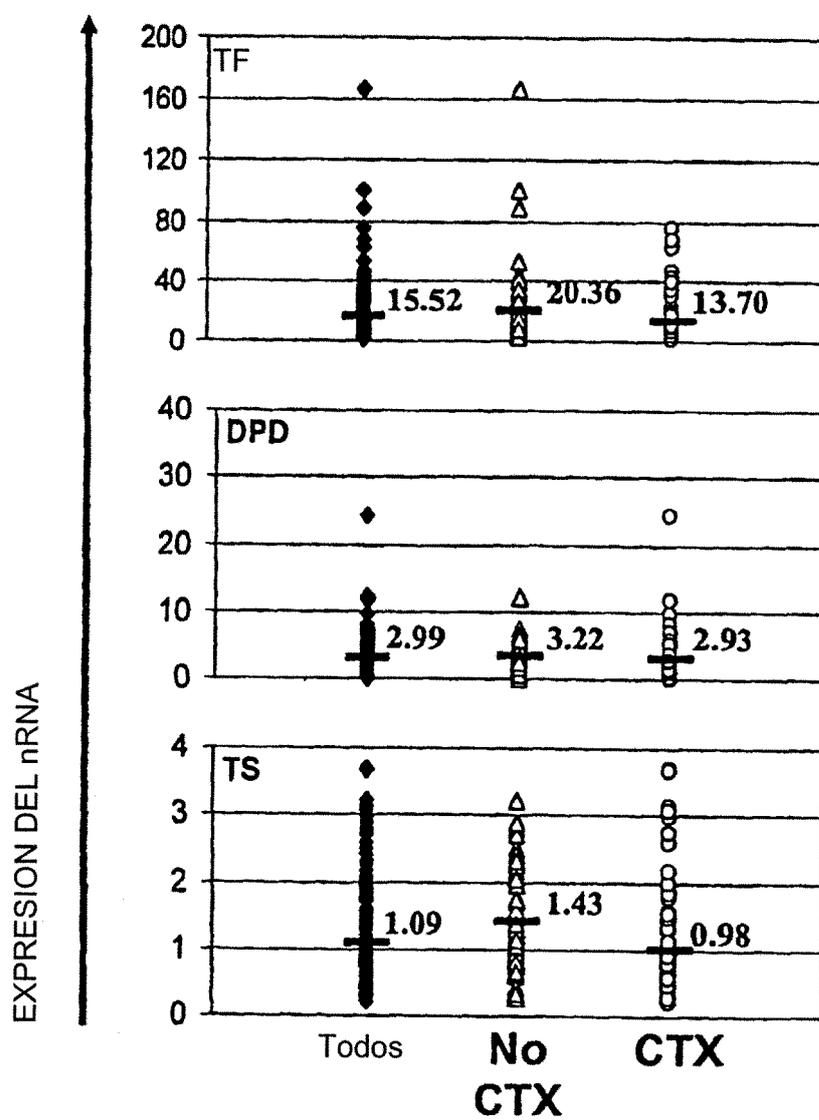


Fig. 3

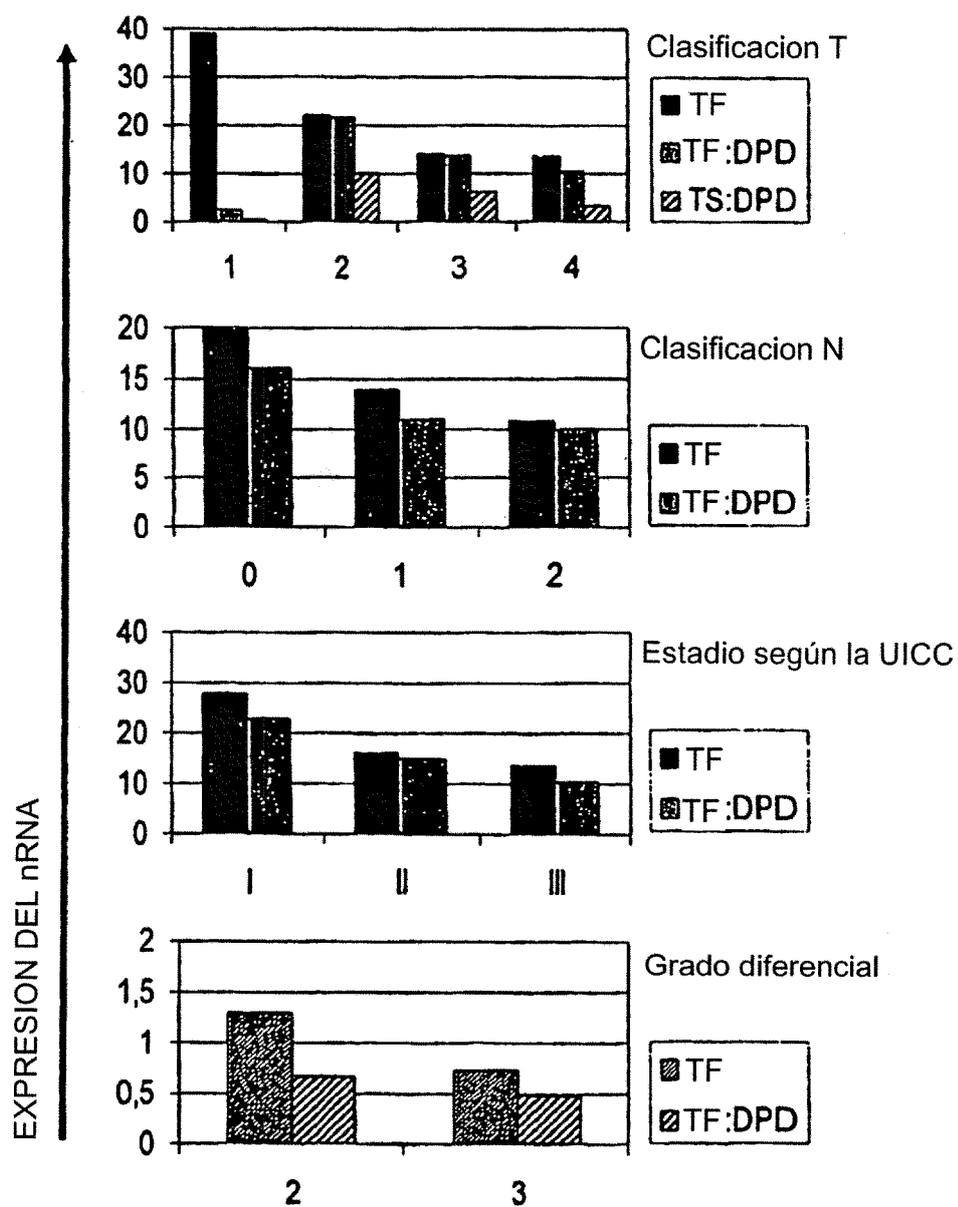


