



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 350 648**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06742440 .8**

(96) Fecha de presentación : **30.05.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1885878**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

(54) Título: **Composiciones y métodos para predecir el resultado de un tratamiento.**

(30) Prioridad: **31.05.2005 US 686070 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.01.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.01.2011

(73) Titular/es: **DAKO DENMARK A/S**
Produktionsvej 42
2600 Glostrup, DK

(72) Inventor/es: **Nielsen, Kirsten, Vang;**
Eilertsen, Bent, Laursen;
Mouridsen, Henning, T. y
Poulsen, Tim, Svenstrup

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 350 648 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

Composiciones y métodos para predecir el resultado de un tratamiento.

5 **Campo técnico**

El invento pertenece al campo de la biología molecular y de la química proteínica. Más específicamente, el invento pertenece a las composiciones, los métodos y los equipos para la detección de marcadores que podrían ser útiles para la estratificación de pacientes para el mejor tratamiento posible.

10 **Antecedentes del invento**

Cada paciente de cáncer es único, como lo son el tumor y el cáncer. El curso de la enfermedad y el efecto de la terapia son un producto de la genética y del entorno tanto del paciente como del tumor. Por medio de la adaptación de la quimioterapia al perfil genético específico del paciente y del tumor, la farmacogenética podría aumentar potencialmente el rendimiento, disminuir la toxicidad y reducir los costes globales de la quimioterapia. A nivel celular, el cáncer es una enfermedad genética, y la progresión del tumor está en relación de asociación con un número progresivamente mayor de cambios genéticos, por ejemplo, translocaciones, multiplicaciones, eliminaciones, y mutaciones. Los genes involucrados en el proceso canceroso son oncogenes y genes supresores de tumores. Los oncogenes se activan a través de translocaciones y multiplicaciones, mientras que los genes supresores de tumores se eliminan principalmente por medio de mutaciones y eliminaciones.

La carga del cáncer

Basándose en los datos obtenidos entre 1998 y 2000 del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados finales (en adelante SEER), se ha demostrado que el riesgo de desarrollo de un cáncer durante la vida es de 1 en cada 3 para las mujeres y de 1 en cada 2 para los hombres (véase <http://www.Seer.cancer.gov>). La tasa relativa de supervivencia en 5 años varía considerablemente por zona de cáncer y por etapa en el diagnóstico. Se han observado significativas reducciones en tasas de mortalidad en todas las zonas combinadas, para el cáncer de mama en las mujeres y para el cáncer colorrectal en ambos sexos. Los tres cánceres más frecuentes que surgen en las mujeres son el de mama, el de pulmón y el de colon, en comparación con los hombres, en los que el cáncer más frecuente es el de próstata, el de pulmón y el de colon. Se puede estimar también que muy cerca de los 10 millones de personas en los EE.UU. están vivas después de haberseles diagnosticado un cáncer. Más de 2 millones de mujeres a las que se les había diagnosticado previamente un cáncer de mama están vivas en la actualidad, lo que refleja tanto la gran incidencia como la supervivencia relativamente buena del cáncer de mama.

La contribución de la quimioterapia citotóxica a la supervivencia del tratamiento de pacientes con cáncer con agentes citotóxicos es una norma bien establecida para los cánceres más avanzados y se está convirtiendo de forma creciente en una parte integrada del tratamiento en los cánceres primarios e incipientes, pudiéndose citar como ejemplos los cánceres colorrectal y de mama. La quimioterapia citotóxica se puede administrar en los cánceres incipientes antes de la cirugía y de la radioterapia como tratamiento primario, en concomitancia con terapia local o complementaria a las terapias locales. Los inhibidores de síntesis del ácido desoxirribonucleico (en adelante ADN) tales como el 5-Fluorouracil (en adelante 5-FU) han demostrado actividad en una gama de cánceres avanzados, incluyendo cánceres colorrectal, de mama, y de cabeza y cuello. Sin embargo, el máximo impacto se ha logrado en pacientes con cáncer operable de mama y cáncer colorrectal, en los que el tratamiento con el 5-FU que incluía quimioterapia reduce significativamente el riesgo de recaída y mortalidad (IMPACT Lancet 1995; 345: 939-44, EBCTCG Lancet 2005).

El ejemplo del cáncer de mama

Las pacientes con cáncer de mama primario recibirán a menudo una terapia compleja que integra múltiples modalidades. La terapia local podría ser solamente cirugía o una combinación de cirugía y radioterapia. Se aconsejan terapias generalizadas para la mayoría de los pacientes, dependiendo del paciente y del tumor. La supervivencia es como mínimo tan buena con la quimioterapia pre-operatoria como con la quimioterapia post-operatoria, pero las diferentes modalidades de tratamiento se administran principalmente en secuencia, para evitar una posible interacción entre modalidades diferentes.

