

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 835**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2015 PCT/GB2015/050597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2015 E 15709982 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3114235**

54 Título: **Procedimiento para determinar el riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo**

30 Prioridad:

04.03.2014 GB 201403820

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

15.03.2021

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**KERR, DAVID;
TOMLINSON, IAN;
ROSMARIN, DAN y
PALLES, CLAIRE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 811 835 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

Procedimiento para determinar el riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un ensayo. Más específicamente, la invención se refiere a un ensayo útil para predecir la toxicidad de un agente quimioterapéutico. Se describen reactivos y kits para realizar el ensayo.
- [0002]** El 5-fluorouracilo (FU) se utiliza con frecuencia como agente quimioterapéutico para el tratamiento de cánceres, tales como cáncer colorrectal (CRC), cáncer de mama y otros tumores sólidos. Los regímenes basados en FU incluyen administración intravenosa en bolo e infusional, y capecitabina oral, un profármaco que experimenta una conversión preferencial en FU en tejido neoplásico. Un tratamiento común para pacientes con CRC es capecitabina ([1-(3,4-dihidroxi-5-metiltetrahidrofuran-2-il)-5-fluoro-2-oxo-1H-pirimidin-4-il]carbamato de pentilo).
- 10 **[0003]** La adición de oxaliplatino o irinotecán a FU puede mejorar la eficacia, y los regímenes de combinación FOLFOX (de Gramont A et al., J Clin Oncol 18(16): 2938-47 (2000)), XELOX (Cassidy J et al., J Clin Oncol 22(11): 2084-91 (2004)) y FOLFIRI (Douillard JY et al., Lancet 355(9209): 1041-7 (2000)) son terapias estándar para el tratamiento del cáncer.
- 15 **[0004]** Por lo tanto, la FU es un elemento fundamental de la quimioterapia. Sin embargo, las toxicidades por FU son comunes, padeciendo un 10-30 % de los pacientes toxicidades sustanciales, definidas como de Grado 3 o superior, según lo medido utilizando los Criterios comunes de toxicidad para eventos adversos (CTCAE (*Common Toxicity Criteria for Adverse Events*)) del NCI versión 3.0):

CTCAE v.3.0	
GRADO	SIGNIFICADO
1	Evento adverso leve
2	Acontecimiento adverso moderado
3	Acontecimiento adverso grave
4	Evento adverso potencialmente mortal o incapacitante
5	Muerte relacionada con un evento adverso

- 25 **[0005]** La capecitabina provoca citotoxicidad al inhibir la producción de timidina y al convertirse en metabolitos que se incorporan en el ADN y el ARN (Noordhuis P et al., Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids 23: 1481-1484 (2004)). Al igual que con otros regímenes de quimioterapia basados en 5-FU, aproximadamente un tercio de los pacientes con capecitabina padecen niveles limitantes de la dosis de eventos adversos inducidos por el fármaco.
- 30 **[0006]** Las toxicidades por FU típicamente incluyen síntomas tales como diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia y síndrome mano-pie (HFS). Las toxicidades más comunes por capecitabina limitantes de la dosis son el HFS y la diarrea. Hay una amplia variación en la frecuencia y el tipo de toxicidad dependiendo del programa de administración, y en general hay una mortalidad del 0,5-1,0 % (Grado 5 según lo medido usando los CTCAE versión 3.0) asociada con el uso de FU (Grem JL., Investigational new drugs 18(4): 299-313 (2000); y Twelves C et al., The New England journal of medicine 352(26): 2696-704 (2005)). El inicio de la toxicidad puede ser rápido, lo que da como resultado una mortalidad del 0,5 % al 2 % de los pacientes en monoterapia y regímenes de combinación de 5-FU en infusión y bolo (Saltz LB et al., J Clin Oncol. 25(23): 3456-3461 (2007)), y aproximadamente la mitad de ese número para los programas de capecitabina. Las diferencias entre pacientes en cuanto a toxicidad pueden explicarse por factores clínicos tales como la edad del paciente, el sexo, la práctica clínica local y la dieta (Stein BN et al., Cancer 75(1): 11-17 (1995); Cassidy J et al., Ann Oncol. 13(4): 566-575 (2002); Haller DG et al., J Clin Oncol. 26(13): 2118-2123 (2008)). Sin embargo, mucha variabilidad en la toxicidad sigue siendo inexplicable.
- 35 **[0007]** En consecuencia, se ha centrado mucha atención en la identificación de biomarcadores o ensayos predictivos de la toxicidad por FU (Boisdron-Celle M et al., Cancer letters 249(2): 271-82 (2007); y Saif MW et al., Journal of the National Cancer Institute 101(22): 1543-52 (2009)). Sin embargo, el metabolismo del FU es complejo, con múltiples reacciones enzimáticas e intermedios, como se muestra en la figura 1.
- 40 **[0008]** La vía bioquímica de activación de capecitabina y la posterior acción y degradación de 5-FU está bien establecida y proporciona 25 genes candidatos en los que la variación podría afectar a la toxicidad por 5-FU (figura 1) (Longley DB et al., Nat Rev Cancer 3(5): 330-338 (2003); Thorn CF et al., Pharmacogenet Genomics 21(4): 237-242 (2011); West CM et al., Nat Rev Cancer 4(6): 457-469 (2004); Miwa M et al., Eur J Cancer 34(8): 1274-1281 (1998)). Tras la absorción en el intestino, la capecitabina se convierte parcialmente en 5-FU en el hígado, después se convierte

preferentemente en 5-FU en el sitio CRC. Gran parte del 5-FU se degrada en el hígado por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) antes de la activación. Como parte de la activación diseñada racionalmente del fármaco, el 5-FU se activa adicionalmente en el tumor para formar compuestos citotóxicos que inhiben la síntesis de ADN al competir con los precursores de nucleótidos por la unión con timidilato sintasa (TYMS). Pueden existir diversas fuentes de toxicidad, incluyendo vías de activación alternativas fuera del tumor que dan como resultado un daño directo del ADN/ARN a través de la incorporación, el transporte no deseado de compuestos activados, la expresión variable de dianas farmacológicas, y los niveles reducidos de degradación del fármaco.

5 **[0009]** En un estudio anterior, la deficiencia grave de dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) se ha relacionado con el uso letal de FU (Van Kuilenburg AB et al., Eur J Cancer 33(13): 2258-64 (1997)). Desde entonces, se ha sugerido que un número creciente de polimorfismos y variantes raras en genes involucrados en el metabolismo de FU influyen en el riesgo de eventos adversos, incluyendo *MTHFR* 677C>T (Afzal S et al., Clin Cancer Res 17(11): 3822-9 (2011)); y los alelos de *TYMS* (Lecomte T et al., Clin Cancer Res 10(17): 5880-8 (2004)). Los alelos de riesgo *TYMS* son comunes en la población del norte de Europa. Sin embargo, a pesar de alguna evidencia de que los alelos de *TYMS* afectan a los niveles de expresión de ARNm (Mandola MV et al., Cancer research 63(11): 2898-904 (2003); y Zhang Q et al., Chinese medical journal 124(2): 262-7 (2011)), los datos existentes son limitados, por ejemplo, por inconsistencia en el informe y prueba de toxicidades; por la agrupación de los pacientes en diferentes programas de FU; y por el análisis combinado de polimorfismos funcionalmente distintos.

10 **[0010]** Saif M. W. (2013) menciona que la DYPD mutada se observa con frecuencia en pacientes caucásicos que experimentan toxicidades mientras reciben 5-FU/capecitabina (Saif M. W., Cancer Genomics and Proteomics 10(2): 89-92 (2013)). Caudle K. E. et al. (2013) mencionan directrices para el genotipado de DYPD y la dosificación de fluoropirimidina (Caudle et al. Clinical pharmacology and therapeutics 94(6):640-5 (2013)). El documento WO 2004/037852 menciona polimorfismos de *TYMS* para su uso en la detección de susceptibilidad al cáncer.

15 **[0011]** Los kits disponibles comercialmente destinados a identificar el riesgo de toxicidades de FU no son óptimos y tienden a identificar polimorfismos comunes, clasificando así a casi todos los sujetos de prueba como en riesgo. Incluso los kits que no incluyen dichos polimorfismos comunes generalmente no proporcionan una sensibilidad superior al 29 %.

20 **[0012]** Por lo tanto, actualmente no existe una forma fiable de predecir eventos adversos, ya que no está claro qué variantes genéticas (si las hay) hacen buenos predictores de la toxicidad por FU.

25 **[0013]** Por consiguiente, existe la necesidad de certeza con respecto a qué variantes genéticas son realmente predictivas de eventos adversos de FU. Existe la necesidad de biomarcadores clínicos y ensayos predictivos de toxicidad por FU.

30 **[0014]** La presente invención aborda una o más de las necesidades anteriores. En particular, los presentes inventores han descubierto una combinación de biomarcadores clínicos y ensayos relacionados que predicen la toxicidad por FU.

35 **[0015]** La invención se define según las reivindicaciones. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección en el sujeto de la presencia del polimorfismo de *TYMS* rs2612091; en el que: i) la presencia de dicho polimorfismo indica un mayor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que no posee dicho polimorfismo; y ii) un resultado negativo indica un menor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que posee dicho polimorfismo.

40 **[0016]** En algunas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia de uno o más polimorfismos de *TYMS* adicionales seleccionados de 5'VNTR 2R/3R rs45445694 y 3'UTR 6pb ins-del rs16430; y un polimorfismo de *DPYD* seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, y p.Ala551Thr.

45 **[0017]** En algunas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia de uno o más polimorfismos de *DPYD* seleccionados del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, y p.Ala551Thr.

50 **[0018]** En algunas realizaciones, el procedimiento comprende detectar la presencia del polimorfismo de *TYMS* rs2612091; y polimorfismos de *DPYD* *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, p.Ala551Thr.

55 **[0019]** En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente con cáncer; opcionalmente, en el que el paciente tiene un cáncer de tumor sólido. En algunas realizaciones, la paciente tiene cáncer colorrectal (CRC) o cáncer de mama.

60 **[0020]** En algunas realizaciones, el sujeto se somete a quimioterapia con FU. En algunas realizaciones, el

sujeto se somete a monoterapia con capecitabina.

[0021] En algunas realizaciones, el análisis se realiza en una muestra de fluido de un paciente. En algunas realizaciones, la muestra de fluido es una muestra de saliva, suero sanguíneo o plasma.

5

[0022] En algunas realizaciones, la detección se realiza en una muestra sólida de un paciente; opcionalmente, en el que la muestra sólida es de una biopsia.

[0023] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la etapa de monitorizar al sujeto para determinar uno o más síntomas de toxicidad por FU en caso de un resultado positivo. En algunas realizaciones, el uno o más síntomas incluyen diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia y/o síndrome mano-pie (HFS). En algunas realizaciones, el uno o más síntomas incluyen diarrea y/o síndrome mano-pie (HFS).

[0024] En algunas realizaciones, la detección se realiza a través de regresión logística; opcionalmente, en el que se asigna una puntuación genética $\sum \beta_i N_i$ a cada individuo, en la que β_i es el coeficiente beta del i -ésimo SNP asociado significativamente con la toxicidad global en un modelo de regresión logística, y N_i es el número de alelos perjudiciales transportados por ese individuo en ese locus.

[0025] En esta invención se describe un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección de la presencia de al menos un polimorfismo seleccionado de:

a. un polimorfismo de TYMS seleccionado del grupo que consiste en: 5'VNTR 2R/3R rs45445694, 3'UTR 6pb ins-del rs16430 y rs2612091; y/o

25 b. un polimorfismo de DPYD seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, p.Ala551Thr. También pueden seleccionarse variantes funcionalmente equivalentes del polimorfismo de DPYD.

[0026] Un resultado positivo (es decir, la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente) indica un mayor riesgo de desarrollar toxicidad por FU. Un resultado negativo (es decir, la ausencia de los polimorfismos seleccionados) puede indicar una disminución del riesgo de desarrollar toxicidad por FU.

30

[0027] En esta invención también se describe un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección de la presencia de al menos un polimorfismo seleccionado de:

35

a. un polimorfismo de TYMS seleccionado del grupo que consiste en: 5'VNTR 2R/3R rs45445694, 3'UTR 6pb ins-del rs16430 y rs2612091; y/o

40 b. un polimorfismo de DPYD seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, p.Ala551Thr, y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos;

en el que la presencia de dicho al menos un polimorfismo indica un mayor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que no posee dicho al menos un polimorfismo.

[0028] En esta invención también se describe un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección de la presencia de al menos un polimorfismo seleccionado de:

45

a. un polimorfismo de TYMS seleccionado del grupo que consiste en: 5'VNTR 2R/3R rs45445694, 3'UTR 6pb ins-del rs16430 y rs2612091; y/o

50 b. un polimorfismo de DPYD seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, p.Ala551Thr, y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos;

en el que un resultado negativo indica un menor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que posee dicho al menos un polimorfismo.

55

[0029] En esta invención también se describe un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección de la presencia de al menos un polimorfismo seleccionado de:

60

a. polimorfismo de TYMS seleccionado del grupo que consiste en: 5'VNTR 2R/3R rs45445694, 3'UTR 6pb ins-del rs16430 y rs2612091; y/o

b. polimorfismo de DPYD seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189, p.Ala551Thr, y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos;

65

en el que la presencia de uno o más de dichos polimorfismos indica un mayor riesgo de desarrollar toxicidad por FU, y un resultado negativo indica un menor riesgo de desarrollar toxicidad por FU.

5 **[0030]** El polimorfismo de TYMS 5'VNTR 2R/3R puede definirse por rs45445694, y el polimorfismo 3'UTR 6pb ins-del por rs16430. El polimorfismo de DPYD *2A se puede definir por rs3918290 y el polimorfismo 2846T>A por rs67376798. El número rs se refiere a la ID de dbSNP.

10 **[0031]** El procedimiento anterior es altamente predictivo de la toxicidad por FU. El procedimiento puede incluir la detección de cualquier combinación de los polimorfismos mencionados anteriormente. Por lo tanto, la detección puede ser para cualquiera de los polimorfismos de TYMS 5' 2R/3R, 3'UTR 6pb ins-del y rs2612091, y cualquiera de los polimorfismos de DPYD *2A, 2846T>A, rs12132152, rs7548189, p.Ala551Thr, y variantes funcionalmente equivalentes de los mismos.

15 **[0032]** El procedimiento de la invención puede comprender la detección de la presencia del polimorfismo de TYMS rs2612091; y polimorfismos de DPYD *2A, 2846T>A, rs12132152, rs7548189, p.Ala551Thr. Sorprendentemente, se ha encontrado que este procedimiento proporciona hasta un 27 % de sensibilidad, un 91 % de especificidad, un 60 % de valor predictivo positivo, y un 71 % de valor predictivo negativo.

20 **[0033]** El procedimiento de la invención puede comprender la detección de la presencia de polimorfismos de TYMS 5'VNTR 2R/3R y 3'UTR 6pb ins-del; y polimorfismos de DPYD *2A y 2846T>A. Sorprendentemente, se ha encontrado que la detección de la presencia de polimorfismos de TYMS 5'VNTR 2R/3R y 3'UTR 6pb ins-del; y polimorfismos de DPYD *2A y 2846T>A proporciona solamente hasta un 58 % de sensibilidad, un 63 % de especificidad, un 47 % de valor predictivo positivo (PPV), y un 72 % de valor predictivo negativo.

25 **[0034]** Por lo tanto, los procedimientos de la invención representan una mejora significativa en los procedimientos basados en el uso de kits disponibles comercialmente.

30 **[0035]** El sujeto puede ser un paciente con cáncer. El paciente puede tener un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer colorrectal (CRC) o cáncer de mama. El sujeto puede estar recibiendo (o haber recibido) quimioterapia con FU. Como alternativa, el procedimiento puede realizarse en un sujeto que está a punto de someterse a quimioterapia con FU.

35 **[0036]** La quimioterapia con FU puede ser una monoterapia con FU, tal como monoterapia con capecitabina. Sin embargo, el término "quimioterapia con FU" incluye cualquier terapia basada en FU, ya sea en solitario o en combinación con uno o más agentes, por ejemplo, FOLFOX, XELOX o FOLFIRI.

[0037] La detección de la presencia de polimorfismos de TYMS y/o DPYD puede realizarse en una muestra del sujeto. Esta muestra puede ser una muestra de fluido, tal como una muestra de saliva, sangre, suero o plasma. Esta muestra puede ser una muestra sólida, tal como una muestra de una biopsia.

40 **[0038]** También se describe la detección de variantes de DPYD con efectos funcionales equivalentes en 2846A, *2A rs12132152, rs7548189 o p.Ala551Thr. Dichas variantes pueden detectar para usar la secuenciación génica disponible o ensayos funcionales directos como se conoce en el campo técnico.

45 **[0039]** El procedimiento de la presente invención permite la monitorización estrecha de un sujeto en el que están presentes uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente y que, por lo tanto, tiene un mayor riesgo de toxicidad. Por consiguiente, el procedimiento de la invención puede incluir una etapa de monitorización del sujeto para determinar síntomas de toxicidad por FU en el caso de un resultado positivo, es decir, cuando se detecta uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente.

50 **[0040]** El riesgo de toxicidad por FU puede ser toxicidad por FU de alto grado, es decir, grado 3+ según los Criterios de toxicidad común para eventos adversos (CTCAE) del NCI versión 3.0. La toxicidad por FU de alto grado puede ser toxicidad global. La toxicidad por FU de alto grado puede incluir diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia y síndrome mano-pie (HFS).