Fig. 4

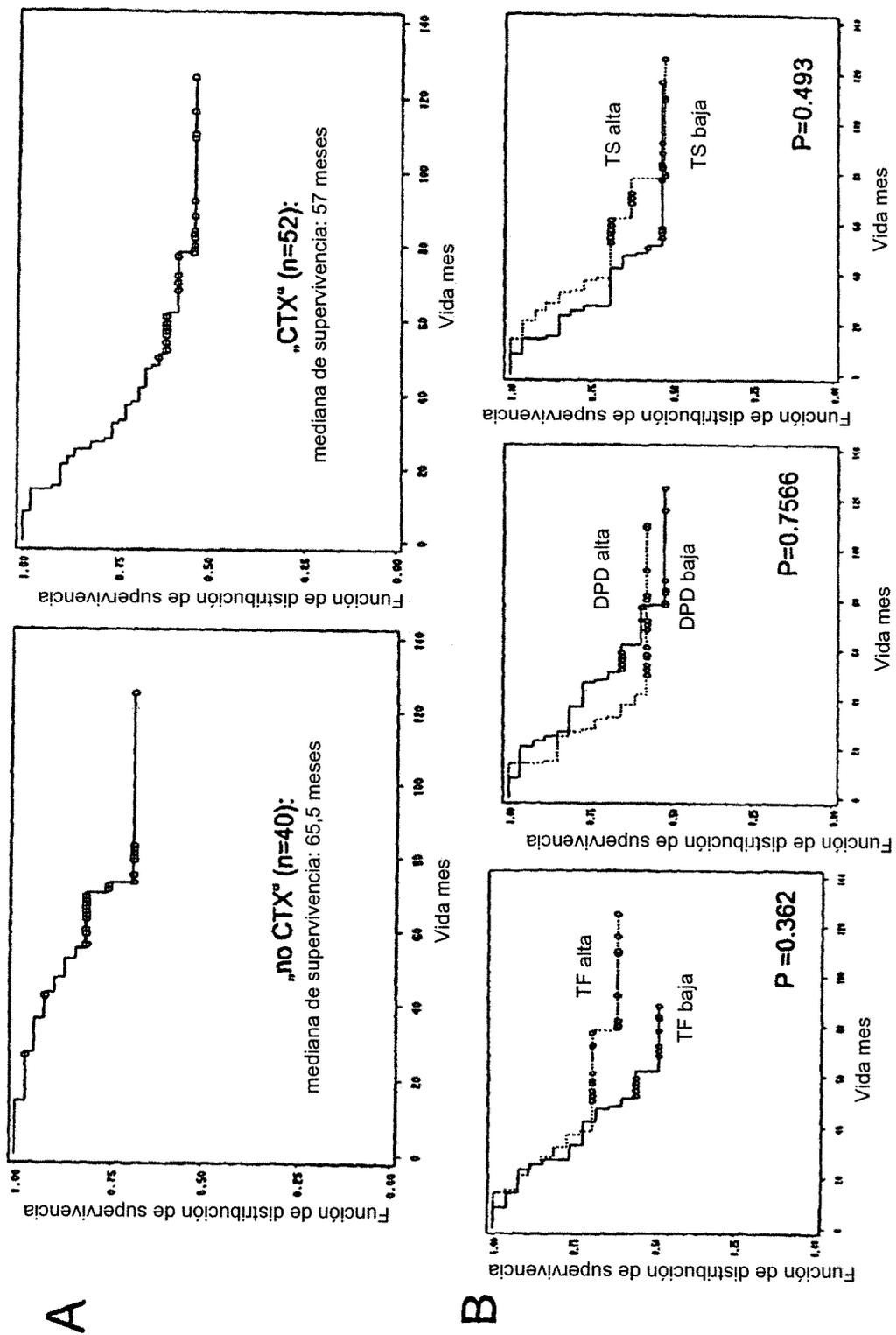


Fig. 4

C

Curvas de Kaplan-Meier de baja PDO y alta PDP frente de la supervivencia libre de recivida