Las alteraciones genosomáticas involucradas en la etiología del cáncer de mama son complejas y heterogéneas. Entre varios protooncogenos que se sabe que se activan se encuentran los MIC, v-erb-2 homólogo eritroblástico leucemia viral oncogen 2 (en adelante ERBB2 (HER2)) y ciclina D1 (en adelante CCND1) (S Ingvarsson 1999). La activación de estos genes a menudo implica anomalías genéticas tales como, por ejemplo, la multiplicación o la translocación de las correspondientes regiones cromosómicas, y, por ejemplo, se han demostrado también mutaciones y eliminaciones de genes supresores de tumores, tales como TP53, CDH1 (codificación como E-cadherin) y FHIT. Se ha observado hiperexpresión de ERBB2 en un 20-30% de cánceres de mama y en general la hiperexpresión de ERBB2 está en relación de asociación con un mal pronóstico. Sin embargo, existen también datos de estudios retrospectivos que indican que el estado del ERBB2 podría ser también de un valor predictivo. En aproximadamente un 25% de cánceres de mama se ha observado una mutación de proteína de tumor 53 (en adelante TP53). Los estudios de evaluación del valor de pronóstico (y predictivo) del p53 utilizando métodos inmunohistoquímicos para determinar p53 son conflictivos. Sin

embargo, la detección de las alteraciones del gen TP53 es superior a la inmunotinción como un factor de pronóstico (S Thorlacius 1995) y la mutación de TP53 muestra una intensa asociación con un mal pronóstico. (J Overgaard 2000). Parece que la mutación de TP53, o al menos un subconjunto de mutaciones, está también en relación de asociación con la quimioterapia basada en antraciclina (S Geisler 2001).

Aunque se han hecho muchos esfuerzos dedicados al estudio de los marcadores de diagnóstico en el cáncer, solamente han surgido hasta ahora detalles muy limitados. En el cáncer de mama, los únicos marcadores de diagnóstico en uso clínico son el receptor de estrógeno (en adelante ER), el receptor de progesterona (en adelante PgR) y el ERBB2, que predicen la sensibilidad a las hormonas y el tratamiento de Herceptin, respectivamente. Están en preparación marcadores adicionales para un uso clínico, por ejemplo, cambios del número de copias de la topoisomerasa alta 2 (en adelante TOP2A) como pronóstico para el resultado del tratamiento con antraciclina. Sin embargo, dada la amplia gama de tratamientos de quimioterapia utilizados, existe una enorme necesidad de marcadores más predictivos para facilitar la introducción de una medicina personalizada.

Factores predictivos para la eficacia de la quimioterapia complementaria en el cáncer de mama

La eficacia de la quimioterapia está bien documentada en el cáncer de mama incipiente ((Grupo de colaboración de autores de ensayos de cáncer de mama incipiente (en adelante EBCTCG), Lancet 2006). La primera generación de ensayos clínicos demostró que la quimioterapia, por ejemplo, la combinación clásica de ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo (en adelante CMF) reduce el riesgo de recaída y mortalidad del cáncer de mama en un 20-25%. Se ha conseguido una reducción adicional del riesgo en ensayos posteriores añadiendo antraciclina, y en la actualidad se está investigando la eficacia de los taxanos. Se ha ofrecido quimioterapia a un grupo de pronóstico heterogéneo de pacientes en el que el riesgo individual de recaída y muerte del cáncer de mama varía desde un 10% hasta un 80%. Con carácter global, se puede prevenir del 30% al 40% de las muertes previstas, pero en cifras totales, la supervivencia global solamente se ha reducido en un porcentaje bajo (del 10% al 7%) en el grupo de bajo riesgo, y en aproximadamente un 25% en el grupo de alto riesgo ((desde un 80% hasta un 55%). Por tanto, tiene lugar un hipertratamiento extenso con consecuencias concurrentes en la forma de efectos colaterales y uso no previsto de recursos. Por consiguiente, en la actualidad hay una gran necesidad de desarrollo de factores predictivos, que aún no se ha satisfecho.

Frecuentemente, no se conoce el mecanismo de acción con detalle cuando se introduce un tratamiento en el ámbito clínico. Está emergiendo una introspección inicial en los antecedentes moleculares del modo de acción de algunas quimioterapias, y recientemente se han aportado algunos ejemplos de una relación entre el efecto del tratamiento con una quimioterapia específica y los cambios genéticos específicos en las células del cáncer. El ensayo del grupo danés de cooperación en cáncer de mama (en adelante DBGG89_D) demostró que la sustitución de metotrexato en la combinación de CMF por epirubicina condujo a una reducción del 25% en supervivencia total (Mouridesn ASCO 1999). Con carácter retrospectivo, se podría demostrar que este efecto está restringido principalmente a pacientes que alojen multiplicación o eliminación del gen TOP2A en sus tumores (Knoop 2003). El gen TOP2A codifica la topoisomerasa II α , que es el objetivo primario de las antraciclina (epirubicina y doxorubicina).