55 **[0041]** Los polimorfismos de TYMS y DPYD pueden identificarse usando una prueba de puntuación, que prueba los efectos independientes de las variantes dentro de una región. Esta prueba puede comprender la realización de una regresión logística con toxicidad para determinar el número de alelos de alto riesgo que porta un individuo y asignar al sujeto una puntuación genética (por ejemplo, de 0 a 4). Lo siguiente es un ejemplo, puntuación genética $\sum \beta_i N_i$, en la que β_i es el coeficiente beta del i -ésimo SNP asociado significativamente con la toxicidad global en un modelo de regresión logística, y N_i es el número de alelos perjudiciales transportados por ese individuo en ese locus.

60 **[0042]** Los polimorfismos de DPYD también pueden identificarse usando una prueba grupal. Esta prueba puede comprender una evaluación grupal combinada de variantes raras en las que, sobre la base de la función enzimática, los portadores de DPYD 2846A o DPYD *2A se clasifican como "variante" y otros como "tipo silvestre".

65

[0043] Esta evaluación puede incluir variantes de DPYD con efectos funcionales equivalentes en 2846A, *2A, rs12132152, rs7548189 y/o p.Ala551Thr.

[0044] La presente descripción también proporciona uno o más reactivos capaces de detectar la presencia de los polimorfismos de TYMS y/o DPYD mencionados anteriormente, por ejemplo, en una muestra obtenida de un paciente, para su uso en el procedimiento de la invención.

[0045] Los reactivos mencionados anteriormente pueden estar presentes en un kit. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un kit que comprende uno o más de los reactivos mencionados anteriormente capaces de detectar la presencia de los polimorfismos de TYMS y/o DPYD mencionados anteriormente.

[0046] La detección de la presencia de al menos un polimorfismo puede comprender procedimientos de secuenciación conocidos en la técnica, tal como PCR.

15 **Lista de Tablas**

[0047]

Tabla 1: Asociaciones entre los polimorfismos de DPYD y TYMS seleccionados y la toxicidad relacionada con capecitabina (modelo alélico, toxicidad de grado 0-2 frente a 3+)

Los resultados de meta-análisis de efecto fijo y análisis logísticos agrupados se muestran para dos variantes de TYMS y dos de DPYD, para pacientes que recibieron capecitabina. En primer lugar, se proporcionan los efectos individuales de cada polimorfismo, en los que la relación de probabilidades (OR) describe la mayor proporción de pacientes que experimentan toxicidad de grado 3+ (global, diarrea o HFS), por alelo de toxicidad mantenido (rango 0-2 alelos por paciente). Para los dos polimorfismos de TYMS, los modelos logísticos muestran que ambos polimorfismos contribuyen al riesgo de un paciente. Este riesgo se evalúa mediante el meta-análisis de la prueba de "puntuación" de TYMS, en la que la OR muestra la mayor proporción de pacientes que experimentan una alta toxicidad por alelo de toxicidad putativo mantenido del polimorfismo 5'VNTR o 3'UTR (rango 0-4 alelos por paciente). Para los polimorfismos funcionales de DPYD, la OR muestra el efecto de tener el alelo raro *2A o 2846. N = número total de pacientes estudiados, TAF = frecuencia del alelo putativo asociado a toxicidad, y S = número de estudios. Los alelos de prueba se muestran en cursiva.

Tabla 2: Características del paciente de QUASAR2

Las características de los pacientes de la población del estudio QUASAR2 se muestran para 1046 individuos en total, asignados al azar para recibir capecitabina en solitario (47 %) o capecitabina y bevacizumab (53 %), incluyendo el número de eventos tóxicos de Grado 3+.

Tabla 3: Frecuencias de toxicidad en QUASAR2

Las frecuencias de toxicidad para el estudio QUASAR2 se muestran de grado 0-4, incluyendo el grado no informado.

Tabla 4: Frecuencias de toxicidad en el estudio SCP

Los pacientes para este conjunto se seleccionaron por toxicidad alta y baja (es decir, pocos de grado 2) y solo se recopilaron datos de toxicidad de diarrea y HFS.

Tabla 5: Resumen de la región de genes candidatos

25 genes candidatos de la vía de capecitabina/5-FU, a partir de los cuales se identificaron variantes que estaban presentes en una o más de las matrices Hap300/370, Hap610 o exomas.

Tabla 6: Asociaciones seleccionadas entre variantes genéticas y toxicidad por capecitabina en QUASAR2

Las asociaciones se muestran para toxicidades globales e individuales seleccionadas medidas como variables binarias o continuas. TAF es la frecuencia del alelo asociado a toxicidad. La primera fila de cada celda de resultados es una OR, la segunda los IC del 95 %, y la tercera el valor p para el modelo por alelo.

Tabla 7: Prueba de haplotipos de TYMS rs2612091, 5' VNTR y 3'UTR para efectos independientes de un polimorfismo

Los análisis de haplotipos se realizaron en PLINK (Purcell S et al., American Journal of Human Genetics 81(3): 559-75 (2007)) utilizando el comando "*--efecto independiente*", en el que, para cada polimorfismo a su vez, los alelos se analizan para determinar una asociación con la toxicidad mientras se mantienen constantes los genotipos de los otros polimorfismos. La prueba produce un valor p para cada prueba y a continuación un valor p general para ese polimorfismo que muestra si ese polimorfismo tiene una asociación constante con la toxicidad independientemente del genotipo del haplotipo de fondo. Los primeros tres paneles muestran los efectos de variar el alelo 5' VNTR, el alelo 3'UTR y el alelo rs2612091, respectivamente. Solo rs2612091 muestra un efecto significativo global. Los dos paneles inferiores muestran análisis de dos polimorfismos en los que rs2612091 varía mientras que los alelos 5'VNTR y 3'UTR se mantienen constantes. Cabe apreciar que algunos haplotipos raros no

se muestran.

Tabla 8: Asociaciones entre variantes seleccionadas y toxicidad en el estudio SCP.

Los datos se muestran como en la Tabla 6.

Tabla 9: Análisis de prueba de conjunto de genes de la vía de capecitabina/5-FU

Las pruebas de conjunto utilizaron SNP dentro de los 25 kb de cada uno de los 25 genes de la vía de capecitabina/5-FU más *ENOSF1*. Antes del análisis, las variantes conocidas de *DPYD* 2846 y *2A y las nuevas de *DPYD* rs12132152, *DPYD* rs7548189 y *TYMS* rs2612091 recientemente identificadas, así como cualquier elemento en el desequilibrio de ligamiento de $r^2 > 0,1$ con estos SNP (incluyendo los polimorfismos de *TYMS* 5'VNTR y 3'UTR), se eliminaron. Las pruebas se realizaron analizando individualmente la asociación de cada SNP bajo un modelo alélico usando regresión logística ajustada por edad, brazo de tratamiento y género, permutando los datos resultantes y volviendo a analizar 10.000 veces, a continuación, comparando la distribución observada de valores p con los de los datos de toxicidad asignados aleatoriamente para cada conjunto (es decir, por gen o en todos los SNP).

Tabla 10: Genotipos de individuos QUASAR2 con toxicidad de grado 4 en variantes de *DPYD* seleccionadas.

Para las toxicidades, D = diarrea, V = vómitos, H = HFS, N = neutropenia, P = trombocitopenia, M = mucositis, S = estomatitis. Las variantes que se muestran son (i) las identificadas por este estudio (rs12132152, rs12022243, rs2612091, *DPYD* A551T), (ii) alelos de *DPYD* (2846 A>T y *2A) que se muestran en asociación con la toxicidad por 5-FU en el meta-análisis de Rosmarin et al. (Rosmarin et al., Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology (2014), en prensa), y (iii) posibles alelos de toxicidad de *DPYD* en Caudle et al. (Caudle et al., Clinical pharmacology and therapeutics 94(6):640-5 (2013)). Los genotipos mostrados son homocigoto de alelo mayor (0), heterocigoto (1) y homocigoto de alelo menor o variante (2). Las celdas en blanco indican que faltan datos. Se muestra el alelo que proporciona una explicación plausible de la toxicidad grave. Cabe apreciar que los alelos de *DPYD* *4 y *5 están en desequilibrio de ligamiento completo ($D' = 1,0$) con 2A o 2846T>A.

Tabla 11: Asociaciones entre las variantes de las regiones codificantes de *DPYD* y la toxicidad por capecitabina en QUASAR2.

Se muestran polimorfismos y variantes raras presentes en las matrices de tagSNP o exomas, junto con estadísticas resumidas de la asociación con la toxicidad en el meta-análisis de los dos brazos de QUASAR2. MAF = frecuencia de alelo menor.

Polimorfismo	Toxicidad	Análisis de QUASAR2					Todos los análisis de capecitabina						
		N	TAF	OR	95 % de IC	valor p	S	N	OR	95 % de IC	valor p		het. p
TYMS 5'VNTR 2R/3R	GLOBAL	918	0,47	1,48	1,22-1,80	0,000079	5	1300	1,36	1,15-1,60	0,00028	0,17	Meta
Alelo de 2 repeticiones	DIARREA	918	0,47	1,29	0,96-1,74	0,093	5	1309	1,12	0,87-1,45	0,38	0,29	
	HFS	916	0,47	1,44	1,15-1,79	0,0013	5	1306	1,33	1,10-1,60	0,0029	0,23	
TYMS 3'UTR 6pb ins-del	GLOBAL	474	0,69	1,67	1,23-2,22	0,00084	4	738	1,35	1,07-1,70	0,012	0,024	Meta
alelo de inserción de 6 pb	DIARREA	474	0,69	1,49	0,94-2,38	0,085	4	745	1,11	0,79-1,58	0,54	0,007	
	HFS	473	0,69	1,47	1,06-2,08	0,021	4	743	1,43	1,09-1,87	0,0091	0,34	
5'VNTR ajustado para 3'UTR	GLOBAL	474	0,47	1,24	0,93-1,67	0,15	2	602	1,27	0,98-1,64	0,068	-	Agrupados

(continuación)

Polimorfismo	Toxicidad	Análisis de QUASAR2					Todos los análisis de capecitabina						
		N	TAF	OR	95 % de IC	valor p	S	N	OR	95 % de IC	valor p	het. p	
	DIARREA	474	0,47	1,08	0,70-1,67	0,72	2	602	1,11	0,76-1,61	0,59	-	Agrupados
	HFS	474	0,47	1,26	0,91-1,75	0,17	2	602	1,20	0,90-1,58	0,21	-	
3'UTR ajustado para 5'VNTR	GLOBAL	474	0,69	1,56	1,11-2,18	0,010	2	602	1,42	1,06-1,89	0,017	-	Agrupados
	DIARREA	474	0,69	1,47	0,88-2,45	0,14	2	602	1,19	0,78-1,81	0,43	-	
	HFS	474	0,69	1,37	0,94-1,98	0,10	2	602	1,40	1,02-1,93	0,038	-	
Puntuación de prueba de TYMS cantidad de alelos de alto riesgo	GLOBAL	474	0,58	1,38	1,16-1,64	0,00031	2	602	1,33	1,15-1,55	0,00018	0,46	Meta
	DIARREA	474	0,58	1,24	0,96-1,61	0,096	2	602	1,14	0,92-1,42	0,24	0,20	
	HFS	474	0,58	1,31	1,08-1,59	0,0063	2	602	1,29	1,09-1,52	0,0030	0,73	
DPYD *2A alelo de exclusión de exón (A)	GLOBAL	905	0,004	2,78	0,62-12,5	0,18	2	1035	3,02	0,78-11,7	0,11	0,83	Meta
	DIARREA	905	0,004	1,41	0,17-11,8	0,75	2	1035	3,14	0,71-13,8	0,13	0,18	
	HFS	903	0,004	2,67	0,59-12,0	0,20	2	1033	1,98	0,52-7,54	0,32	0,46	
DPYD 2846T > A Alelo A	GLOBAL	881	0,006	9,35	2,01-43,4	0,0043							
	DIARREA	881	0,006	3,14	0,82-11,9	0,093							
	HFS	879	0,006	1,31	0,35-4,96	0,69							
modelo alélico combinado de DPYD alelo A 2846A o *2A	GLOBAL	863	0,005	5,51	1,95-15,5	0,0013							
	DIARREA	863	0,005	2,48	0,81-7,60	0,11							
	HFS	861	0,005	1,76	0,66-4,71	0,26							

Los alelos de prueba se muestran en cursiva.

Tabla 1

Tabla 2

	N.º	%
Sitio		
Colon	930	89%
Recto	116	11%
Estadio		
II	365	35%
III	681	65%
Etnia		
Caucásica	1046	100%
Sexo		
Masculino	593	57%
Femenino	453	43%
Edad, años		
Mediana	65	
Mínima	22	
Máxima	85	
Estado de rendimiento de la OMS		
0-1	1046	100%
Tratamiento		
Capecitabina (cap)	496	47%
Cap + bevacizumab	550	53%
Eventos adversos de Grado 3+		
Global	353	34%
Diarrea	109	10%
HFS	247	24%
Mucositis	11	1%
Estomatitis	12	1%
Vómitos	15	1%
Neutropenia	22	2%
Trombocitopenia	4	0%

Tabla 3

Evento adverso	Grado de CTCAE	Pacientes
Global	0	75
	1	241
	2	375
	3	334

(continuación)

Evento adverso	Grado de CTCAE	Pacientes
Global	4	19
	No informado	2
Diarrea	0	370
	1	388
	2	175
	3	99
	4	10
	No informado	4
Mano-pie	0	176
	1	287
	2	331
	3	246
	4	1
	No informado	5
Mucositis	0	734
	1	248
	2	49
	3	11
	4	0
	No informado	4
Estomatitis	0	718
	1	244
	2	67
	3	11
	4	1
	No informado	5
Vómitos	0	817
	1	134
	2	74
	3	12
	4	3
	No informado	6
Neutropenia	0	921
	1	71
	2	28
	3	17
	4	5
	No informado	4
Trombocitopenia	0	961
	1	67
	2	9
	3	0
	4	4
	No informado	5

Tabla 4

Evento adverso	Grado de CTCAE	Grado más alto de CTCAE informado durante el tratamiento
Diarrea	0	143
	1	23
	2	17
	3	32
	4	4
	No informado	14
Mano-pie	0	85
	1	28
	2	30
	3	86
	4	2
	No informado	2

Tabla 5

Símbolo del gen	Nombre del gen	Ubicación - Construcción 37 (las coordenadas no incluyen la región flanqueante de 25 kb)	Número de SNP del panel de prueba
ABCB1	Casete de unión a ATP, subfamilia B	chr7:87132948-87342564	77
ABCC3	Casete de unión a ATP, subfamilia C, miembro 3	chr17:48712218-48769063	64
ABCC4	Casete de unión a ATP, subfamilia C, miembro 4	chr13:95672083-95953687	224
ABCC5	Casete de unión a ATP, subfamilia C, miembro 5	chr3:183637724-183735727	101
ABCG2	Casete de unión a ATP, subfamilia G, miembro 2	chr4:89011416-89152474	57
CDA	citidina desaminasa	chr1:20915444-20945400	26
CES1	isoforma de carboxilesterasa 1 un precursor	chr16:55836764-55867075	24
CES2	isoforma de carboxilesterasa 2 un precursor	chr16:66968347-66978994	59
DPYD	dihidropirimidina deshidrogenasa	chr1:97543300-98386615	239
DPYS	dihidropirimidinasa	chr8:105391652-105479277	69
MTHFR	metilentetrahidrofolato reductasa	chr1: 11845787 -11866115	38
PPAT	fosforribosilo pirofosfato amidotransferasa	chr4:57259529-57301845	29
RRM1	ribonucleósido- difosfato reductasa subunidad 1	chr11:4115924-4160106	29
RRM2	ribonucleósido-difosfato reductasa subunidad 2	chr2:10262735-10270623	19

(continuación)

SLC22A7	familia 22 portadora de soluto isoforma b del miembro 7	chr6:43265998-43273276	26
SLC29A1	nucleósido equilibrador transportador 1	chr6:44187242-44201888	26
TK1	timidina cinasa 1	chr17:76170160-76183285	35
TYMP	timidina fosforilasa	chr22:50964182-50968258	92
TYMS	timidilato sintetasa	chr18:657604-673499	34
UCK1	uridina-citidina cinasa 1 isoforma a	chr9:134399191-134406655	43
UCK2	uridina-citidina cinasa 2 isoforma a	chr1: 165796890-165877339	22
UMPS	uridina monofosfato sintasa	chr3:124449213-124464040	34
UPB1	beta-ureidopropionasa	chr22:24890077-24922553	30
UPP1	uridina fosforilasa 1	chr7:48128355-48148330	16
UPP2	uridina fosforilasa 2	chr2:158851691-158992478	43