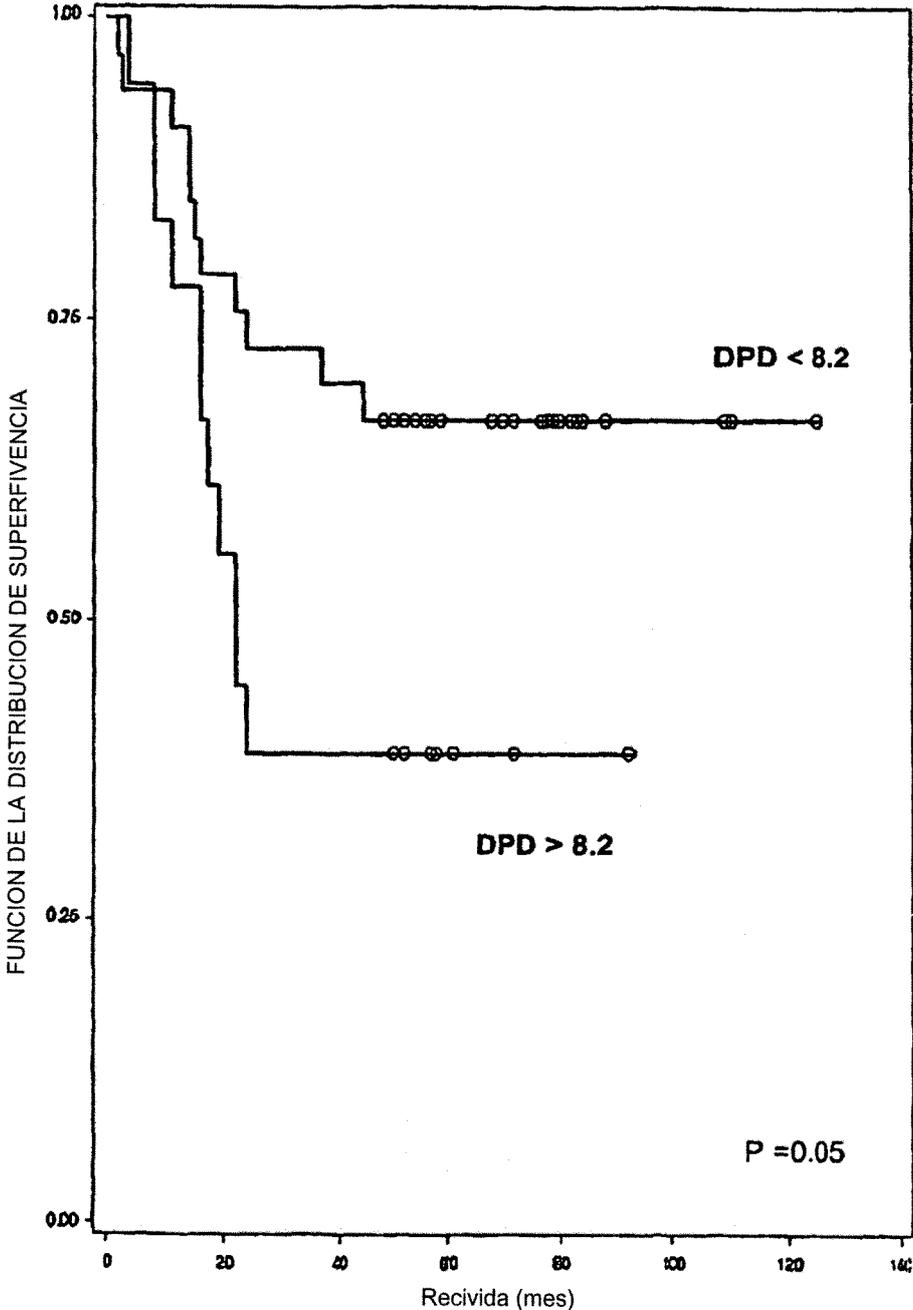


Fig. 5a

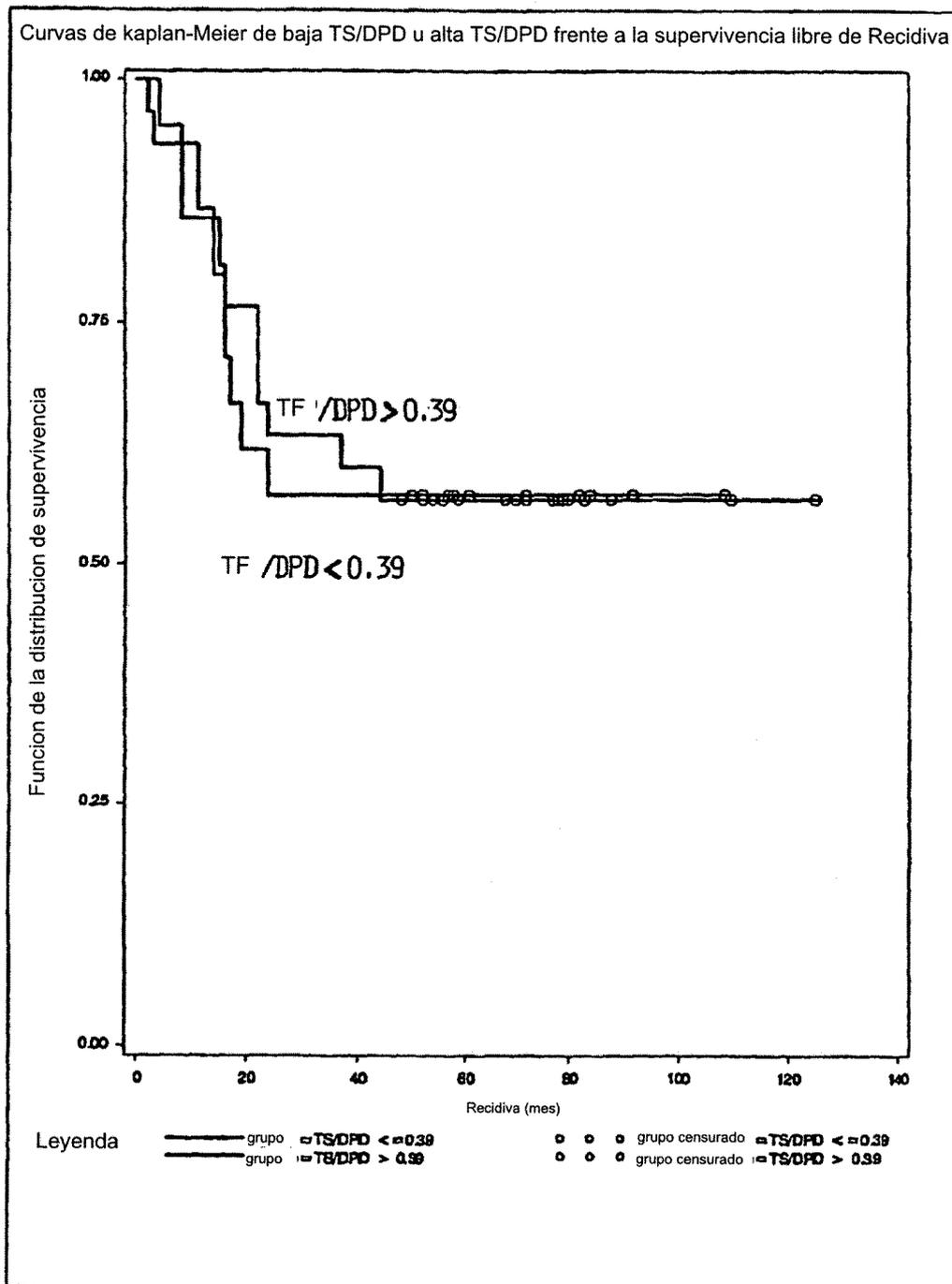


Fig. 5b

Curvas de kaplan-Meier de baja TS/DPD u alta TS/DPD frente a la supervivencia libre de Recidiva