El TOPII α está involucrado en la replicación, transcripción y traducción del ADN. El TOP II α introduce una rotura doble temporal del ADN, que permite el desenrollado de la doble hélice del ADN. A continuación de la fijación de epirubicina al TOP II α , el complejo de TOP II α se estabiliza y la rotura del ADN se convierte en irreversible (JM Berger 1996). Las antraciclina son activas durante todas las fases del ciclo celular, pero son muy dinámicas en la proliferación de células (AJ oukell 1997).

En los ensayos aleatorizados, el beneficio de supervivencia de la quimioterapia complementaria basada en antraciclina parece haberse restringido a los pacientes positivos en ERBB2 (HB Muss 1994; AD Thor 1998; S Paik 1998); PC Clahsen 1994; S Paik 2000, A Di Leo 2001). El TOP 2 A de codificación de gene está situado muy cerca del ERBB2 y a menudo se co-multiplica con el ERBB2. Se ha sugerido que la sensibilidad a la quimioterapia basada en antraciclina de los pacientes positivos en ERBB2 podría explicarse por la co-multiplicación del TOP 2 A y de ese modo por la expresión aumentada de TOP2 A, el objetivo celular para las antraciclina (TA Järvinen 2000). Más recientemente, se ha demostrado que los cambios de números de copias (en adelante CNC) del gen TOP2A, tanto de eliminaciones como de multiplicaciones, son predictivos al resultado de la quimioterapia basada en antraciclina (Coon 2002; Di Leo 2002, Park 2003; Knoop, 2003, Harris 2004).

Un importante modo de acción para muchos agentes citotóxicos es la inducción de daño del ADN, y la reparación del ADN puede conducir a resistencia general. El principal modo de acción de la ciclofosfamida es la generación de formaciones de enlaces transversales del ADN que se pueden reparar directamente o por reparación de excisión de nucleótidos. La reparación por excisión de nucleótidos constituye una parte central al intercambio de metabolitos de fluorouracilo El gen D Xeroderma pigmentoso (en adelante XPD) está involucrado tanto en la reparación global del ADN como en la versión dependiente de transición de la reparación por excisión de nucleótidos (Reed 1998; Readon 1999; y la excisión del grupo de complementación cruzada 1 (en adelante ERCC1) es otro elemento crítico en este mecanismo (Jiang 1999).

La timidilato sintasa (en adelante TS para la proteína y TYMS para el gen) usa 5,10 tetrahidrofolato (en adelante MTHF) como un co-factor en la regulación del monofosfato de timidina (en adelante dTMP) que es típico en la replicación y reparación del ADN. El valor predictivo y de pronóstico de la expresión de TS en tejido tumoral ha

sido el tema de numerosos estudios, y una proteína rica en TS parece predecir la resistencia a los inhibidores de TS en pacientes con cáncer de colon avanzado (Leicman 1998; Lenz 1998; Paradiso 2000). Los resultados son menos claros en el ámbito complementario, donde los marcadores genéticos parecen tener valor predictivo (Watanabe 2001; Iacopetta 2001; Wang 2004), mientras que los resultados de la inmunohistoquímica (en adelante IHC) son contradictorios (Takenoue 2000; Edler 2002; Allegra 2003). Muy probablemente, el dihidrofolato reductasa (en adelante DHFR) es el principal objetivo celular del metotrexato, y a menudo la multiplicación de DHFR se ha correlacionado con la resistencia tanto al metotrexato como al fluorouracil en sistemas experimentales (Chu 1990; Banerjee 2002). No se ha aclarado todavía la importancia de la timidina fosforilasa (en adelante TP, alias de la timidina timidina, en adelante ECGF1), de la deshidrogenasa de dihidropirimidina, en adelante DPD, alias DPYD) quinasa de timidina (en adelante TK) y metilendetrahidrofolato reductasa (en adelante MTHFR).