Gen	Coordenadas de SNP b37	Toxicidad alelo asociado/ otro alelo	TAF	N genotipados N imputados	Puntuación de información ^a =Hap370 ^b =Hap610 ^c =Omni2.5	Binario global: 010/34 OR (95 % de IC) valor p	Quant. global: 01v2/34 OR (95 % de IC) valor p
DPYD	rs12132152 chr1:97,523,004	A/G	0.031	456 484	0.993 ^a	3.83 (3.26-4.40) 4.31x10 ⁻⁶	1.61 (1.41-1.82) 5.89x10 ⁻⁶
DPYD	rs76387818 chr1:97,539,400	A/G	0.031	0 940	0.993 ^a 0.999 ^b 0.999 ^c	4.05 (3.47-4.62) 2.11x10 ⁻⁶	1.66 (1.45-1.87) 1.93x10 ⁻⁶
DPYD	rs7548189 chr1:97,867,713	A/C	0.196	940 0	NA	1.67 (1.43-1.91) 3.79x10 ⁻⁶	1.33 (1.14-1.31) 6.82x10 ⁻⁶
DPYD	rs12022243 chr1: 97,862,760	T/C	0.196	0 940	0.996 ^a 0.992 ^b 0.998 ^c	1.69 (1.45-1.94) 2.55 x10 ⁻⁶	1.23 (1.14-1.32) 4.45 x10 ⁻⁶
TYMS/ ENOSF1	rs2612091 chr18:683,687	C/T	0.532	940 0	N/A	1.59 (1.39-1.79) 5.28x10 ⁻⁶	1.19 (0.77-0.91) 2.35x10 ⁻⁶
TYMS/ ENOSF1	rs2741171 chr18:700,687	T/C	0.534	0 940	0.960 ^a 0.975 ^b 0.990 ^c	1.6 (1.39-1.80) 6.64x10 ⁻⁶	1.2 (1.13-1.28) 9.24x10 ⁻⁷

Tabla 6

Gen	HFS Cuant: 01v2v34 OR (95 % de IC) valor p	HFS Cuant: 01v2v34 OR (95 % de IC) valor p	Diarrea Binario: 012v34 OR (95 % de IC) valor p	Diarrea: 012v34 OR (95 % de IC) valor p	Otras asociaciones clínicamente viables
DPYD	6.12 (5.48-6.76) 3.29×10^{-8}	1.74 (1.53-1.95) 1.47×10^{-7}	0.44 (0-1.32) 0.065	0.85 (0.68-1.02) 0.068	
DPYD	6.44 (5.79-7.09) 1.75×10^{-8}	1.78 (1.57-1.99) 5.51×10^{-8}	0.44 (0-1.33) 0.071	0.86 (0.68-1.03) 0.083	
DPYD	1.42 (1.15-1.69) 0.011	1.16 (1.07-1.25) 0.0011	1.21 (0.84-1.58) 0.0015	1.18 (1.10-1.25) 1.54×10^{-5}	Diarrea 01v234 1.76 (1.50-2.02) 1.72×10^{-5}
DPYD	1.43 (1.16-1.7) 0.0096	1.16 (1.07-1.25) 8.26×10^{-4}	1.79 (1.54-2.05) 9.86×10^{-6}	1.18 (1.11-1.26) 1.11×10^{-5}	
TYMS/ ENOSF1	1.57 (0.45-0.83) 2.94×10^{-6}	1.21 (0.76-0.90) 3.67×10^{-7}	1.18 (0.55-1.15) 0.29	1.04 (0.90-1.03) 0.27	HFS 01v234 1.57 (0.45-0.83) 2.94×10^{-6}
TYMS/ ENOSF1	1.74 (1.51-1.97) 1.64×10^{-6}	1.23 (1.16-1.31) 3.10×10^{-8}	1.01 (0.70-1.32) 0.92	1.03 (0.97-1.09) 0.37	HFS 01v234 1.61 (1.42-1.80) 1.44×10^{-6}

SNP de prueba	5'VNTR 3'UTR rs2612091	OR para el efecto de cada alelo SNP de prueba en los haplotipos	OR para el efecto combinado de ambos alelos SNP de prueba	valor p
5'VNTR (modelo 3 SNP)	2R/ins/G	1 (ref)		
	3R/ins/G	1,04	1 (ref)	0,65
	2R/del/A	0,89		
	3R/del/A	0,82	0,83	0,34
	2R/ins/A	0,95		
	3R/del/A	0,77	0,80	0,081
	global			0,17
3'UTR (modelo 3 SNP)	2R/ins/G	1 (ref)	1 (ref)	n/a
	3R/ins/G	1,04	1,04	n/a
	2R/del/A	0,89		
	2R/ins/A	0,95	0,92	0,67
	3R/del/A	0,82		
	3R/del/A	0,77	0,80	0,33
	global			0,61

(continuación)

SNP de prueba	5'NTR 5'UTR rs2612091	OR para el efecto de cada alelo SNP de prueba en los haplotipos	OR para el efecto combinado de ambos alelos SNP de prueba	valor p
rs2612091 (modelo 3 SNP)	2R/ins/G	1 (ref)	1 (ref)	0,66
	2R/ins/A	0,95		
	3R/ins/G	1,04		
	3R/ins/A	0,77	0,84	0,00068
	2R/del/A	0,89	0,88	n/a
	3R/del/A	0,82	0,82	n/a
	global			0,0021
rs2612091 (modelo 2 SNP)	2R/G	1 (ref)	1 (ref)	0,18
	2R/A	0,92		
	3R/G	1,04		
	3R/A	0,79	0,84	0,00051
	global			0,00053
rs2612091 (modelo 2 SNP)	ins/G	1 (ref)	1 (ref)	
	ins/A	0,80		n/a
	del/A	0,83	0,90	n/a
	global			1,47E- 06

Tabla 7

Tabla 8

Gen	Coordenadas de SNP b37	Asociación con el fenotipo seleccionado
DPYD	rs12132152 chr1:97523004	0,30 (0,10-0,86) 0,025 HFS 012v34
DPYD	rs7548189 chr1:97867713	1,66 (1,00-2,74) 0,048 HFS 012v34 0,78 (0,39-1,53) 0,46 Diarrea 012v34
TYMSIENOSF1	rs2612091 chr18:683607	1,64 (1,12-2,42) 0,012 HFS 012v34

ES 2 811 835 T3

CONJUNTO	N.º SNP	Global 012v34	Global 01v2v34	HFS 012v34	HFS 01v2v34	Diarrea 012v34	Diarrea 01v2v34
ABCB 1	77	0,29	1	1	1	1	1
ABCC 3	64	1	1	1	1	0,55	0,49
ABCC 4	221	0,86	0,87	1	1	0,91	0,75
ABCC 5	100	0,33	1	1	1	0,13	0,074
ABCG 2	57	0,093	1	0,37	0,60	1	1
CDA	25	1	0,24	0,38	0,20	1	0,40
CES1	24	1	0,10	0,19	0,11	1	0,16
CES2	59	0,18	0,28	0,0092	0,046	1	1
DPYD	189	0,31	0,040	0,52	0,52	0,53	0,20
DPYS	69	1	0,32	1	0,58	1	0,70
ENOS F1	22	0,11	0,27	1	0,25	1	1
MTHF R	37	1	1	1	1	1	0,50
PPAT	29	1	1	1	1	1	0,10
RRM1	29	1	1	0,17	1	1	1
RRM2	19	1	1	1	1	1	1
SLC22 A7	26	1	1	1	1	0,014	0,22
SLC29 A1	26	1	1	1	1	1	1
TK1	35	1	1	1	0,43	1	1
TYMP	92	1	0,24	0,035	0,025	0,055	0,029
TYMS	23	0,12	0,28	1	0,25	1	1
UCK1	43	0,13	0,16	0,25	0,36	0,013	0,0038
UCK2	21	1	1	1	1	0,063	0,31
UMPS	34	0,13	0,085	0,15	0,035	1	0,32
UPB1	30	1	1	1	1	1	1
UPP1	16	1	1	1	1	0,089	1
UPP2	42	1	0,061	0,078	0,25	1	1
Como un conjunto*	1393	0,72	0,36	0,67	0,55	0,10	0,12

Tabla 9

Caso	D	V	H	N	P	M	S	Possible explicación	2846	*2A	A551T	*13	*4	*5	*6	*9A	M166V	K259E	rs12132152	rs12022243	rs2612091	
1	4	0	2	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
2	4	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
3	0	4	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
4	4	2	2	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
5	4	0	0	0	0	0	1	2846T>A	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	2		1	4	4	0	2	2846T>A	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1
7	3	0	2	4	4	3	3	A551T	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
8	3	1	3	4	2	3	3		0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	2
9	4	0	2	0	0	1	0		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
10	4	1	3	0	0	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
11	4	2	1	1	0	0	0		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
12	0	0	3	4	4	3	3	*2A	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
13	4	0	1	0	1	1	1		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
14	0	4	3	0	1	0	0		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	2
15	4	0	1	0	0	1	1		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
16	4	0	2	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
17	1	0	4	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
18	2	4	3	0	0	0	1		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
19	3	0	2	4	4	0	4	*13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 10

ID de variante		Brazo A				Brazo B				Análisis general			
Chr	Posición	z#	ID clásica	Nucleótido	Aminoácido	Casos_AA	Casos_AB	Casos_BB	Controles_AA	Controles_AB	Controles_BB	Meta beta	Meta P
1	197,547,347	267376792	288887	C72248A	P594R	0	0	0	0	0	0	0	0
1	197,779,920	31301160	4	C62194A	P173D	125	11	0	0	0	0	0	0
1	197,779,920	31301160	5	C62194A	P173D	120	12	0	0	0	0	0	0
1	197,813,614	3351220	*2A	C1925+155A	609V	140	0	0	0	0	0	0	0
1	197,881,343	35308662	*13	C71279G	R398G	143	1	0	0	0	0	0	0
1	197,881,398	31301159	*3	C43627G	R543V	0	0	0	0	0	0	0	0
1	197,881,421	31301155	*4	C62802A	L533R	125	7	0	0	0	0	0	0
1	198,039,439	3592047		C11736A	P641E	126	0	0	0	0	0	0	0
1	198,144,726	34339933		C8775G	R339K	0	2	140	0	0	0	0	0
1	198,183,081	32297581		C3489G	P4166V	110	14	0	0	0	0	0	0
1	198,346,065	31301265	*9A	C1037	P139R	0	40	0	0	0	0	0	0

Tabla 11

Lista de figuras

[0048]

5

Figura 1: Vías del metabolismo de FU

La capecitabina es un profármaco oral de 5-FU diseñado racionalmente para que las concentraciones del metabolito citotóxico FdUMP, FdUTP y FUTP sean más altas dentro de las células neoplásicas que dentro de las células normales. La mayor parte de la activación del fármaco se produce a través de la ruta de activación común del profármaco (figura 1a). Además, el 5-FU se puede convertir en el compuesto activo a través de rutas de activación alternativas tanto en las células tumorales de colon como en las células de múltiples tejidos diferentes (figura 1b). La toxicidad puede aparecer si el tejido no diana se expone a capecitabina/5-FU activados (por ejemplo, FdUMP y FUTP), a menudo cuando el 5-FU sale del tejido diana y se activa posteriormente. El 5-FU liberado por las células en circulación puede ser metabolizado rápidamente por el hígado (figura 1c). La ruta primaria se muestra en líneas continuas; las rutas alternativas se muestran en líneas discontinuas.

Figura 2: Diagrama de árbol de polimorfismos de TYMS meta-analizados en pacientes con FOLFOX (modelo alélico, toxicidad global de grado 0-2 frente a 3+)

Se muestran los efectos individuales de dos polimorfismos de *TYMS* sobre la toxicidad global de grado 3+ relacionada con FU del tratamiento con FOLFOX, que no son significativos (*TYMS* 5' 2R $p = 0,26$; alelo de *TYMS* 3' 6pb-ins $p = 0,8$). Cada ensayo está representado por un cuadrado, cuyo centro representa una relación de probabilidades (OR) que muestra la mayor proporción de pacientes que experimentan una alta toxicidad por alelo de prueba mantenido (rango 0-2 por paciente, por polimorfismo), mientras que las líneas horizontales muestran los intervalos de confianza (IC) del 95 %. El tamaño del cuadrado es directamente proporcional a la cantidad de información aportada por el ensayo. Los rombos representan OR generales para los estudios incluidos, representando el centro la OR y los extremos del IC del 95 %. Se utilizó el modelo de efecto fijo. $het. p =$ valor p para la prueba de heterogeneidad, $meta =$ meta-análisis.

Figura 3: Análisis de las características operativas del receptor (ROC) de toxicidad por FU de los polimorfismos de TYMS 5'VNTR 2R/3R, TYMS 3'UTR 6pb ins-del, DPYD 2846T>A y DPYD *2A en pacientes con capecitabina QUASAR2

Se marcan dos puntos de corte de sensibilidad/especificidad: Uno que en la parte inferior izquierda de la gráfica corresponde a la proporción máxima de pacientes correctamente clasificados, con una sensibilidad del 4 %, una especificidad del 100 % y un valor predictivo positivo del 86 %, en gran parte debido a variantes raras de *DPYD*; el otro punto de corte afecta a más pacientes como resultado de incorporar el genotipo *TYMS* y corresponde a una sensibilidad del 58 %, una especificidad del 63 % y un valor predictivo positivo del 47 %.

Figura 4: Gráficas regionales de DPYD y TYMS para asociaciones con toxicidad relacionada con capecitabina

Se muestran asociaciones con fenotipos de toxicidad relacionada con capecitabina de grado global 012v34 y toxicidad de componentes para las regiones que flanquean los SNP de etiqueta superior en (a) *DPYD* y (b) *TYMS/ENOSF1*. El eje x muestra las coordenadas cromosómicas, mientras que el eje y muestra el valor p para la significación de la asociación, en una escala logarítmica. Los círculos representan los SNP incluidos en este panel de prueba de 1.456 SNP, mientras que los cuadrados representan los SNP de cartografía fina imputados. Los círculos de color púrpura representan los SNP de etiqueta de mejor asociación, y la correlación con este SNP se muestra por color como se indica en cada leyenda. Para *TYMS/ENOSF1*, el SNP de HFS 01v2v34 más significativo (también el tercer SNP 012v34 global más significativo) es rs2741171. Gráficas hechas por LocusZoom.

Figura 5: DL entre las variantes seleccionadas cerca de (a) TYMS/ENOSF1 y (b) DPYD (izquierda = D'; derecha = R²).

Se muestran las frecuencias de haplotipo del algoritmo Haploview EM para *TYMS*.

Figura 6: Análisis de las características operativas del receptor (ROC) en QUASAR2 de toxicidad relacionada con capecitabina de grado global 012v34

Análisis de las características operativas del receptor (ROC) de 938 pacientes con capecitabina del ensayo QUASAR2, analizado para determinar la toxicidad global de grado 012v34 relacionada con capecitabina/5-FU. Las variantes incluidas en el modelo son las variantes previamente identificadas *DPYD* 2846T>A (rs67376798) y *DPYD* *2A (rs3918290), y las variantes de toxicidad recientemente identificadas *DPYD* A551T, *DPYD* rs12132152, *DPYD* rs7548189 y *TYMS* rs2612091. El área bajo la curva (AUC) es 0,66 (95 % de IC 0,63-0,70). Las líneas marcan el límite en el que la proporción máxima de pacientes se clasifica correctamente (69 %), en el que la sensibilidad es del 27 % (95 % de IC: 23-33 %), la especificidad es del 91 % (95 % de IC: 88-93 %), el PPV es del 60 % (95 % de IC: 52 %-68 %), y el NPV es del 71 % (95 % de IC: 68 %-74 %).

Ejemplos

65

[0049] La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención y de ningún modo limitantes.

Ejemplo 1

5 **[0050]** Como resumen, se examinaron las asociaciones entre los polimorfismos candidatos y la toxicidad por capecitabina en pacientes del ensayo descrito a continuación ("QUASAR2"). A continuación, se realizó un meta-análisis combinando estos datos con los de estudios publicados previamente, tanto de capecitabina como de otros programas de FU. Finalmente, se identificaron polimorfismos que predicen la toxicidad por FU, y se calculó la
10 sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo de esta prueba.

a. Prueba de variantes candidatas de toxicidad por vía FU en el ensayo QUASAR2

i. Características del paciente y del estudio

15 **[0051]** El estudio QUASAR2 (<http://www.octo-oxford.org.uk/alltrials/infollowup/q2.html>; <http://www.controlled-trials.com/ISRCTN45133151/>) es un ensayo de control aleatorizado de fase III de capecitabina adyuvante (Xeloda) (1250 mg/m² dos veces al día d1-14 cada 3 semanas, un total de 8 ciclos) +/- bevacizumab (7,5 mg/kg cada tres semanas) después de la resección del CRC en estadio II/III. Los pacientes participaron en el estudio entre julio de
20 2005 y diciembre de 2011 en 123 sitios del Reino Unido y 81 fuera del Reino Unido. De 1119 pacientes con sangre recogida a partir de julio de 2010, 1046 fueron seleccionados para el estudio en función de la disponibilidad de datos clínicos y el consentimiento informado.

ii. Evaluación de la toxicidad por FU

25 **[0052]** Los eventos adversos se clasificaron después de cada ciclo de tratamiento utilizando los Criterios de toxicidad comunes para eventos adversos (CTCAE) del NCI versión 3.0. Las toxicidades comunes relacionadas con FU (diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, neutropenia, trombocitopenia y HFS) se analizaron individualmente y también en combinación como toxicidad "global".
30 Los eventos adversos se clasificaron como bajos (CTCAE de grado 0/1/2) y altos (CTCAE de grado 3/4/5 en cualquier ciclo de tratamiento). La hipertensión y la proteinuria estaban claramente relacionadas con el bevacizumab (incidencia ~10 veces mayor) y no se incluyeron en el análisis. La incidencia de toxicidades relacionadas con FU no difirió materialmente entre los dos brazos de estudio y estos se combinaron para su análisis.

iii. Identificación de variantes genéticas para analizar asociaciones con toxicidad por capecitabina

35 **[0053]** Con el fin de identificar los polimorfismos de la vía de FU adecuados para la prueba en QUASAR2, se realizó una revisión sistemática de la bibliografía. Se realizaron 139 búsquedas en PubMed y Google Scholar, primero
40 usando los términos de búsqueda "toxicidad" en combinación con "5-fluorouracilo", "5-FU" o "capecitabina". A continuación, la búsqueda se repitió utilizando términos de búsqueda idénticos combinados con los símbolos de 8 genes identificados en la búsqueda inicial que tenían pruebas previas de una asociación con toxicidad por FU (24 búsquedas separadas).