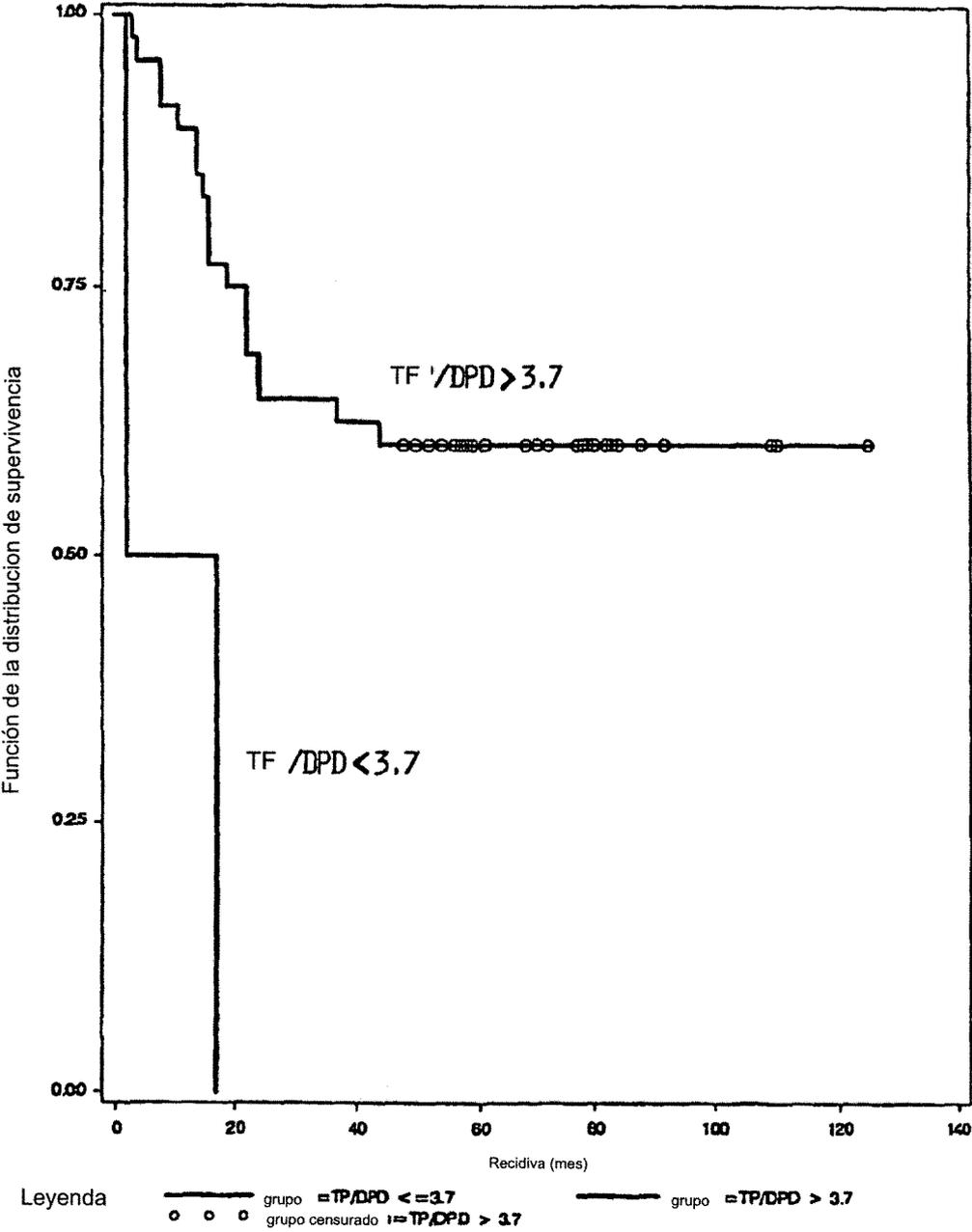


Fig. 5c

Curvas de kaplan-Meier de baja TS/DPD u alta TS/DPD frente a la supervivencia libre de Recidiva