Inhibidores de síntesis de ADN

La síntesis y la función normal del ADN y del ácido ribonucleico (en adelante ARN) se inhibe mediante fluoropirimidina 5-fluorouracilo, (en adelante 5-FU), por medio de la inhibición de enzimas esenciales, principalmente timidilato sintasa (TS), en el proceso biosintético y a partir de la incorporación de fluoronucleótidos en las dos macromoléculas. Se han desarrollado varios profármacos inactivos de 5-FU, que se han diseñado para permitir la absorción intacta a través del canal gastrointestinal y que se convierten subsiguientemente en el 5-FU por transformación metabólica en el tumor o en el hígado. Se encuentran en desarrollo varias fluoropirimidinas orales y se ha demostrado la actividad de la capecitabina y del uracil/Ftorafur (en adelante UFT) en la fase II, pero se están esperando los resultados de los ensayos de la fase III (M Malet Martino 2002). Se han demostrado en un estudio farmacodinámico la selectividad de tumor y la conversión de la capecitabina preferentemente en tejido de tumor, con una concentración de FU 3,2 veces mayor en tumor en comparación con el tejido normal, y concentraciones 21 veces mayores en tejido de tumor en comparación con el plasma (J Schüller 2000). La quimioterapia citotóxica con inhibidores de síntesis de ADN (como el 5-FU) ha demostrado actividad en un amplio intervalo de tumores malignos en etapas incipientes y tardías de la enfermedad. Se ha observado actividad tanto cuando se han administrado productos 5-FU o productos análogos individualmente como en combinaciones con otros agentes. La importancia de los cambios de número de copias de genes como marcadores predictivos se acaba de mostrar justo recientemente para inhibidores de topoisomerasa. Los cambios de número de copias del gen TOP2A sirven como un ejemplo de la importancia de eliminaciones y multiplicaciones en la predicción del resultado de un tratamiento basado en antraciclinas. Las antraciclinas se han venido usando en los medios clínicos desde los años 60. La doxorubicina se produce mediante estreptomicas, y en un principio se consideró que era un antibiótico. La epirubicina es un fármaco semisintético de segunda generación, con un perfil terapéutico más favorable en cuanto a cardio-toxicidad, estomatitis y trombocitopenia (D Ormrod 1999). Tras 30 años de uso clínico, a principios de la década de los 90 llegó a quedar claro que una inhibición de la proteína II α topoisomerasa (en adelante topo IIa) es la principal acción citotóxica de las antraciclinas (AV Gudkov 1993). La topo IIa está involucrada en la replicación, transcripción y translación del ADN. La topo IIa introduce una rotura doble provisional del ADN, lo que permite el desarrollo de la doble hélice del ADN. A continuación de la fijación de epirubicina a la topo IIa, el complejo de topo IIa se estabiliza y la rotura del ADN se convierte en irreversible (JM Berger 1996). Las antraciclinas están activas durante todas las fases del ciclo celular, pero son lo más dinámicas posible en las células que se multiplican (AJ Coukell 1997).

Los fármacos tales como, por ejemplo, 5-FU y metotrexato interfieren con las etapas enzimáticas fundamentales en las síntesis de los ácidos nucleicos. Inhiben los procesos biosintéticos esenciales y se incorporan a macromoléculas tales como el ADN y el RDN, y por tanto interrumpen su función normal. El 5-FU fue introducido en 1957, y todavía es una parte de los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento complementario del cáncer de colon y de mama. Los primeros tratamientos de quimioterapia combinada para cáncer de mama avanzado incluían antimetabolitos y se introdujeron hace más de cuatro décadas (EM Greenspan 1963). A continuación de los primeros resultados de un ensayo aleatorizado en cáncer de mama avanzado (RG Cooper ASCO 1969;10) se incluyeron el metotrexato y el 5-FU en varios ensayos posteriores complementarios (EBCTCG 1998).

Los antimetabolitos son ejemplos tempranos de agentes anti-cáncer diseñados racionalmente (C. Heidelberg 1957). La visión predominante sobre el objetivo principal de la acción celular del metotrexato (en adelante MTX) es la enzima dihidrofolato reductasa (en adelante DHFR), y la multiplicación de la DHFR es una de las formas más comunes de la resistencia del metotrexato observada en sistemas experimentales (E Chu 1990). La multiplicación de la DHFR ha estado también en relación de asociación con la resistencia al 5-FU en sistemas experimentales (D Banerjee 2002; U Löhn 1996). Otra posible explicación del efecto del MTX es la inhibición de partes esenciales de los mecanismos de transporte de glucosa (KP Fung 1995).

Las principales indicaciones para el uso del 5-FU además de en el cáncer de mama son los cánceres de pulmón, próstata, colorrectales, cabeza y cuello, páncreas, vejiga, estómago, esófago e hígado.

La clasificación de los tumores se basaba, hasta hace una década, exclusivamente en la histología, y más recientemente se ha añadido la inmunohistoquímica. Sin embargo, el patrón de coloración es insuficiente para reflejar los múltiples eventos moleculares subyacentes que caracterizan a las células del cáncer vistas en el microscopio. Mediante el estudio de miles de genes de una vez, usando microchips de ADN, es posible caracterizar el distintivo individual de cada tumor en particular.