45 **[0054]** A partir de las publicaciones resultantes, se revisaron tanto las referencias como los artículos citantes, y se buscó cualquier nuevo gen y todos los polimorfismos en combinación con los términos de búsqueda iniciales. Se consideraron los estudios para su inclusión si: (i) usaron uno o más regímenes basados en FU; (ii) analizaron uno o más polimorfismos genéticos y/o una o más variantes raras en relación con la toxicidad por FU; e (iii) informaron de una o más de las 6 toxicidades por FU comunes enumeradas anteriormente. Un total de 49 publicaciones cumplieron
50 estos criterios, que posteriormente se limitaron a aquellas publicaciones con: (i) tamaño de muestra de ≥ 30 pacientes; (ii) participantes caucásicos; y (iii) diseño prospectivo para la recopilación de datos de toxicidad.

[0055] Esto dejó 59 polimorfismos en 7 genes de un total de 28 estudios, como se describe en Boisdron-Celle M et al., Cancer letters 249(2): 271-82 (2007); Schwab M et al., J Clin Oncol 26(13): 2131-8 (2008); Afzal S et al., Clin
55 Cancer Res 17(11): 3822-9 (2011); Lecomte T et al., Clin Cancer Res 10(17): 5880-8 (2004); Cohen V et al., Clin Cancer Res 9(5): 1611-5 (2003); Largillier R et al., Clin Cancer Res 12(18): 5496-502 (2006); Morel A et al., Molecular cancer therapeutics 5(11): 2895-904 (2006); Gross E et al., PloS one 3(12): e4003 (2008); Salgado J et al., Oncology reports 17(2): 325-8 (2007); Capitain O et al., Pharmacogenomics J 8(4): 256-67 (2008); Martinez-Balibrea E et al., Eur J Cancer 44(9): 1229-37 (2008); Ribelles N et al., Current drug metabolism 9(4): 336-43 (2008); Ruzzo A et al.,
60 Pharmacogenomics J 8(4): 278-88 (2008); Sharma R et al., Clin Cancer Res 14(3): 817-25 (2008); Afzal S et al., Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO 20(10): 1660-6 (2009); Braun MS et al., J Clin Oncol 27(33): 5519-28 (2009); Chua W et al., Br J Cancer 101(6): 998-1004 (2009); Derwinger K et al., Clinical colorectal cancer 8(1): 43-8 (2009); Gusella M et al., Br J Cancer 100(10): 1549-57 (2009); Goekurt E et al., J Clin Oncol 27(17): 2863-73 (2009); Boige V et al., J Clin Oncol 28(15): 2556-64 (2010); Etienne-Grimaldi MC et al.,
65 British journal of clinical pharmacology 69(1): 58-66 (2010); Martinez-Balibrea E et al., Br J Cancer 103(4): 581-9

(2010); McLeod HL et al., J Clin Oncol 28(20): 3227-33 (2010); Zarate R et al., Br J Cancer 102(6): 987-94 (2010); Caronia D et al., Clin Cancer Res 17(7): 2006-13 (2011); Martin M et al., Clin Cancer Res 17(7): 2006-13 (2011); Deenen MJ et al., Clin Cancer Res 17(10): 3455-68 (2011); Glimelius B et al., Pharmacogenomics J 11(1): 61-71 (2011)). De estas 59 variantes, 4 fueron descartadas, ya que no podían mapearse sin ambigüedades, y otras 19 eran invariables en todos los estudios previos de toxicidad por FU, dejando 36 polimorfismos que quedaban por estudiar.

i. Genotipado de variantes de toxicidad por FU en pacientes de QUASAR2

[0056] 940 pacientes de QUASAR2 (439 capecitabina en solitario, 501 capecitabina + bevacizumab) de etnia caucásica tenían datos de toxicidad disponibles. Se derivaron los genotipos de los pacientes para los 36 polimorfismos candidatos, y se incluyeron polimorfismos genotipados para al menos 400 pacientes.

[0057] Primero, todos los pacientes habían sido genotipados previamente usando paneles de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del genoma Illumina (Human Hap 370, Human Hap 610 o Human Omni 2.5), y algunos genotipos de polimorfismo se extrajeron de estos datos. Se habían seguido previamente los procedimientos estándar de control de calidad para grandes estudios de asociación (Dunlop MG et al., Nature genetics 44(7): 770-6 (2012)). La estratificación de la población se examinó mediante análisis de componentes principales (PCA), y se eliminaron seis casos que se agruparon con muestras de HapMap de etnia no caucásica conocida. Se excluyeron otras nueve muestras debido a las malas tasas de llamada de genotipado (<95 %).

[0058] En segundo lugar, para las variantes ausentes de algunas o todas las matrices de SNP, se derivaron genotipos imputados. El programa IMPUTE v2 y los participantes de CEU de los 1000 genomas de datos de agosto de 2009 se utilizaron como panel de referencia. Los polimorfismos se incluyeron en función de los criterios estándar (puntuaciones de información >0,90 y datos ausentes <0,10). Se utilizó un panel de individuos con datos de secuenciación del genoma completo para verificar la precisión de la imputación. Se cortaron dos variantes debido al muy fuerte desequilibrio de ligamiento (DL; $r^2 > 0,9$) con otras variantes incluidas.

[0059] En tercer lugar, se tipificaron *DPYD* *2A, *DPYD* 2846T>A y *CES2* 823 usando el procedimiento KASPar de genotipado de SNP competitivo específico de alelos (Cuppen E et al., CSH protocols 2007 pdb prot4841 (2007)). Se genotiparon *TYMS* 5'VNTR 2R/3R (Horie N et al., Cell structure and function 20(3): 191-7 (1995)) y *TYMS* 3'UTR 6pb ins-del (Dotor E et al., J Clin Oncol 24(10): 1603-11 (2006)) utilizando procedimientos conocidos basados en PCR.

[0060] De las 21 variantes incluidas, 17 se genotiparon en más de 800 pacientes de QUASAR2 y el resto se tipificaron en más de 400 pacientes. Para análisis SNP individuales en QUASAR2, se usaron todos los genotipos disponibles en el análisis. Para los análisis multivariados, solo se analizó el subconjunto de muestras genotipadas para todas las variantes bajo investigación.

[0061] Se encontró que el 34 % de los pacientes de QUASAR2 desarrollaron toxicidad global de grado 3+ (Tabla 2).

[0062] La toxicidad específica de grado 3+ más frecuente fue HFS (n = 247), seguida de diarrea (n = 109) y neutropenia (n = 22). De los 21 polimorfismos de toxicidad por FU genotipados y/o imputados, tres mostraron asociaciones significativas con la toxicidad global G3+ a $q < 0,05$: *TYMS* 5'VNTR 2R (OR = 1,48, 95 % de IC 1,22-1,80, $p = 0,000079$); *TYMS* 3'UTR 6pb ins (OR = 1,67, 95 % de IC 1,23-2,22, $p = 0,00084$); y *DPYD* 2846A (OR = 9,35, 95 % de IC 2,01-43,4, $p = 0,0043$) (Tabla 1).

[0063] En particular, no se encontró ningún efecto formalmente significativo de 18 variantes de FU previamente informadas sobre toxicidades globales o específicas.

[0064] Los polimorfismos de *TYMS* 5'VNTR y 3'UTR tienen un desequilibrio de ligamiento (DL) moderado ($r^2 = 0,17$, $D' = 0,64$), y ninguno permaneció significativamente asociado con la toxicidad cuando se ajustó por el otro mediante análisis de regresión logística (Tabla 1). Por lo tanto, estas variantes no son marcadores independientes.

[0065] En ausencia de una base genética bien definida para la señal de asociación de *TYMS*, con el fin de capturar la señal combinada de los polimorfismos 5'VNTR y 3'UTR, se analizó una puntuación de riesgo de *TYMS* cuantitativa (recuento 0-4 según el número de alelos de alto riesgo por paciente). La prueba de puntuación predijo la toxicidad global por FU (OR_{por recuento} = 1,38, 95 % de IC 1,16-1,64, $p = 0,00031$, regresión logística, Tabla 1; OR_{puntuación3,4puntuación0} = 3,70, 95 % de IC 1,35-10,1, $p = 0,0011$). Basándose en las estadísticas pseudo-R² de regresión logística, la prueba de puntuación explicó una mayor proporción de variación que cualquiera de las variantes individuales de *TYMS*.

[0066] También se analizaron las toxicidades individuales subyacentes a las asociaciones significativas. Los polimorfismos de *TYMS* (prueba de puntuación) parecieron tener efectos similares en HFS (OR = 1,31, $p = 0,0063$) y diarrea (OR = 1,24, $p = 0,096$), pero el primero fue más común y, por lo tanto, contribuyó más a la medida global y tuvo mayor poder estadístico en su análisis (Tabla 1). En contraste, los efectos de *DPYD* 2846A parecían más

marcados para la diarrea (OR = 3,14, p = 0,093) que para HFS (OR = 1,31, p = 0,69) (Tabla 1).

a. Análisis estadístico

5 **[0067]** Para cada polimorfismo, se realizó una prueba alélica de asociación con toxicidad global G3+ junto con un análisis de regresión logística ajustado por género, edad y brazo, pero la inclusión de estas variables hizo una diferencia mínima en los resultados y, por lo tanto, estos datos no se incluyen.

[0068] Para genes con evidencia consistente de una asociación de toxicidad, se realizaron investigaciones
10 adicionales. El haplotipo de repetición de *TYMS* 5'VNTR se analizó mediante un modelo binario basado en el número total de sitios de unión de USF1/USF2 en ambos alelos (0-2 frente a 3-4) (Mandola MV et al., Cancer research 63(11): 2898-904 (2003)), mientras que los polimorfismos de *TYMS* 5'VNTR y 3'UTR, que están en desequilibrio de ligamiento moderado, se analizaron en combinación mediante regresión logística condicionada al estudio, análisis de haplotipos y una "prueba de puntuación" en la que se realizó la regresión logística con toxicidad para el número de alelos de
15 riesgo de *TYMS* sumados a partir de los polimorfismos 3'UTR y 5'VNTR (0-4 alelos).

[0069] Para *DPYD*, se realizó una evaluación combinada de variantes raras con efectos sobre la función enzimática (*DPYD* *2A y 2846T>A) como grupo.

20 **[0070]** Las curvas de características de receptor-operador (ROC) se generaron mediante clasificación binaria de pacientes con toxicidad global G1/2 o G3/4/5 y se les dio un valor basado en $\sum \beta_i M_i$, donde β_i es el coeficiente beta del *i*-ésimo SNP significativamente asociado con la toxicidad global en un modelo de regresión logística, y N_i es el número de alelos perjudiciales en ese locus. Las variantes para la inclusión se determinaron a partir de los resultados del meta-análisis. Se calculó el área bajo la curva (AUC) y se evaluó el rendimiento en puntos de corte adecuados en
25 función de la relación de probabilidad logarítmica. La regresión logística se realizó en PLINK. La construcción del haplotipo se realizó en Haploview.

c. Efecto de las variantes de toxicidad por FU sobre la toxicidad de la monoterapia con capecitabina

30 **[0071]** Se analizaron quince variantes de toxicidad por FU para determinar las asociaciones con la toxicidad global por capecitabina. Los estudios adicionales a QUASAR2 comprendieron una minoría de los datos, contribuyendo colectivamente hasta 382 pacientes.

[0072] Se encontró una asociación entre la toxicidad global y el alelo de *TYMS* 5'VNTR 2R (incluyendo
35 QUASAR2: OR = 1,36, 95 % de IC 1,15-1,60, p = 0,00028; excluyendo QUASAR2: OR = 1,09, 95 % de IC 0,80-1,48 , p = 0,27), pero la variante no fue significativa en solitario cuando se ajustó para 3'UTR 6pb ins-del (Tabla 1).

[0073] El meta-análisis proporcionó poco apoyo para la asociación de *TYMS* 3'UTR 6pb ins-del (incluyendo
40 QUASAR2: OR = 1,35, 95 % de IC 1,07-1,71, p = 0,012; excluyendo QUASAR2: OR = 0,94, 95 % de IC 0,64-1,38, p = 0,74), pero hubo evidencia de heterogeneidad entre estudios en los datos (het. p = 0,025, I² = 68,0 %), originados de un estudio relativamente pequeño de 80 pacientes. El meta-análisis de la prueba de puntuación de *TYMS*, que utilizó datos de los dos estudios más grandes, continuó mostrando una asociación altamente significativa (incluyendo QUASAR2: OR = 1,33, 95 % de IC 1,15-1,55, p = 0,00018; excluyendo QUASAR2: OR = 1,21, 95 % de IC 0,89-1,63,
45 p = 0,22).

[0074] La asociación entre la toxicidad y *DPYD* 2846T>A también es significativa, pero esta variante solo se probó en QUASAR2 (véase anteriormente).

i. Visión general de los datos

50 **[0075]** Se han encontrado cuatro variantes específicas de la línea germinal de *TYMS* y *DPYD* que predicen la toxicidad por capecitabina; *TYMS* 5'VNTR 2R/3R, *TYMS* 3'UTR 6pb ins-del, *DPYD* 2846T>A y *DPYD* *2A. El análisis sugiere que los polimorfismos también pueden ser útiles para predecir la toxicidad en otros regímenes de monoterapia con FU, pero estos regímenes se usan con poca frecuencia.

55 **[0076]** No está claro si los polimorfismos de *DPYD* *2A y *DPYD* 2846T>A analizados también están asociados con una toxicidad global o específica cualquiera en los regímenes de terapia de combinación (FOLFOX, CAPOX, FOLFIRI, IFL, FLIRI). La figura 2 muestra los resultados del meta-análisis de los dos principales polimorfismos de *TYMS* en estudios que utilizan FOLFOX, el mayor conjunto de datos de terapia de combinación.

60 **[0077]** A pesar de algunas sugerencias anteriores de lo contrario en la bibliografía citada, la evidencia de cualquier asociación con la toxicidad no era convincente para los polimorfismos restantes. Algunos de estos (*DPYD* 1627A>G, *DPYD* 85T>C, *DPYD* 496A>G, *TYMS* 5'VNTR G>C, *MTHFR* 677C>T, *MTHFR* 1298A>C, *CDA* -451 C>T, *CES2* 823C>G, y los polimorfismos de *TYMP*) son comunes (MAF >8 %) y todos los efectos, excepto los modestos,
65 pudieron excluirse con confianza cuando los tamaños de muestra fueron relativamente grandes. La potencia para

detectar una asociación para estos SNP fue aproximadamente del 75 al 100 %, suponiendo una relación de probabilidad de 1,5 por alelo. Para otros polimorfismos (por ejemplo, *DPYD* 1601G> A, *DPYD* 1236G> A, *DPYD* 2194G> A, CDA 943insC y la mayoría de los polimorfismos de *CES2*), las frecuencias de alelos menores fueron bajas, o los tamaños de muestra pequeños, lo que condujo a una potencia subóptima (aproximadamente el 20 - 40 %) para detectar una asociación. El caso para estos como marcadores de toxicidad sigue sin demostrarse.

d. Análisis combinado de alelos raros de *DPYD* con evidencia de efectos sobre la función enzimática

[0078] Para los alelos dentro de un solo gen que tienen efectos funcionales equivalentes causalmente relacionados con la toxicidad, es justificable combinarlos en una clase funcional para pruebas predictivas. Para *DPYD*, se han propuesto algunas variantes raras para causar el Síndrome de deficiencia de *DPYD* (OMIM N.º 274270) (van Kuilenburg AB et al., *The Biochemical journal* 364(Pt 1): 157-63 (2002); Van Kuilenburg AB et al., *Human genetics* 104(1): 1-9 (1999)). De estas, algunas han demostrado reducir la actividad de *DPYD in vitro* (Offer SM et al., *Cancer research* (2013)), mientras que otras tienen menos evidencia funcional a partir de los informes *in vivo* (Seck K et al., *Clin Cancer Res* 11(16): 5886-92 (2005); van Kuilenburg AB et al., *Clin Cancer Res* 6(12): 4705-12 (2000)). Entre las variantes encontradas en los conjuntos de pacientes, se encontró buena evidencia publicada de la funcionalidad para *DPYD* 2846A y *2A (van Kuilenburg AB et al., *The Biochemical journal* 364(Pt 1): 157-63 (2002); Van Kuilenburg AB et al., *Human genetics* 104(1): 1-9 (1999)), pero no para *9A (85T>C) o Ile370Val (1108A>G), a pesar de que previamente se ha informado que causan deficiencia de *DPYD*.