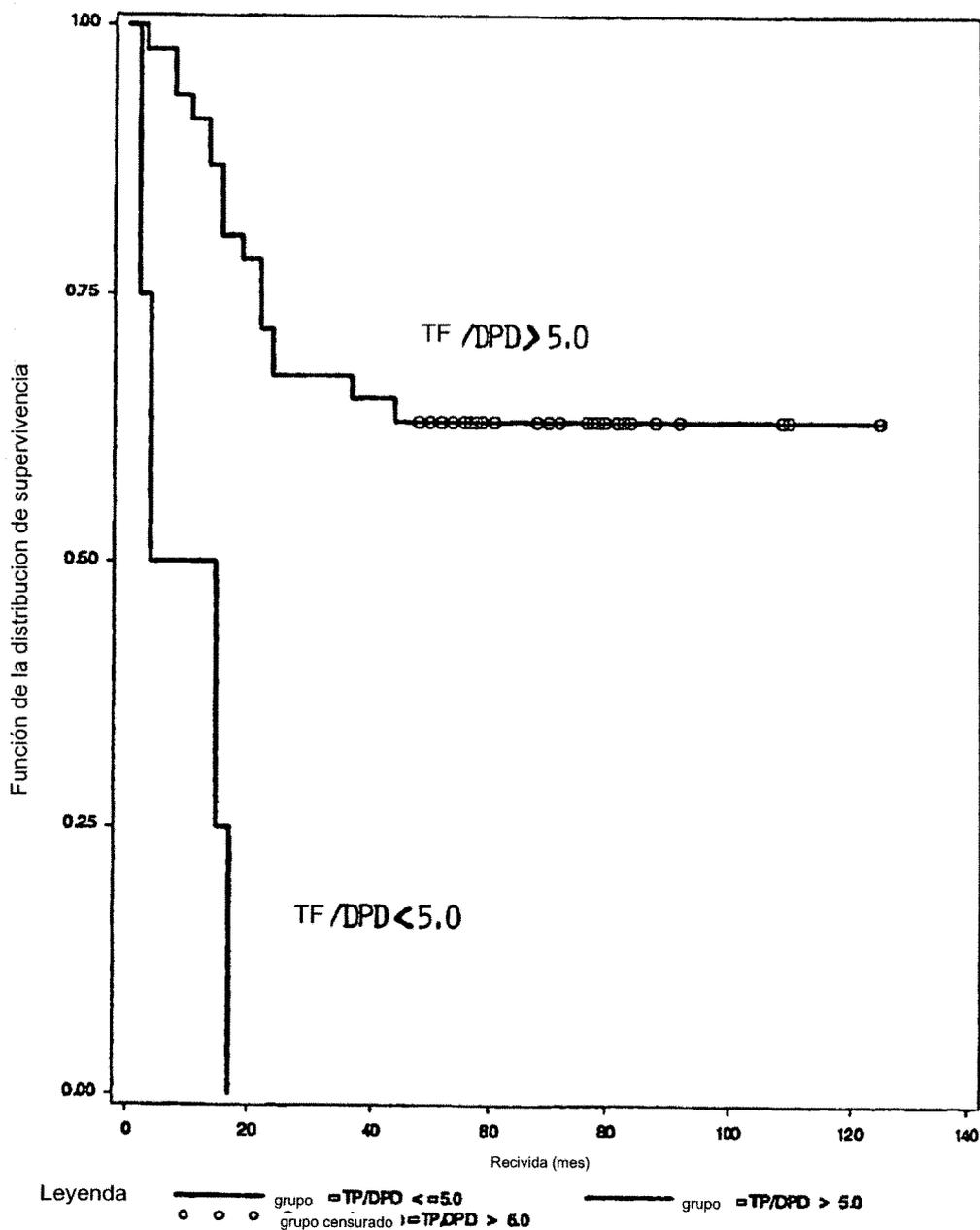


Fig. 5d

Curvas de kaplan-Meier de baja TS/DPD u alta TS/DPD frente a la supervivencia libre de Recidiva