Con el fin de perfeccionar la estratificación de los pacientes para conseguir el tratamiento óptimo, sería de un gran beneficio para el paciente seleccionar factores, que pudieran predecir la respuesta de los tratamientos quimioterapéuticos específicos. Un fármaco terapéutico que se ha utilizado ampliamente en el cáncer de mama, así como en otros tipos de cáncer, es el 5-fluorouracil (en adelante 5-FU).

Por tanto, a la vista de los problemas anteriormente mencionados, es muy conveniente desarrollar métodos y medios para analizar la capacidad del paciente a la respuesta a un tratamiento quimioterapéutico específico, tal como el tratamiento con 5-FU, con el fin de aumentar el bienestar de los pacientes de cáncer y de evitar efectos colaterales desagradables a dichos pacientes de cáncer, tales como por ejemplo los pacientes con cáncer de mama. Asimismo, se necesita una identificación de los pacientes con tumores resistentes al tratamiento con 5-FU antes de la iniciación de la terapia, con el fin de evitar efectos colaterales desagradables de dicho tratamiento con 5-FU. En este sentido, el presente invento satisface estas necesidades e intereses.

Breve resumen del invento

En un primer aspecto, el presente invento se refiere a una composición que comprende al menos dos sondas que se fijan al menos a dos marcadores del camino del 5-FU.

En un segundo aspecto, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de al menos dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, comprendiendo las etapas: a) detectar una señal de cada uno de al menos dos marcadores del camino del 5-FU en dicha muestra aislada usando al menos dos sondas que se fijan a los al menos dos marcadores del camino del 5-FU; b) determinar el nivel basándose en las al menos dos señales detectadas.

En un tercer aspecto, el presente invento se refiere al uso de una composición para determinar el nivel de al menos dos marcadores seleccionados del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente.

En un cuarto aspecto, el presente invento se refiere a un equipo para determinar el nivel de al menos dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende: a) una composición que comprende al menos dos sondas que se fijan al menos a dos marcadores del camino del 5-FU; y b) instrucciones para usar la composición.

En un quinto aspecto, el presente invento se refiere a una composición que comprende al menos una sonda de ADN que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU.

En un sexto aspecto, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, que comprende las etapas de: a) detectar una señal de al menos un marcador del camino del 5-FU en dicha muestra aislada usando al menos una sonda de ADN que se fija al como mínimo un marcador del camino del 5-FU; y b) determinar el nivel basándose en la como mínimo una señal detectada.

En un séptimo aspecto, el presente invento se refiere al uso de la composición que comprende al menos una sonda de ADN para determinar el nivel de al menos un marcador seleccionado del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente.

En un octavo aspecto, el presente invento se refiere a un equipo para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende: una composición que comprende al menos una sonda de ADN que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU, y b) instrucciones para usar la composición.

En un noveno aspecto, el presente invento se refiere a una composición que comprende al menos una sonda que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU y al menos una sonda que se fija a un marcador de referencia, en el que al menos una de dichas sondas es una sonda de ADN.

En un décimo aspecto, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, que comprende las etapas siguientes: a) detectar una señal de al menos un marcador del camino del 5-FU usando al menos una sonda que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU; b) detectar una señal del al menos un marcador de referencia usando al menos una sonda que se fija al como mínimo un marcador de referencia, en donde una de dichas sondas es una sonda de ADN; c) determinar el nivel del como mínimo un marcador del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal de dicho al menos un marcador del camino del 5-FU y una señal de dicho al menos un marcador de referencia.

En un undécimo aspecto, el presente invento se refiere a una composición que comprende al menos una sonda para determinar el nivel de al menos un marcador seleccionado del camino del 5-FU y al menos una sonda para determinar el nivel del como mínimo un marcador de referencia en una muestra aislada de un paciente, en donde una de dichas sondas es una sonda de ADN.

En un duodécimo aspecto, el presente invento se refiere a un equipo para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende: a) una composición que comprende al menos una sonda que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU y al menos una sonda que se fija a un marcador de referencia, en el que una de dichas sondas es una sonda de ADN; y b) instrucciones para usar la composición.

En particular, el nivel del marcador que se va a determinar es un indicativo de una anomalía cromosómica tal como una eliminación o una multiplicación.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el metabolismo del 5-FU; la letra “a” muestra el camino del 5-FU, y la letra “b” muestra una visión de conjunto simplificada de 4 marcadores seleccionados para la detección de sensibilidad del 5-FU.