[0079] Por lo tanto, se realizó un análisis de alelos raros de *DPYD* 2846T>A y *2A como un grupo (variante frente a no variante) en una "prueba grupal". Se encontró una asociación formalmente significativa con la toxicidad global para capecitabina (lo que indica que el riesgo asociado combinado es relativamente alto) (OR = 5,51, 95 % de IC 1,95-15,51, p = 0,0013; datos de QUASAR2 en solitario, Tabla 1), y asociaciones nominalmente significativas en los análisis para monoterapias de infusión (p = 0,042) y bolo (p = 0,0068). Todas estas asociaciones fueron más fuertes que cuando cualquiera de las variantes se consideró en solitario.

e. Rendimiento de los paneles de polimorfismos para predecir la toxicidad por FU

[0080] Actualmente hay tres kits disponibles comercialmente para predecir la toxicidad por FU. Estos kits contienen un total de 17 polimorfismos que se dividen en 3 categorías: (i) evidencia de predicción de toxicidad en el presente análisis (n = 4); (ii) presente en el presente análisis, pero sin buena evidencia de capacidad predictiva (n = 5); o (iii) ausente del presente análisis (n = 8). De las variantes en la categoría (iii), 5 son variantes raras de *DPYD* con evidencia de efectos perjudiciales sobre la función enzimática (1679(*13), 1897(*3), 295-298 del (*7), 703(*8) y 2983(*10)) (van Kuilenburg AB et al., *The Biochemical journal* 364(Pt 1): 157-63 (2002); Van Kuilenburg AB et al., *Human genetics* 104(1): 1-9 (1999)).

[0081] En los pacientes con capecitabina de QUASAR2, cada kit determinó la sensibilidad y la especificidad de la predicción de toxicidad global, siguiendo las instrucciones con la mayor precisión posible y usando una clasificación binaria de toxicidad (sin riesgo/bajo riesgo frente a riesgo moderado/intermedio/alto). Debido a la inclusión de polimorfismos comunes, dos kits clasificaron a casi todos los pacientes con un alto riesgo de toxicidad, superando en gran medida los falsos positivos a los positivos reales. El kit restante proporcionó una sensibilidad de no más del 29 %.

[0082] Se evaluó si el rendimiento de los kits podría mejorarse usando la prueba de alelos funcionales raros combinados de *DPYD* desarrollada y la prueba de puntuación de *TYMS* (como se describe en el Ejemplo 1(b)). Se utilizaron estimaciones independientes del tamaño del efecto (utilizando datos brutos de Caronia D et al., *Clin Cancer Res* 17(7): 2006-13 (2011)) y se aplicaron a QUASAR2 en un modelo de regresión logística. El AUC fue de 0,62 (95 % de IC: 0,57-0,67).

[0083] En un corte $\ln(p/1-p)$ de 0,698, en el que la proporción máxima de casos (64 %) se clasificó correctamente, la sensibilidad fue del 3,8 %, la especificidad del 99,6 %, el PPV del 86 % (95 % de IC al 42-99 %), y el NPV del 64 % (95 % de IC al 59-69 %), que en su mayoría reflejan variantes de *DPYD* poco frecuentes. En un corte $\ln(p/1-p)$ de 0,248, la sensibilidad fue del 58 % y la especificidad del 63 %, con un 61 % de pacientes correctamente clasificados (figura 3); el PPV fue del 47 % (95 % de IC al 40-55 %) y el NPV del 72 % (95 % de IC al 66 %-77 %).

[0084] Por consiguiente, la detección de la presencia de las dos variantes de *TYMS* y las variantes funcionales de *DPYD* es predictiva de la toxicidad por FU. Sin embargo, sigue siendo necesario identificar y caracterizar variantes adicionales de toxicidad por FU para proporcionar pruebas mejoradas con mayor poder predictivo para su uso en la práctica clínica. Dichas pruebas genéticas mejoradas proporcionarán la capacidad de monitorizar de cerca a los pacientes con mayor riesgo de toxicidad o de aumentar la dosis de FU en aquellos con bajo riesgo de toxicidad.

Ejemplo 2:

[0085] El análisis adicional de pacientes del ensayo QUASAR2 ha conducido a la identificación de variantes genéticas raras en 25 genes de la ruta de capecitabina/5-FU y la secuenciación posterior de exones de *DPYD* y *TYMS*.

Además, se ha calculado la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo de esta prueba.

a. Evaluación de la toxicidad por FU en el ensayo QUASAR2

5 i. Características del paciente y del estudio

[0086] El estudio QUASAR2 se usó como se ha descrito en el Ejemplo 1(a)(i). De 1.119 pacientes con sangre recogida a partir de julio de 2010, 1.046 fueron seleccionados para un estudio genético basado en la integridad de los datos clínicos y el consentimiento informado. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 2.

10

ii. Evaluación de la toxicidad por FU

[0087] Los datos del fenotipo de toxicidad se recopilaron como parte de QUASAR2 según los Criterios de toxicidad comunes para eventos adversos (CTCAE) del NCI versión 3.0. Se obtuvo la toxicidad máxima (0-4) en cualquier ciclo de tratamiento para cada una de las siguientes toxicidades individuales relacionadas con FU: diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, neutropenia, trombocitopenia y HFS. Se derivó una medida global de la toxicidad, definida como la puntuación máxima de toxicidad individual medida para cada paciente. Las toxicidades globales e individuales se analizaron utilizando dos enfoques: (i) una clasificación binaria en toxicidad baja (grado 0-2) frente a toxicidad alta (limitante de la dosis) (grado 3-4); y (ii) una medida cuantitativa de toxicidad. En este último caso, si <100 pacientes experimentaron un grado particular de toxicidad, estos pacientes se combinaron en un solo sitio con un grado adyacente. Específicamente, se analizaron los grados 01v2v34 para global, diarrea y HFS y 0v1234 para los demás fenotipos de toxicidad más raros. Los datos de toxicidad por grado se muestran en la Tabla 3. Se observó una toxicidad global de grado 3+ en el 34 % de estos pacientes, con diarrea grave en el 10 % y HFS en el 24 %. La toxicidad grave fue menos común para los demás fenotipos, aunque cinco pacientes experimentaron neutropenia de grado 4.

25

b. Identificación de variantes genéticas para analizar asociaciones con toxicidad por capecitabina

a. Conjuntos de pacientes de validación

30

[0088] Se usaron dos conjuntos de datos adicionales para las asociaciones de validación y toxicidad. El estudio español de farmacogenética de capecitabina (SCP) consistió en 233 pacientes con cáncer colorrectal y de mama incorporados prospectivamente a través de varias unidades de oncología en España y tratados con uno de dos regímenes de monoterapia con capecitabina (estándar: 1250 mg/m² dos veces al día d1-14 cada 3 semanas; continuo: 800 mg/m² por vía oral cada 12 horas diariamente). Los datos de HFS y diarrea de la Tabla 4 se recopilaron según los CTCAEv3.0.

35

[0089] El estudio EPICOLON se ha descrito previamente (Abuli A, et al. Carcinogenesis (Epub antes de la impresión) (2013)). Los 85 casos de EPICOLON incluidos en este análisis fueron aquellos que recibieron monoterapia con capecitabina. Solo estaban disponibles los datos de toxicidad de diarrea de estos casos.

40

b. Datos de genotipo

[0090] Para QUASAR2, los datos de genotipo de las muestras de ADN constitucional de los pacientes estaban disponibles a partir de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y variantes genéticas codificantes raras que habían sido analizadas utilizando procedimientos estándar y sometidas a procedimientos de control de calidad estándar para eliminar muestras de bajo rendimiento y polimorfismos (Dunlop MG et al., Nat Genet. 44(7): 770-776 (2012)). Solo se incluyeron en el estudio individuos agrupados con el panel CEPH CEU sobre análisis de componentes principales. Para las matrices de SNP, en función de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con marcaje de haplotipo, los datos estaban disponibles para 940 pacientes (484 de Illumina Hap300 o Hap370CNV, 364 de Hap610 y 92 de Omni2.5). Para las matrices de exomas, diseñadas para capturar la variación de codificación de proteínas poco común, los datos estaban disponibles para 968 pacientes genotipados en la matriz Illumina HumanExome12v1_A o -12v1-1_A. La llamada de base para todas las plataformas se realizó utilizando Illumina Genome Studio y, para matrices de exomas, adicionalmente por Z-Caller (Goldstein JI et al., Bioinformatics 28(19): 2543-2545 (2012)), aplicando una puntuación z de 7 en función de la concordancia de llamadas con Illumina Genome Studio para variantes comunes (99,3 %). Algunos polimorfismos estaban presentes tanto en la matriz de SNP como en la matriz de exomas, y la concordancia de genotipo para estas variantes fue del 99 %.

55

[0091] A partir de los 25 genes candidatos de la vía de capecitabina/5-FU de la Tabla 5, se identificaron variantes que estaban presentes en una o más de las matrices de Hap300/370, Hap610 o exomas y que se encontraban dentro de los 25 kb de la región codificante. Se utilizó la imputación para obtener los genotipos faltantes que surgen de las diferencias en el contenido de la matriz: los haplotipos se escalonaron usando SHAPEITv2 (Delaneau O et al., Nat Methods 10(1): 5-6 (2013)) y la imputación se realizó usando IMPUTEv2 (Howie B et al., Nat Genet. 44(8): 955-959 (2012)), empleando una región tampón de 250 kb y la liberación de 1000 genomas 2012 (todas las etnias) como panel de referencia. Solamente los SNP con una puntuación de información IMPUTEv2 de al menos

65

0,95 en cada matriz individualmente se tuvieron en cuenta en los análisis adicionales por SNPTESTv2 (Marchini J et al., Nat Genet 39(7): 906-913 (2007)). Otros criterios de exclusión fueron una puntuación de información SNPTEST por debajo de 0,95 en la puntuación agrupada de las tres matrices de SNP, una frecuencia de alelos menores por debajo de 0,01, y un valor p de equilibrio de Hardy-Weinberg por debajo de 0,0001. El genotipado y la imputación proporcionaron un total de 1.456 variantes genéticas para el análisis.

[0092] Para el estudio SCP, la plataforma Illumina Hap610 realizó el genotipado, con medidas de control de calidad y análisis estadístico con SNPTESTv2 como se ha descrito anteriormente para QUASAR2. Para EPICOLON, el genotipado se realizó usando KASPar en ADN amplificado por genoma.

10

[0093] Se realizó un genotipado adicional para las variantes de *TYMS* 5'VNTR y 3'UTR por procedimientos descritos previamente (Horie N et al., Cell Struct Funct. 20(3): 191-197 (1995); Dotor E et al., J Clin Oncol 24(10): 1603-1611 (2006)). KASPar realizó un genotipado adicional de las variantes de *DPYD* 2846T>A y *DPYD* *2A (Cuppen E CSH Protocol 2007: pdb prot4841 (2007)) para el pequeño número de pacientes que no se genotiparon utilizando las matrices de exomas.

15

[0094] Para los loci en los que se detectaron asociaciones significativas entre las variantes genéticas y la toxicidad, se realizaron estudios de cartografía fina utilizando los procedimientos anteriores para imputar todos los SNP en una región flanqueante de 1,5 Mb, para refinar la señal de asociación.

20

c. Secuenciación

[0095] La secuenciación de las regiones codificantes de *DPYD* y *TYMS* se realizó mediante la tecnología Roche/454 Titanium GS FLX según el protocolo de secuenciación de amplicón especificado (véase http://454.com/downloads/my454/documenta-tion/gsjunior/method-manuals/GSJunior_AmpliconLibraryPrep-RevJune2010.pdf).

25

[0096] Específicamente, se seleccionaron 100 pacientes con los niveles más altos de toxicidad relacionada con 5-FU ("HiTox"), específicamente diarrea de grado 3 o grado 4 en los primeros 4 ciclos de tratamiento y otras toxicidades de grado 3/4 en los primeros 4 ciclos de tratamiento. También se seleccionaron 100 pacientes sin eventos adversos de toxicidad durante toda la duración del tratamiento ("LoTox"). Usando ADN de sangre periférica, se diseñaron reacciones y cebadores de PCR para cubrir los 23 exones de *DPYD* (27 amplicones; 4.784 pb) y 7 exones de *TYMS* (9 amplicones; 2.276 pb).

30

[0097] Las muestras de ADN constitutivo de cada paciente se cuantificaron usando PicoGreen, se diluyeron en concentraciones medidas iguales y se formaron en 10 grupos de 20 pacientes cada uno. A continuación, las agrupaciones se amplificaron por PCR para cada uno de los 36 amplicones. Los amplicones faltantes o no deseados se identificaron mediante un kit de ADN de alta sensibilidad de Agilent. Los amplicones exitosos se cuantificaron por PicoGreen según el protocolo 454, se igualizaron en concentración y se formaron en un grupo HiTox de 100 pacientes y un grupo LoTox de 100 pacientes para su secuenciación. El objetivo era lograr una profundidad de lectura mínima de 3.000 por locus diana por grupo (es decir, una cobertura de aproximadamente 30x por paciente).

35

40

[0098] La variante de *DPYD* de sentido erróneo p.Ala551Thr (A551T) se identificó en el grupo HiTox. El ADN de cada individuo que comprendía el grupo fue secuenciado por Sanger para identificar a los que portaban esta variante. Sólo se encontró un individuo heterocigoto. Para el análisis de todo el conjunto de muestras, se diseñaron cebadores de variantes de un solo nucleótido específicos de alelo por KASPar (<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2007/9/pdb.prot4841.ab-stract>) para detectar A551T e incluyeron tres duplicados de la muestra de variante conocida en cada ejecución para facilitar la agrupación de genotipos. Todas las muestras que no se agruparon con los homocigotos del alelo A se examinaron posteriormente mediante secuenciación bidireccional de Sanger.

50

iv. Análisis estadístico y computacional

[0099] Para cada una de las 1.456 variantes de matrices de SNP y de exomas, el análisis primario analizó las asociaciones entre la toxicidad global (cualquiera relacionada con 5-FU) limitante de la dosis (grado 012v34) y el genotipo. Las pruebas frecuentes bajo un modelo de regresión logística o lineal de datos faltantes se implementaron usando SNPTESTv2. Las muestras se estratificaron por el tratamiento QUASAR2 con la edad y el género como covariables. El meta-análisis de los dos brazos (439 pacientes en el brazo A (capecitabina) y 501 pacientes en el brazo B (capecitabina + bevacizumab) de QUASAR2 se realizó usando GWAMA (<http://www.well.ox.ac.uk/gwama/download.shtml>), incluidas las pruebas de heterogeneidad entre brazos. Se usó un umbral de valor p corregido de Bonferroni de $3,43 \times 10^{-5}$ (= 0,05/1456) para indicar una asociación significativa para el análisis primario de toxicidad global (binaria) limitante de la dosis.

55

60

[0100] Para SNP seleccionados con señales de asociación que alcanzaron o se acercaron a una significación formal, se imputaron SNP adicionales dentro de regiones flanqueantes de 1,5 Mb. Se realizaron pruebas de asociación

65

para toxicidades globales y específicas utilizando la medida global de grado 012v34. Dado que los SNP genotipados e imputados no eran independientes, se declararon asociaciones con los SNP imputados significativas utilizando el mismo umbral de $p = 3,43 \times 10^{-5}$. Para cualquier región dentro de la cual uno o más SNP lograron asociaciones significativas con la toxicidad global, las toxicidades individuales subyacentes se investigaron en los SNP más fuertemente asociados utilizando tanto medidas cuantitativas como cortes clínicamente viables para el retraso o la reducción de la dosis en QUASAR2 (generalmente grado 012v34, excepto para el grado 01v234 para diarrea).

[0101] Se usó el análisis de regresión logística en R para analizar los efectos independientes de las variantes dentro de una región. El modelo de mejor ajuste se determinó como aquel que minimiza el criterio de información de Akaike (AIC) sujeto a una variante que muestra una asociación en $p = 0,05$. Los análisis de haplotipos se realizaron utilizando los comandos "--hap-logística" y "--efecto independiente" en PLINK (Purcell S et al., American Journal of Human Genetics 81(3): 559-75 (2007)). Las pruebas para examinar múltiples variantes genéticas se realizaron en PLINK. El análisis de las características operativas del receptor (ROC) se realizó en Stata utilizando una clasificación binaria de pacientes con toxicidad global de grado 0/1/2 o grado 3/4, utilizando una puntuación genética dada para cada individuo por $\sum \beta_i N_i$, donde β_i es el coeficiente beta del i -ésimo SNP asociado significativamente con la toxicidad global en un modelo de regresión logística, y N_i es el número de alelos perjudiciales portados por ese individuo en ese lugar.

[0102] La anotación funcional de variantes se realizó con ANNOVAR. Los datos de expresión de ARNm se obtuvieron de Genevar (Yang TP et al., Bioinformatics 26(19): 2474-2476 (2010)) y de The Cancer Genome Atlas (TCGA), que se analizaron según los procedimientos de Qiyuan et al (Li QY et al., Cell 152(3): 633-641 (2013)).

[0103] Para los datos de secuenciación, se determinaron las asociaciones putativas con la toxicidad según el número estimado de lecturas de variantes y de tipo silvestre presentes en los grupos HiTox y LoTox (prueba de Chi cuadrado de Pearson o exacta de Fisher).

c. Nuevas asociaciones con toxicidad en el locus DPYD

[0104] Usando un umbral de valor p corregido de Bonferroni de $3,43 \times 10^{-5}$ para el análisis primario de toxicidad global limitante de la dosis (grado 012v34), se realizó un análisis para buscar asociaciones entre las variantes genéticas y la toxicidad por capecitabina. Estos análisis identificaron dos nuevos SNP de toxicidad de *DPYD*.