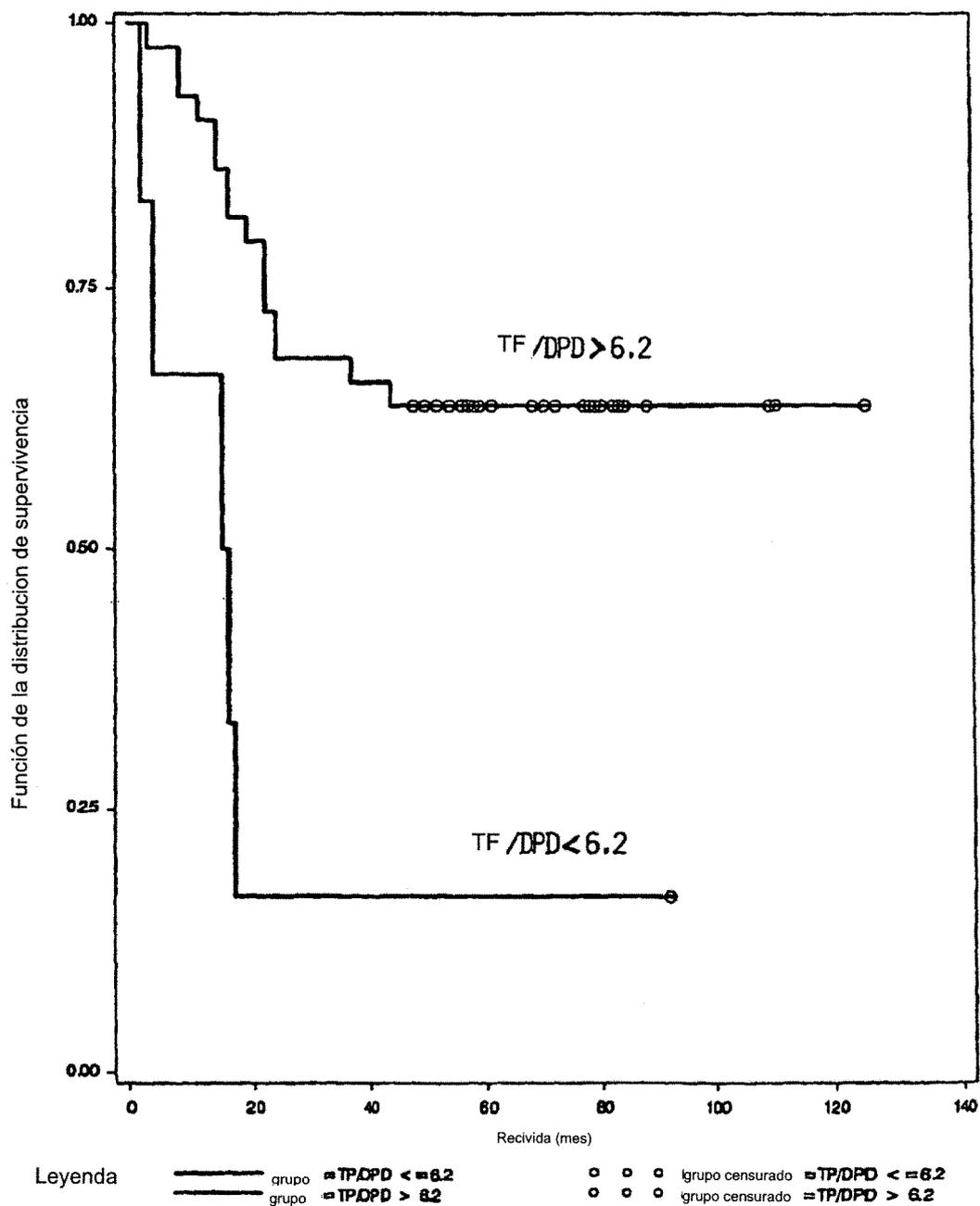


Fig. 5e

Curvas de kaplan-Meier de baja TS/DPD u alta TS/DPD frente a la supervivencia libre de Recidiva