15 La Figura 2 ilustra los caminos metabólicos del fármaco Xeloda al 5-FU y la estructura del 5-FU.

La Figura 3 ilustra los clones seleccionados para detección por hibridación *in situ* con fluorescencia (en adelante FISH).

20 La Figura 4 ilustra las sondas de referencia. Las sondas de referencia de TP y DTP se pueden encontrar en el catálogo de Dako.

La Figura 5 ilustra la hibridación del DPYD y una sonda específica de locus de ADN situada en el mismo brazo telómero al DPYD (sonda de referencia). (A) muestra el área cubierta por las sondas de DPYD y de referencia, respectivamente. La hibridación de las sondas a la metafase se extiende desde (B) células sanguíneas periféricas normales o (C) línea de células BT20 de quimiosensibilidad del cáncer de mama y (D) hasta el tejido tumoral.

La Figura 6 ilustra la hibridación de DHFR y una sonda específica de locus de ADN situada en el brazo contrario que el gen DHFR (sonda de referencia). (A) muestra el área cubierta por la hibridación de las sondas hasta la metafase que se extiende desde (B) células sanguíneas periféricas normales o (C) línea BT20 de quimiosensibilidad de células de cáncer de mama y (D) hasta el tejido tumoral.

La Figura 7 ilustra la hibridación de una sonda de TYMS y de una sonda específica centrómera de ADN/pan-nitroanilina (en adelante PAN) situada en el mismo cromosoma que el gen TYMS(sonda de referencia). (A) muestra el área cubierta por la hibridación de las sondas hasta la metafase, que se extiende desde (B) células sanguíneas periféricas normales o (C) línea BT20 de quimiosensibilidad de células de cáncer de mama y (D) hasta el tejido tumoral.

La Figura 8 muestra la hibridación de una sonda de ECGF1 y de una sonda de locus específica de ADN situada en el mismo brazo centrómero al gen ECGF1 (sonda de referencia). (A) muestra el área cubierta por la hibridación de las sondas hasta la metafase, que se extiende desde (B) células sanguíneas periféricas normales o (C) línea BT20 de quimiosensibilidad de células de cáncer de mama y (D) hasta el tejido tumoral.

Descripción detallada del invento

45 A continuación se describe el presente invento. Para los fines de la interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular incluirán también el plural, y viceversa.

Definiciones

50 “Marcadores”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula que se pueda usar para identificar a otras moléculas que porten secuencias o estructuras complementarias.

55 “Marcador del camino del 5-FU” tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier marcador involucrado en la secuencia de reacciones químicas que afecten al metabolismo del 5-FU involucrado cuando se trate a un paciente con 5-Fluorouracil (en adelante 5-FU).

60 “Marcador de referencia”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier marcador que no sea idéntico al marcador que interese.

“Sonda”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula o composición de moléculas que podrían fijarse a un marcador o a la región (o regiones) a detectarse o visualizarse.

65 “Sonda de bloqueo”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier sonda capaz de bloquear, suprimir o prevenir la interacción de un marcador con otras sondas o moléculas.

ES 2 350 648 T3

“Secuencia de repetición aleatoriamente distribuida”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualesquiera secuencias de repetición que ocurran de forma aleatoria dentro de todos, o esencialmente de todos los ácidos nucleicos genómicos de un organismo.

5 “Ácido nucleico”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula de una secuencia de bases de nucleótidos/bases nitrogenadas naturales que contengan oligómeros, polímeros o segmentos de polímeros, que tengan una cadena principal formada exclusivamente de nucleótidos, o de análogos de los mismos.

10 “Análogo de ácido nucleico”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula que no es una molécula de ácido nucleico natural o que se compone de al menos un nucleótido modificado, o una sub-unidad obtenida directamente de una modificación de un nucleótido.

15 “Nucleótido”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquiera de entre varios compuestos que consiste en un azúcar de ribosa o de desoxirribosa, unido a una base de purina o de pirimidina y a un grupo fosfato. Los nucleótidos son las sub-unidades estructurales básicas de los ácidos nucleicos.

“Región sin codificación”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier región cromosómica que no codifique un producto de gen.

20 “Anomalía de gen”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualesquiera cambios en el ADN.

“Entidad detectable”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier molécula o cualquier complejo de moléculas que son detectables.

25 “Número de copia de gen”, tal como se usa en la presente memoria, el número de un gen o de parte de un gen presente en un cromosoma. Si un gen o una parte de un gen se multiplica, puede encontrarse en dos o más copias, una el mismo cromosoma u otro cromosoma.

30 “Análisis de gen”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier análisis que pueda ser adecuado para analizar genes.