[0105] Se encontró que el alelo A (frec. = 0,03) de SNP rs12132152 estaba asociado con la toxicidad global por capecitabina ($OR_{\text{globalbinaria}} = 3,83$, $p = 4,31 \times 10^{-6}$; Tabla 6).

[0106] rs12132152 es una variante de SNP intergénica 22 kb aguas abajo de *DPYD* (chr1:97.523.004, b37). Tras la imputación de variantes en la región que flanquea este SNP de etiqueta, los SNP se identificaron con asociaciones marginalmente más significativas, en particular rs76387818 (chr1: 97.539.400; $OR_{\text{globalbinaria}} = 4,05$, $p = 2,11 \times 10^{-6}$, $r^2_{\text{etiqueta}} = 0,98$; Tabla 6; figura 4a). Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó la medida cuantitativa de la toxicidad global (Tabla 6).

[0107] Se investigaron los fenotipos individuales que comprendían la medida de toxicidad global. rs12132152 y rs76387818 se asociaron fuertemente con HFS tanto en modelos cuantitativos como binarios (para rs76387818, $OR_{\text{hfsquant.}} = 1,78$, $p = 5,51 \times 10^{-8}$, $OR_{\text{hfsbinario}} = 6,44$, $p = 1,75 \times 10^{-8}$), pero no con ninguna otra toxicidad individual.

[0108] Los posibles mecanismos funcionales informáticos subyacentes a la asociación de rs12132152/rs76387818 se investigaron adicionalmente.

[0109] Se examinaron los datos de ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) para la región que contenía rs12132152 y siete SNP fuertemente correlacionados (figura 4a: aproximadamente chr1: 97.475.000-97.562.000, b37). Los datos de metilación de FAIRE e histona K4 sugieren que esta es una región de cromatina abierta, y se encuentra un SNP correlacionado en particular, rs12123160, en un CpG metilado. Aunque no se disponía de datos adecuados de hígado normal, se encontró que los genotipos en rs12132152 y los SNP correlacionados no estaban asociados con la expresión de *DPYD* en el tejido adiposo, las células linfoblastoides o la piel (base de datos Genevar, $p > 0,13$) (Nica AC et al., Plos Genetics 7(2) (2011)) o en tejido de colon (The Cancer Genome Atlas (TCGA), $p = 0,72$).

[0110] La segunda variante asociada a la toxicidad de *DPYD* (Tabla 6) se identificó después de la imputación de SNP en la región de 1,5 Mb que rodea rs7548189, un tagSNP intrónico con respecto a *DPYD* (chr1: 97.867.713, b37). rs7548189 estaba asociado en el límite con la toxicidad global de la medida binaria ($OR_{\text{globalbinaria}} = 1,67$, $p = 3,79 \times 10^{-5}$). La investigación adicional mostró que rs7548189 se asocia formalmente con la medida cuantitativa de la toxicidad global, y con diarrea, tanto en modelos binarios como cuantitativos ($OR_{\text{globalbinaria}} = 1,23$, $p = 6,82 \times 10^{-6}$; $OR_{\text{diarreacuant.}} = 1,18$, $p = 1,54 \times 10^{-5}$; $OR_{\text{diarreabinaria}} = 1,76$, $p = 1,72 \times 10^{-5}$). Como se puede ver en la Tabla 6, HFS también contribuyó a la asociación con la toxicidad global. Después de la imputación regional, rs12022243 (r^2 con rs7548189 = 0,95) se encontró formalmente asociado con la toxicidad global en un modelo binario ($OR_{\text{globalbinaria}} = 1,69$, $p = 2,55 \times 10^{-5}$). rs12022243 mostró una excelente calidad de imputación: de 190 individuos evaluados

independientemente, solo faltaban 4 (2 %) genotipos y todos los genotipos restantes fueron imputados correctamente.

5 **[0111]** Aunque hay poca evidencia a partir de los datos de ENCODE de que rs7548189 sea funcional, rs12022243 está en una región de cromatina abierta que puede tener actividad potenciadora. rs7548189 no se asoció con los niveles de expresión de *DPYD* en linfoblastos, fibroblastos, linfocitos T, tejido adiposo o piel en la base de datos Genevar ($p > 0,07$) (Nica AC et al., *Plos Genetics* 7(2) (2011); Stranger BE et al., *Plos Genetics* 8(4): 272-284 (2012); Dimas AS et al., *Science* 325(5945): 1246-1250 (2009)) o en tejido de colon de TCGA ($p = 0,97$). rs12022243 estaba ausente de estos conjuntos de datos.

10 **[0112]** Utilizando el análisis de regresión logística, se encontró que tanto las señales rs12132152 como rs7548189/rs12022243 eran independientes entre sí y de las variantes de toxicidad de *DPYD* conocidas *2A (rs3918290) y 2846T>A (rs67373796) (figura 5b). El análisis adicional de los haplotipos basados en 81 tagSNP en una ventana de 25 kb a cada lado de *DPYD* no proporcionó un refinamiento adicional de las asociaciones rs12132152 y rs7548189/rs12022243 y no mostró evidencia de señales de asociación adicionales e independientes.

15

d. Refinado de la asociación de toxicidad en los loci *TYMS* y *ENOSF1*

[0113] El análisis se realizó para resolver la base de las asociaciones de toxicidad conocidas en *TYMS* (Tabla 6). Este análisis identificó un nuevo SNP de *TYMS/ENOSF1* predictivo de toxicidad por FU.

20

[0114] Se encontró que el alelo G (frec. = 0,45) del SNP rs2612091 se asoció con una mayor toxicidad global ($OR_{globalbinaria} = 1,59$, $p = 5,28 \times 10^{-6}$; $OR_{globalcuant.} = 1,19$, $p = 2,35 \times 10^{-6}$; Tabla 6). rs2612091 se encuentra 10 kb aguas abajo de *TYMS* en un intrón del miembro de la superfamilia de enolasa (*ENOSF1*, chr18: 683.607). La cartografía fina mostró asociaciones algo más fuertes para un SNP, rs2741171 (chr18: 700.687), en desequilibrio de ligamiento ($r^2 = 0,73$) con rs2612091, particularmente para la medida cuantitativa de la toxicidad global ($OR_{globalcuant.} = 1,2$, $p = 9,24 \times 10^{-7}$). La variante rs2741171 está aguas abajo adicionalmente de *TYMS* (27 kb) y de nuevo es intrónica para *ENOSF1*, pero ambos SNP se encuentran entre los epicentros recombinación que flanquean la totalidad tanto de *TYMS* como de *ENOSF1* (figura 4b). El efecto de rs2612091/rs2741171 sobre la toxicidad se impulsó esencialmente por HFS, observándose una asociación especialmente fuerte utilizando la medida cuantitativa (rs2612091: $OR_{hfsquant.} = 1,21$, $p = 3,67 \times 10^{-7}$; rs2741171: $OR_{hfsquant.} = 1,23$, $p = 3,10 \times 10^{-8}$).

30

[0115] *ENOSF1* es un gen en gran parte no caracterizado que parece codificar tanto una proteína como ARN antisentido con respecto a *TYMS*. Se ha propuesto que *ENOSF1* regula la expresión de ARNm y/o proteínas de *TYMS* (Dolnick BJ et al., *Cancer Biology & Therapy* 2: 364-369 (2003)), por lo que las asociaciones entre el genotipo rs2612091 y la expresión de *TYMS* y *ENOSF1* se analizaron utilizando las bases de datos Genevar y TCGA. Usando datos gemelos compatibles de caucásicos de (Nica AC et al., *Plos Genetics* 7(2) (2011)), el alelo G de rs2612091 disminuyó significativamente la expresión de *ENOSF1* en el tejido adiposo para ambos conjuntos gemelos ($p_{conjunto1} = 7,0 \times 10^{-4}$, $p_{conjunto2} = 9,7 \times 10^{-6}$) y en células linfoblastoides para un conjunto ($p_{conjunto1} = 0,89$, $p_{conjunto2} = 0,0012$). Sin embargo, el genotipo rs2612091 no se asoció con la expresión de *TYMS* ($p > 0,30$ para cada uno de los mismos análisis). De manera similar, en los datos de expresión linfoblastoide de (Stranger BE et al., *Plos Genetics* 8(4): 272-284 (2012)), el alelo G de rs2612091 se asoció con una disminución de la expresión de *ENOSF1* ($p = 1,9 \times 10^{-6}$) pero no de *TYMS* ($p = 0,82$). Estos resultados se replicaron en los datos del colon TCGA, en los que el alelo G de rs2612091 se asoció de nuevo con una disminución de la expresión de *ENOSF1* ($OR = 0,76$, $p = 1,5 \times 10^{-7}$), pero no con *TYMS* ($OR = 0,95$, $p = 0,45$). Se puede concluir que es más probable que *ENOSF1* sea el objetivo de la variación funcional marcada por rs2612091, y que este no actúa a través de la regulación descendente mediada por antisentido de *TYMS*, a pesar de que las transcripciones de *ENOSF1* y *TYMS* se superponen.

40

45

[0116] Se analizó la relación del nuevo SNP de toxicidad de *TYMS/ENOSF1* con respecto a dos polimorfismos de *TYMS* (5'VNTR 2R/3R y 3'UTR 6pb ins-del (Schwab M et al., *J Clin Oncol.* 26(13): 2131-2138 (2008); Lecomte T et al., *Clin Cancer Res.* 10(17): 5880-5888 (2004)) que previamente se ha informado que alteran la expresión de *TYMS* y, por lo tanto, afectan a la toxicidad relacionada con 5-FU (Tabla 7). Apreciando el DL moderado entre rs2612091 y los polimorfismos tanto 5'VNTR como 3'UTR ($r^2 = 0,40$ y $0,32$; figura 5), se analizó si la señal de rs2612091 era independiente de los polimorfismos 5'VNTR y 3'UTR, utilizando la medida cuantitativa de HFS (01v2v34) como fenotipo de toxicidad, ya que el HFS subyace a la señal de toxicidad global observada para las tres variantes.

55

[0117] En primer lugar, las tres variantes se incorporaron en un modelo de regresión logística ajustado por covariable. Solo rs2612091 permaneció significativamente asociado cuando se ajustó para las otras variantes (para rs2612091 $OR_{hfsquant.} = 1,21$, $p = 0,00049$, 5'VNTR $p = 0,19$, 3'UTR $p = 0,48$). El uso de rs2612091 en solitario en el modelo minimizó el AIC.

60

[0118] En segundo lugar, se analizó la evidencia de interacción (epistasia) entre las variantes, pero se encontró que no era significativa entre rs2612091 y 5'VNTR ($p = 0,92$) o 3'UTR ($p = 0,19$). Estos análisis sugirieron que rs2612091 y las variantes identificadas previamente no actúan como una etiqueta de 3 polimorfismos para variantes no identificadas, y que rs2612091 captura mejor la señal de asociación creada por las tres variantes.

65

- [0119]** Finalmente, se analizó la independencia de cada variante en un haplotipo de 3 polimorfismos (Tabla 7). Se encontró que el alelo G de rs2612091 aumentaba consistentemente el riesgo de toxicidad, independientemente del genotipo 5'VNTR o 3'UTR ($p = 0,0021$). Por el contrario, ni el 5'VNTR ($p = 0,17$) ni el alelo de riesgo 3'UTR ($p = 0,61$) aumentaron consistentemente el riesgo de toxicidad al variar el genotipo de los otros dos SNP. El análisis se repitió como haplotipos de 2 polimorfismos que comprendían rs2612091 y la variante 5'VNTR o 3'UTR. El genotipo rs2612091 se asoció de nuevo significativamente con HFS, independientemente del genotipo 5'VNTR ($p = 0,00053$) o 3'UTR ($p = 1,47 \times 10^{-6}$). Los análisis anteriores se repitieron utilizando la toxicidad global y los resultados fueron similares, pero se redujeron modestamente en importancia.
- 10 **[0120]** La regresión logística equivalente y el análisis de haplotipos usando el SNP de cartografía fina superior rs2741171 mostraron evidencia aún más fuerte de que la nueva señal de SNP rs2612091 en solitario explica las asociaciones en *TYMS/ENOSF1*. Las diversas combinaciones de polimorfismos rs2741171, rs2612091, 5'VNTR y 3'UTR se analizaron adicionalmente en un modelo de regresión logística multivariante y se encontró que el modelo que minimizaba el AIC incorporaba rs2741171 en solitario. rs2741171 se encuentra al lado de una región de cromatina abierta que puede ser un sitio de unión a p300.

e. Análisis de replicación informático en conjuntos de datos adicionales

- [0121]** Las asociaciones entre toxicidad y rs12132152, rs7548189 y rs2612091 se examinaron en 233 pacientes tratados con capecitabina del estudio SCP mencionado anteriormente. Dado que estos pacientes se seleccionaron de entre los extremos de las distribuciones de alta y baja toxicidad (Tabla 4), no se realizó un meta-análisis formal. Además, no estaba disponible una medida global de la toxicidad y se analizaron las asociaciones con las toxicidades individuales específicas (diarrea y/o HFS) que comprendían las señales de asociación global encontradas en los pacientes de QUASAR2 (Tablas 6 y 8).
- 25 **[0122]** El SNP de *ENOSF1/TYMS* rs2612091 se asoció con HFS en pacientes de SCP con un tamaño de efecto similar al de QUASAR2 ($OR_{binaria} = 1,6$, $p = 0,012$). El SNP de la región *DPYD*, rs7548189 se asoció con el HFS en el estudio SCP ($OR_{binaria} = 1,7$, $p = 0,048$), pero no mostró evidencia de una asociación con diarrea ($OR_{binaria} = 0,78$, $p = 0,46$). Además, rs7548189 se analizó en 85 pacientes tratados con capecitabina del estudio EPICOLON mencionado anteriormente (Abuli A, et al. Carcinogenesis (Epub antes de la impresión) (2013)), y se encontró evidencia de una asociación con diarrea grave ($OR_{binaria} = 1,47$, $P = 0,020$).
- 30 **[0123]** La asociación entre el HFS y el SNP de *DPYD* relativamente raro rs12132152 no se replicó en el conjunto SCP (Tabla 8), que mostró una dirección del efecto opuesta a la observada en QUASAR2 ($OR_{binaria} = 0,30$, $p = 0,025$). Dado que la asociación de rs12132152 en QUASAR2 fue muy fuerte, la ausencia de asociación en los datos del estudio SCP podría ser resultado de diferencias genéticas entre las poblaciones del norte y sur de Europa. Por consiguiente, se determinó la estructura de desequilibrio de ligamiento de una región de 1 Mb alrededor de rs12132152 en los conjuntos de datos de 1000 genomas GBR (Reino Unido) y TSI (Toscana).
- 35 **[0124]** Se encontró un conjunto de 14 variantes raras no codificantes que estaban altamente correlacionadas entre sí, estaban en desequilibrio de ligamiento moderado con rs12132152 ($r^2 \sim 0,5$), su mejor tagSNP, en los datos de GBR, pero casi no mostraron asociación con rs12132152 en los datos de TSI ($r^2 < 0,002$). Las 14 variantes fallaron las verificaciones de control de calidad de imputación para QUASAR2, pero representan posibles variantes de toxicidad funcional marcadas por rs12132152. De particular interés, tres de estas variantes (rs72724388, rs72724390 y rs142652198) se encuentran dentro de los intrones *DPYD* y se transcriben como parte de un ARNm antisentido (*DPYD-AS1*, chr1: 97561479-97788511) que no se caracteriza *in vivo*.

f. Pruebas basadas en conjuntos

- 50 **[0125]** Para determinar si había evidencia en QUASAR2 de asociaciones de toxicidad adicionales que no habían alcanzado una significación estadística formal para SNP individuales o variantes raras, se realizaron pruebas de asociación basadas en conjuntos de variantes (Tabla 9). Se excluyeron tanto las variantes de toxicidad informadas previamente como las variantes de la invención, concretamente, *DPYD* 2846, variantes *2A, *DPYD* rs12132152, *DPYD* rs7548189 y *TYMS* rs2612091, así como regiones en desequilibrio de ligamiento de $r^2 > 0,1$ con estos SNP (incluyendo los polimorfismos de *TYMS* 5'VNTR y 3'UTR).
- 55 **[0126]** Usando una tasa de descubrimiento falsa de $q = 0,05$, no se encontró evidencia convincente de asociaciones adicionales en ningún gen o en el conjunto de variantes en su conjunto. Sin embargo, existe evidencia sugestiva de asociaciones entre variantes en el locus *TYMP* y HFS y diarrea (Tabla 9).

g. Identificación de nuevas variantes de susceptibilidad raras en *DPYD* y *TYMS*

- 60 **[0127]** La secuenciación de las regiones codificantes de *DPYD* y *TYMS* identificó solo una única variante sin sentido en el grupo HiTox (*DPYD* c.G1651A; p.Ala551Thr; chr1: 97981371) que no estaba presente en las matrices de SNP y exomas. No se encontró ninguna otra aparición de esta variante en el conjunto completo de 968 pacientes.

El número medio de lecturas de secuencia por persona para esta variante fue de 70 y la frecuencia general de lectura de variante fue de 0,0035. Se predijo que esta variante (A551T) sería muy perjudicial por SIFT, Polyphen, PhyloP y MutationTaster. La secuenciación de Sanger identificó a un solo paciente con este alelo raro, que había experimentado neutropenia y trombocitopenia de grado 4.

5

[0128] Las búsquedas en la base de datos determinaron que esta variante se ha informado previamente como causa del Síndrome de deficiencia de DPYD (OMIM 612779) (Van Kuilenburg AB et al., Biol Chem. 386(4): 319-324 (2005)). Se confirmó que A551T no estaba en desequilibrio de ligamiento con ninguna de las otras variantes de toxicidad de *DPYD* comunes o raras.

10

[0129] De los 19 pacientes con toxicidad extrema (grado 4) en cualquier ciclo, se determinó qué alelos portaban en los tres SNP de toxicidad y su complemento de alelos raros de *DPYD* de la bibliografía, incluyendo 2846 A>T y *2A que se demostró que estaban asociados con la toxicidad por 5-FU en este meta-análisis anterior (Rosmarin et al., Journal of Clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology (2014), en prensa) (Tabla 10).

15

No hubo pruebas convincentes de que los alelos de riesgo en los 3 nuevos SNP de toxicidad estuvieran sobrerrepresentados como grupo en estos 19 pacientes (Tabla 10). Utilizando la evaluación de Caudle et al (Caudle et al., Clinical pharmacology and therapeutics 94(6): 640-5 (2013)) como guía, complementada con datos de este estudio, se evaluaron las contribuciones probables de cada variante rara de *DPYD* a la toxicidad extrema. No hubo pruebas previas suficientes (Caudle et al., Clinical pharmacology and therapeutics 94(6):640-5 (2013)) para considerar seis alelos de *DPYD* (*4, *5, *6, *9A, M166V y K259E) como patógenos (Tabla 11). La inspección de los genotipos de estos polimorfismos en los casos de toxicidad grave (Tabla 10) y las pruebas de asociación con toxicidad global binaria (Tabla 11) no contradecían este punto de vista.

20

[0130] Varios otros alelos raros de *DPYD* (*3, *7, *8, *9B, *10, *11, *12) no estaban presentes en el conjunto de muestras. Cuatro alelos raros de *DPYD* se representaron como gravemente perjudiciales funcionalmente: *2A, 2846T>A, *13 y A551T. Cinco de 19 (26 %) pacientes con toxicidad grave portaban uno de estos alelos de *DPYD* (Tabla 10). De estos 5 casos, 4 (80 %) tenían toxicidad para la médula ósea potencialmente mortal (neutropenia G4 y trombocitopenia), mientras que el otro tenía diarrea G4. Otro individuo con neutropenia G4, pero no trombocitopenia, no portaba ninguno de los 4 alelos de *DPYD*. En general, para la predicción de mielosupresión grave, las variantes raras de *DPYD* tenían un 83 % de sensibilidad, un 99 % de especificidad, un 29 % de valor predictivo positivo y un 99,9 % de valor predictivo negativo.

30

[0131] Al igual que las demás variantes raras de *DPYD* (*2A y 2846T>A) que han establecido asociaciones con la toxicidad relacionada con 5-FU en el estado heterocigoto, se ha demostrado que A551T causa el síndrome de deficiencia de DPYD recesivo cuando está presente como homocigoto o heterocigoto compuesto con otro alelo mutante (Schwab M et al., J Clin Oncol. 26(13): 2131-2138 (2008)). La identificación de A551T en un paciente que experimenta neutropenia y trombocitopenia de grado 4 respalda aún más la opinión de que las variantes raras de *DPYD* no sinónimas que causan el síndrome de deficiencia de DPYD, tal como I560S y aproximadamente otras 15 (Van Kuilenburg AB et al., Biol Chem. 386(4): 319-324 (2005); Van Kuilenburg AB et al., Hum Genet. 104(1): 1-9 (1999); Van Kuilenburg AB et al., Biochem J 364: 157-163 (2002)), aumentan en gran medida el riesgo de toxicidad por 5-FU en heterocigotos.

35

40

[0132] Además, de los otros tres pacientes de QUASAR2 que experimentaron mielotoxicidad de grado 4, dos de los cuales fueron las únicas muertes inducidas por toxicidad en QUASAR2, uno portaba DPYD *2A, otro 2846A> C y otro *13. De los 12 portadores de alelos raros y funcionalmente perjudiciales de DPYD que no desarrollaron toxicidad grave, 7 sufrieron una toxicidad de grado 3 y, por lo tanto, puede haberse evitado la toxicidad grave por la reducción de la dosis de capecitabina. Por lo tanto, es plausible que la toxicidad extrema relacionada con capecitabina/5-FU sea heredable.

45

50 f. Análisis de las características operativas del receptor (ROC)

[0133] Con el fin de analizar el rendimiento de un modelo para predecir la toxicidad por 5-FU en función de las variantes de toxicidad de capecitabina previamente informadas y las variantes recientemente identificadas de la invención, el conjunto de datos de QUASAR2 y las variantes de *DPYD* 2846T>A, *DPYD* *2A, *DPYD* rs12132152, *DPYD* rs7548189, *DPYD* p.Ala551Thr y *TYMS* rs2612091 se incorporaron en un análisis ROC para la predicción de la toxicidad global relacionada con capecitabina de grado 012v34. Tal modelo analiza la utilidad clínica de la invención.

55

[0134] Se analizaron 938 pacientes, aplicando una puntuación para cada paciente que sumaba: (número de alelos perjudiciales en cada polimorfismo) x (coeficiente beta por alelo)

60

[0135] Se asumió que las variantes de *DPYD* rs12132152, rs7548189 y A551T eran funcionalmente equivalentes y, por lo tanto, se combinaron para los fines de este análisis en una prueba de cualquier alelo funcional raro frente a ningún alelo raro (OR = 7,6, p = 4,5x10⁻⁴). Se encontró que el área bajo la curva (AUC) era 0,66 (95 % de IC 0,63-0,70). En el SNPTTESTv2 para el cual la proporción máxima de pacientes se clasificó correctamente (69 %), la sensibilidad fue del 27 % (95 % de IC al 23-33 %), la especificidad fue del 91 % (95 % de IC al 88-93 %), el valor

65

predictivo positivo fue del 60 % (PPV: 95 % de IC al 52-68 %), y el valor predictivo negativo fue del 71 % (NPV: 95 % de IC al 68-74 %) (figura 6).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección del riesgo de toxicidad por 5-fluorouracilo (FU) en un sujeto, que comprende la detección en el sujeto de la presencia del polimorfismo de TYMS rs2612091; en el que:
- 5 i. la presencia de dicho polimorfismo indica un mayor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que no posee dicho polimorfismo; y
- ii. un resultado negativo indica un menor riesgo de desarrollar toxicidad por FU en comparación con un sujeto que posee dicho polimorfismo.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la detección de la presencia de uno o más polimorfismos de TYMS adicionales seleccionados de 5'VNTR 2R/3R rs45445694 y 3'UTR 6pb ins-del rs16430; y un polimorfismo de DPYD seleccionado del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189 y p.Ala551Thr.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la detección de la presencia de uno o más polimorfismos de DPYD seleccionados del grupo que consiste en: *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, rs12022243, rs7548189 y p.Ala551Thr.
- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 1, que comprende la detección de la presencia del polimorfismo de TYMS rs2612091; y polimorfismos de DPYD *2A rs3918290, 2846T>A rs67376798, rs12132152, p.Ala551Thr.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un paciente con cáncer; opcionalmente, en el que el paciente tiene un cáncer de tumor sólido.
- 25 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el paciente tiene cáncer colorrectal (CRC) o cáncer de mama.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto se somete a quimioterapia con FU.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que el sujeto se somete a monoterapia con capecitabina.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección se realiza en una muestra de fluido de un paciente.
- 35 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la muestra de fluido es una muestra de saliva, suero sanguíneo o plasma.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección se realiza en una muestra sólida de un paciente; opcionalmente, en el que la muestra sólida es de una biopsia.
- 40 12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de monitorizar al sujeto para uno o más síntomas de toxicidad por FU en caso de un resultado positivo.
- 45 13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que el uno o más síntomas incluyen diarrea, náuseas y vómitos, mucositis/estomatitis, mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia y/o síndrome mano-pie (HFS).
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en el que el uno o más síntomas incluyen diarrea y/o síndrome mano-pie (HFS).
- 50 15. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección se realiza a través de regresión logística; opcionalmente, en el que se asigna una puntuación genética $\sum \beta_i N_i$ a cada individuo, en la que β_i es el coeficiente beta del i-ésimo SNP asociado significativamente con la toxicidad global en un modelo de regresión logística, y N_i es el número de alelos perjudiciales transportados por ese individuo en ese locus.
- 55

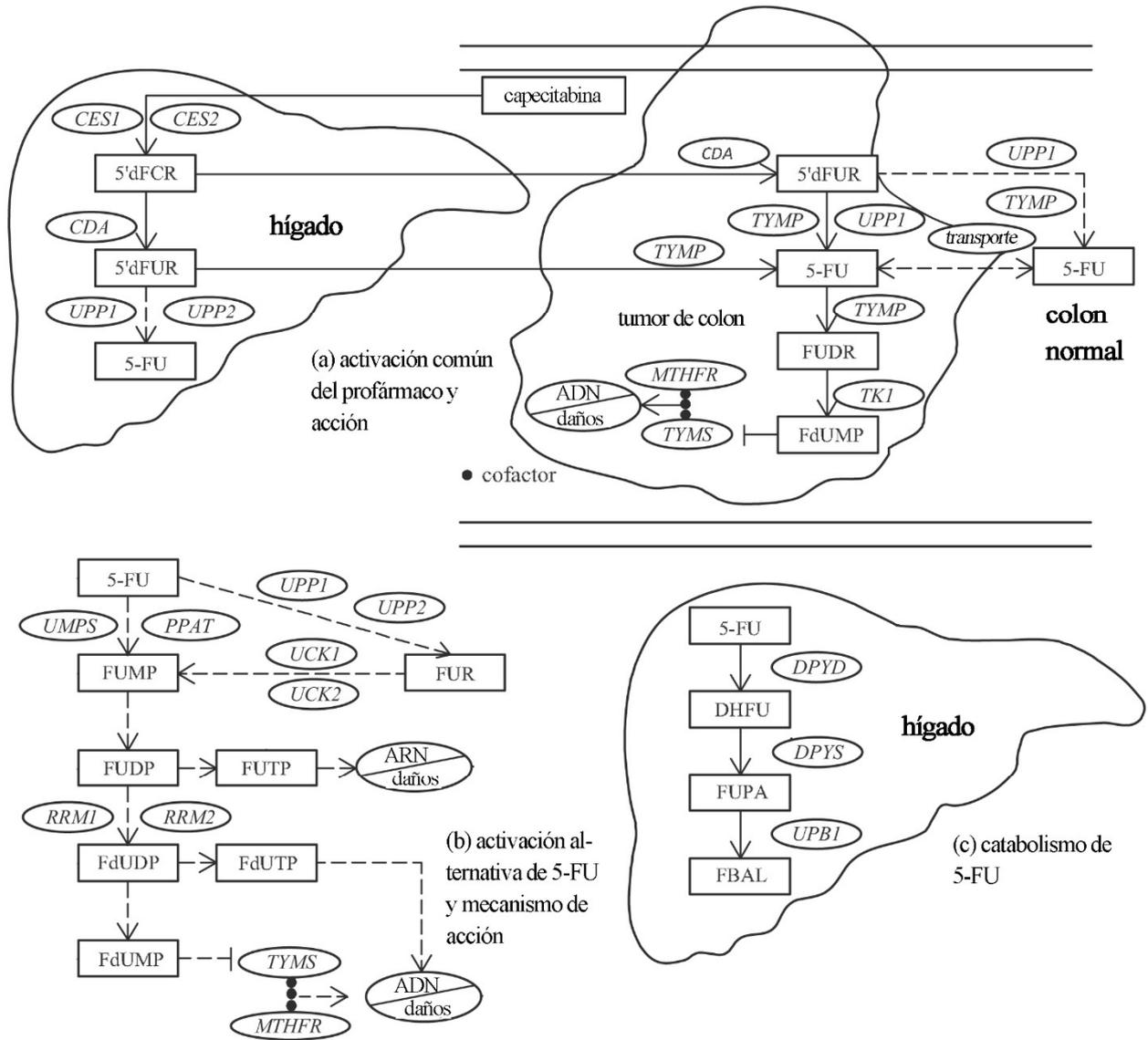
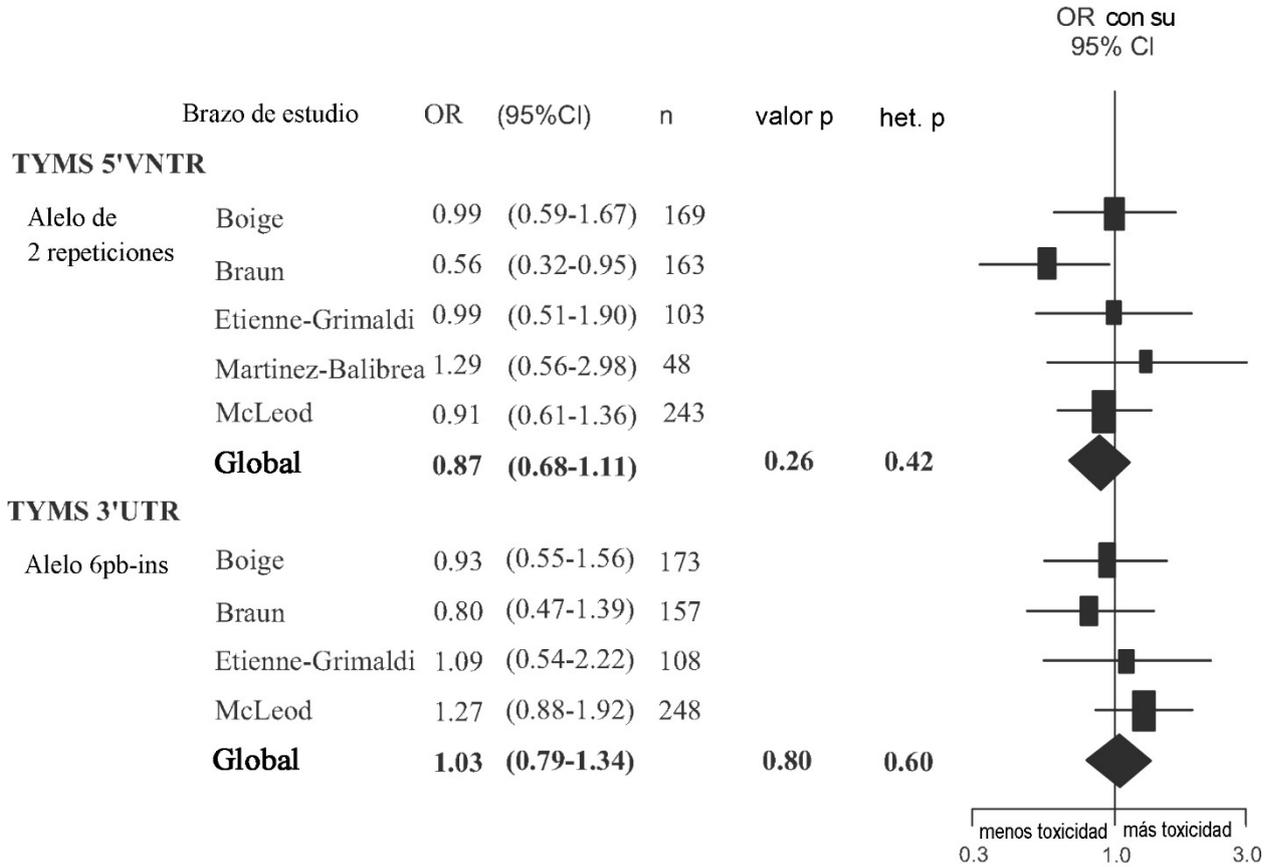