“Nivel”, tal como se usa en la presente memoria, significa determinar si la sonda se fija de tal manera que indique un número de copia de gen normal o anormal.

35 “Tratamiento con CMF”, tal como se usa en la presente memoria, significa un tratamiento que utilice ciclofosfá-mida, metotrexato y 5-fluorouracil, ya sea simultáneamente o en secuencia.

40 “Paciente”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier mamífero, incluyendo el ser humano, que padece o parezca que padece una enfermedad.

“Al menos uno”, tal como se usa en la presente memoria, significa uno o más, es decir, 1,2,3,4,5,6,7,8,9, etc.

45 Como se ha indicado anteriormente, se sabe que los cambios genómicos, transcripcionales o traslacionales se producen tras el desarrollo de un cáncer. Las ganancias y pérdidas en el nivel genómico pueden resultar en una expresión de genes y unos niveles de proteínas altos o bajos, donde ambos casos pueden dar lugar a una reducción en sensibilidad. El presente invento descubre que la determinación de anomalías de genes en genes particulares dará lugar, sorprendentemente, a una predicción más precisa del efecto del tratamiento con el 5-FU.

50 En una realización de las composiciones según se ha descrito anteriormente, las sondas son sondas de ácido nucleico, sondas de un análogo de ácido nucleico, o una combinación de las mismas. En otra realización, las sondas son sondas de ADN, sondas de un péptido de ácido nucleico (en adelante APN) o una combinación de las mismas.

55 En la Figura 1 se ha ilustrado esquemáticamente el camino del 5-FU. La parte a presenta la estructura del 5-fluorouracilo (5-FU) y su degradación en dihidrofluoracilo (en adelante DHFU) no tóxico por la acción de la dihidro-pirimidina deshidrogenasa (en adelante DPD), ambas produciéndose en el hígado y dentro de la célula cancerosa. Los tres metabolitos activos principales son el monofosfato de fluorodeoxiuridina (en adelante FdUMP), el trifosfato de fluorodeoxiuridina (en adelante FdUTP), y el trifosfato de fluorouridina (en adelante FUTP). Un mecanismo de la activación del 5-FU es la conversión a monofosfato de fluorouridina (en adelante FUMP), ya sea directamente por la acción del orotato fosforribosiltransferasa (en adelante OPRT) con fosforribosil pirofosfato (en adelante PRPP) como cofactor, o indirectamente vía fluorouridina (en adelante FUR) a través de la acción secuencial de la uridina fosforilasa (en adelante UP) y de la uridina quinasa (en adelante UK). El FUMP luego se fosforila a fluoridina difosfato (en adelante FDUP) que, o bien se puede fosforilar adicionalmente a FUTP, o bien convertirse a fluorodesoxiuridina difosfato (en adelante FdUDP) mediante el ribonucleótido reductasa (en adelante RR). A su vez, el FdUDP se puede fosforilar o desfosforilar para generar los metabolitos activos de FdUDP para la incorporación del ADN y FdUMP para la inhibición del timidilato sintasa (en adelante TYMS), respectivamente. Otro camino de activación implica la conversión catalizada de la timidina fosforilasa (en adelante TY) del 5-FU a fluorodesoxiuridina (en adelante FUDR),

que luego se fosforila por la timidina quinasa (en adelante TP) a FdUMP (Longley 2003). La parte b muestra una visión de conjunto simplificada de los 4 marcadores seleccionados para la detección de sensibilidad del 5-FU, y aclara los detalles de la inhibición de TYMS, donde la desoxiuridina monofosfato (en adelante dUMP) no se convierte a desoxitimina monofosfato (en adelante dTMP) tras la inhibición d FduMP, y por tanto no se forma desoxitimina trifosfato (en adelante dTTP) para la replicación y reparación del ADN. El folato reducido en la forma de 5,10 metilen tetrahidrofolato (en adelante CH₂-THF) es el TYMS donante de metilo, y el dihidrofolato reductasa (en adelante DHFR) cataliza parte del proceso de reducción. Adaptado de (Peters 2002).

La sondas de ácido nucleico se podrían construir de moléculas de ácido nucleico naturales, tales como los ácidos oligodesoxinucleicos (por ejemplo el ADN), ácidos oligorribonucleicos (por ejemplo el ARN, el mARN, el siARN), y fragmentos de los mismos. Las sondas de los análogos de ácidos nucleicos se podrían fijar al mismo marcador que las sondas de los ácidos nucleicos y se podrían construir de moléculas naturales modificadas de ácidos nucleicos o podrían ser moléculas sintéticas. Un ejemplo sin carácter limitativo de una molécula natural modificada es el ácido nucleico cerrado (en adelante ANC), y ejemplos de moléculas sintéticas podrían ser moléculas basadas en poliamidas tales como, por ejemplo, el péptido de ácido nucleico (en adelante PAN), u otros análogos de ácidos nucleicos o imitadores de ácidos nucleicos.