Fig. 1



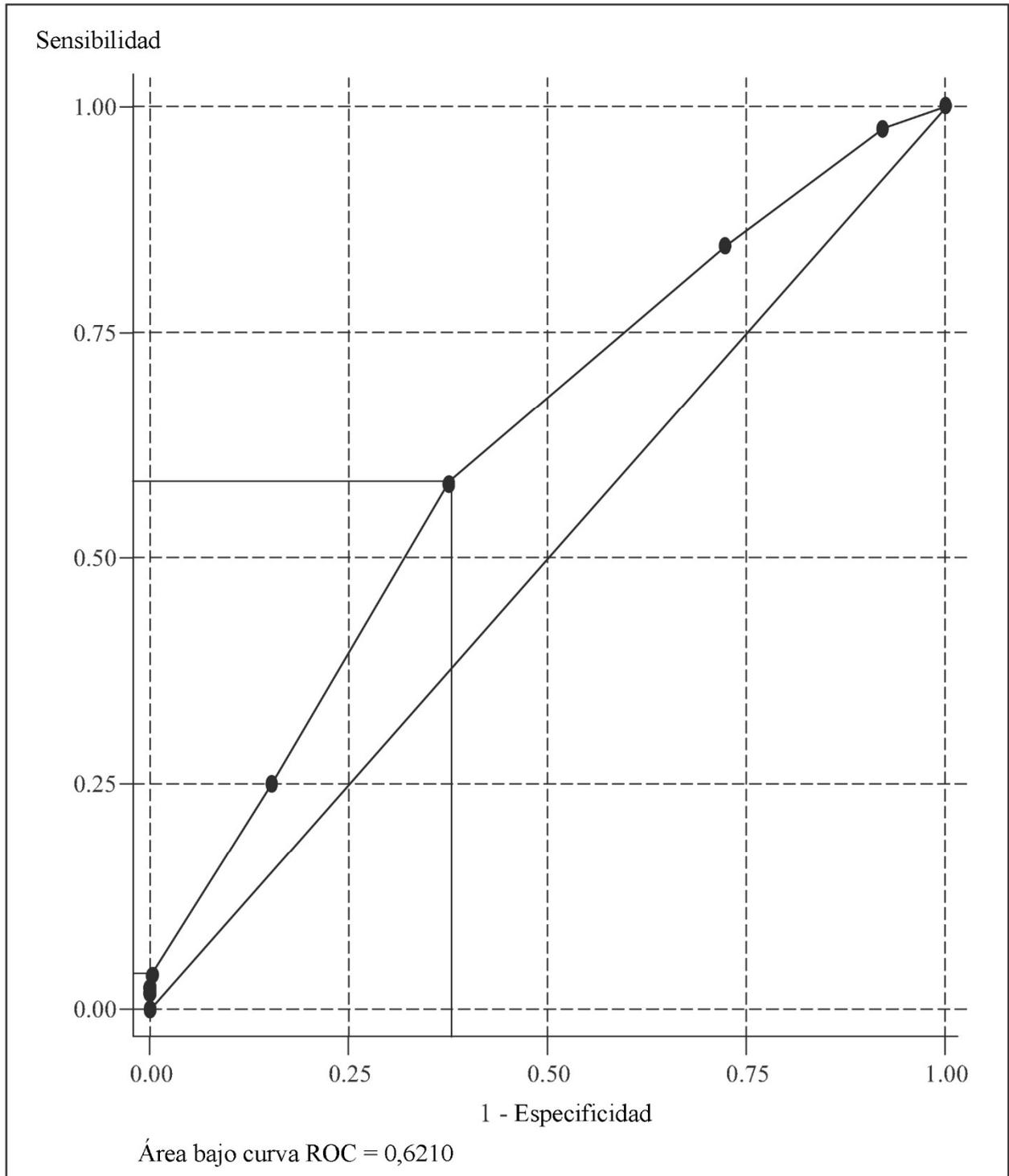


Fig. 3

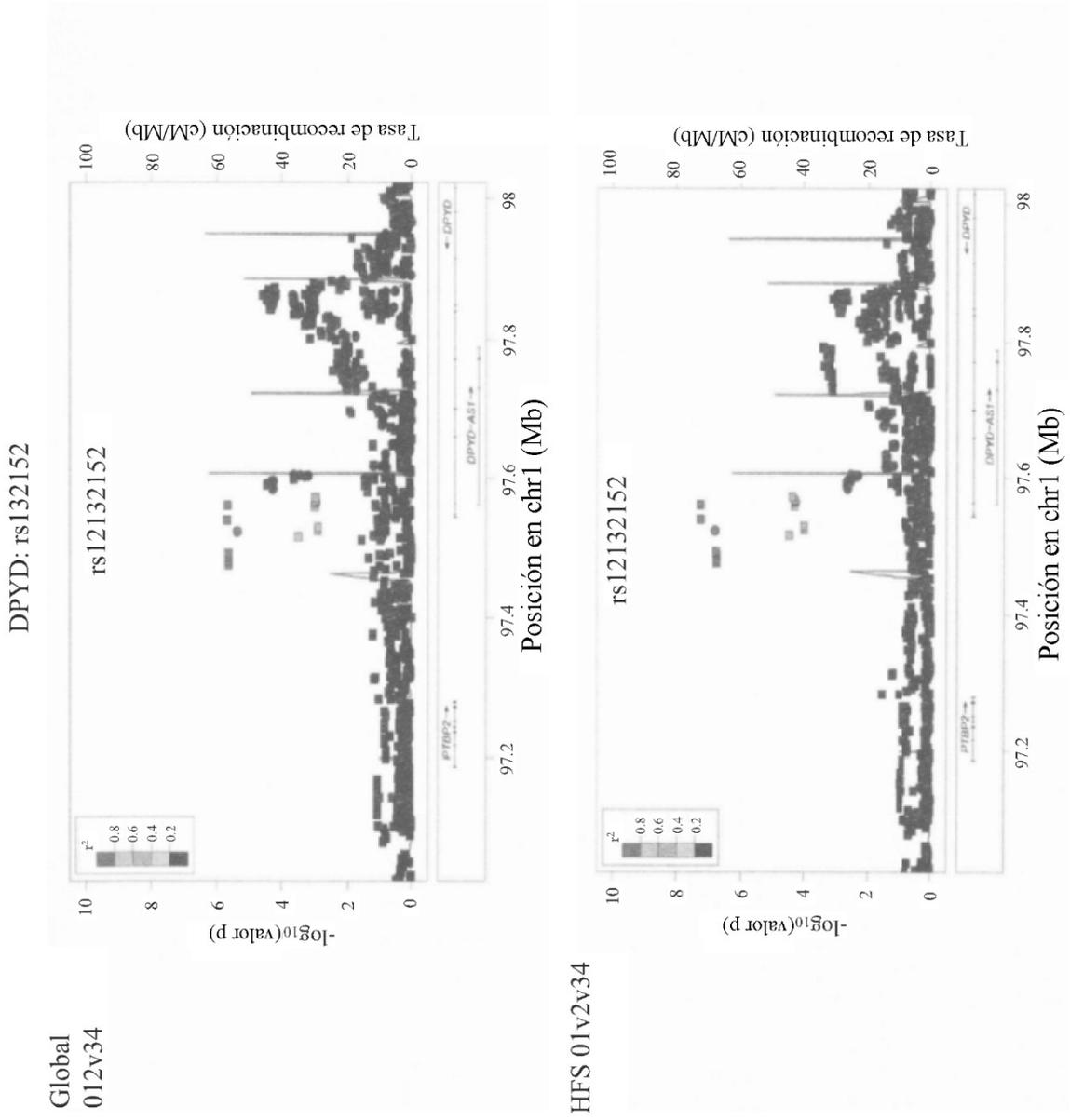


Fig. 4A

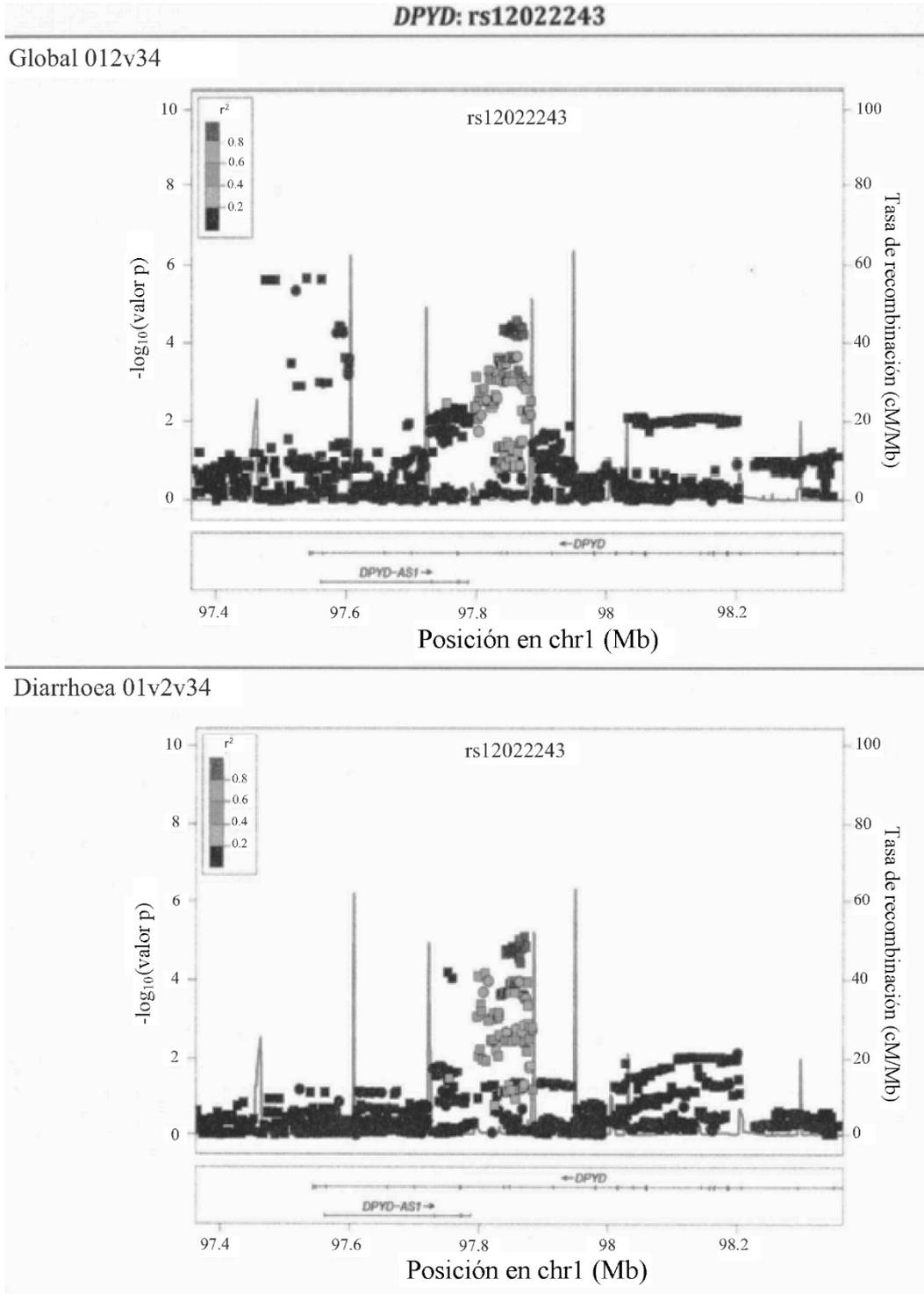
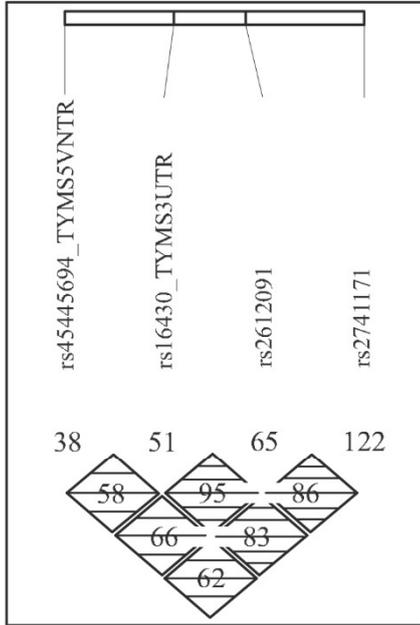
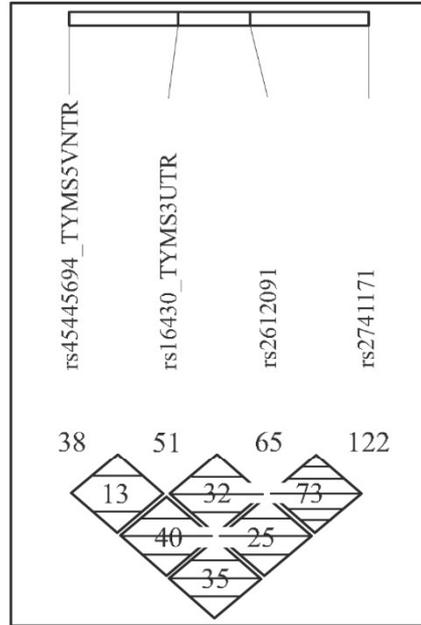


Fig. 4a (cont.)



(a) TYMS



(b) DYPD

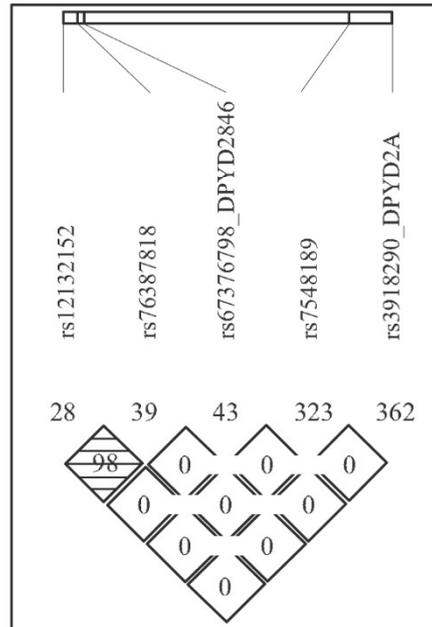
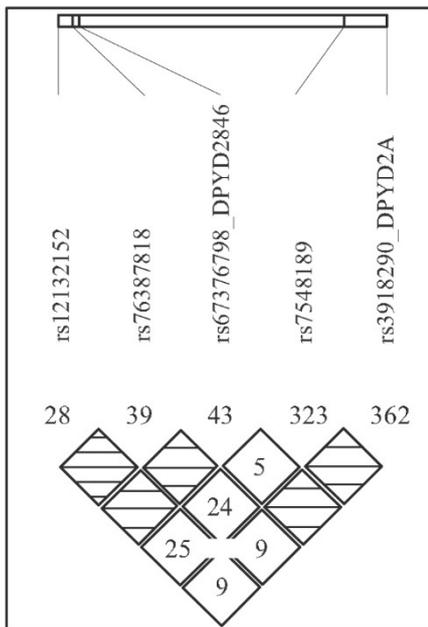


Fig. 5

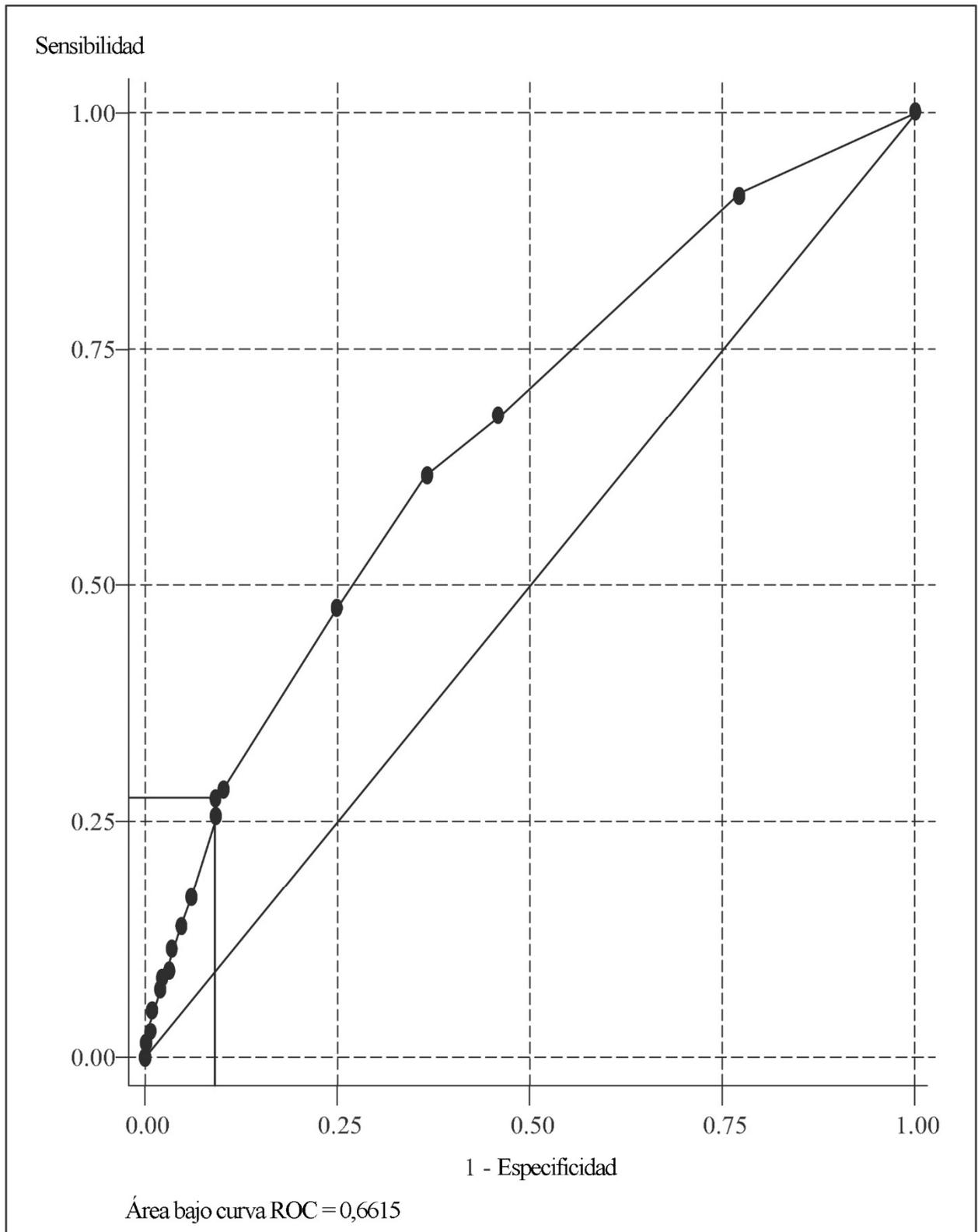


Fig. 6