Las sondas de los ácidos nucleicos podrían tener cualquier longitud adecuada para detectar el objetivo. Usualmente, una sonda se construye a partir de fragmentos más pequeños de tamaños variables (por ejemplo, desde aproximadamente 50 bp hasta alrededor de 500 bp cada uno) de tal manera que la sonda abarque en total desde aproximadamente 30 kb hasta alrededor de 2 Mb. La sonda comprenderá usualmente tanto fragmentos únicos como fragmentos repetidos. Estos fragmentos repetidos, por ejemplo, se pueden retirar o bloquear.

Las sondas de los análogos de ácidos nucleicos, tales como el APN, son sondas más cortas y bien definidas, que típicamente comprenden desde aproximadamente 10 hasta 25 bases de nucleótidos/bases nitrogenadas. Una sonda de AP se compone usualmente de varias sondas individuales, cada una de las cuales tiene de 10 a 25 unidades de base de nucleótido/base nitrogenada.

Las sondas podrían ser también sondas de proteínas construidas de moléculas de proteínas tales como, por ejemplo, anticuerpos, receptores, ligandos, factores de crecimiento, proteínas de fijación de ADN o cualquier otra proteína que pueda fijarse a un marcador de interés. La sonda de ácido nucleico, la sonda de un análogo de ácido nucleico y la sonda de proteína se podrían emplear en análisis separados o combinadas en el mismo análisis. Un ejemplo sin carácter limitativo podría ser el empleo de dos sondas de ácido nucleico para la detección del marcador de interés y el empleo d una sonda de un análogo de ácido nucleico o de una sonda de proteína para la detección del marcador de referencia.

El etiquetado de las sondas se podría realizar con diferentes métodos por medio de, por ejemplo, procesos enzimáticos o químicos. Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para etiquetar sondas como las que se usan en este invento.

El marcador podría ser un gen, un fragmento de gen, incluyendo fragmentos fundidos o superpuestos de un gen, o bien un gen con regiones de flanco, donde las regiones de flanco son secuencias de ADN que se extienden en cualquiera de los dos lados de un locus o de un gen. Tales regiones de flanco podrían ser de aproximadamente 500.000 bp en cada lado del gen. Un ejemplo de clones para el marcador de TYMS que comprende regiones de flanco de aproximadamente 500.000 bp son: CTD-2304H22; RP11-841C6; RP11-464L8; RP11-631M21; CTD-2573M23; CTD-3162G8G8; CTD-3232F7; RP11-170J2; RP11-252G7; RP11-699P24; RP11-805B24; CTD-3237F7; RP11-230P17; CTD-2359H18; RP11-1120H10; CTD-2509F1; RP11-431C15; RP11-36106; RP11-1066C16; CTD-2359H18; RP11-1066G14; RP11-1034P14; RP11-1034P22; CTD-3114P12; RP11-787^a12; RP11-787C12; CTD-3149J12; RP11-195P12; CTD-2595P20; CTD-2168E8; RP11-621G7; CTD-3023M8; RP11-748B19; CTD-2064P19; RP11-461K16; RP11-630F5; CTD-3021E11; CTD-302817; RP11-1021K17; RP11-729G15; RP11-10415; RP11-595D13; RP11-43607; CTD-2646F10; RP11-104^a15; CTD-2024F12; CTD-2169M24; RP11-140D22; RP11-848^a7; CTD-2060D6; CTD-2298K5; CTD-3022J6; RP11-29P22; RP11-790010; RP11-89P6; RP11-91I8; RP11-694N4; RP11-752I11; RP11-324G2; CTA-186D6; RP11-88C10; RP11-608N7; RP11-732L14; RP11-324G2; RP11-70501; RP11-839023; RP11-683J11; RP11-815L4; RP11-720L2; RP11-179K3; RP11-778P8; RP11-823F8; RP11-791M5; RP11-672L10; RP11-827M19; RP11-19J12; RP11-607C2; RP11-287C19; CTD-3214N24; RP11-1035E2; CTD-2004F18; CTD-3155L20; CTD-2281^a22; CTD-3231L23; CTD-2014P18; RP11-1150C18; RP11-170J1; CTC-79019; RP11-76H24; RP11-48121; CTC-775^a10; CTD-2034018; RP11-431C11; RP11-50C2; CTD-2208G7; CTD-2345G8; RP11-797C9; RP11-133D9; RP11-655D4; RP11-14P20; RP11-103B23; RP11-806L2; RP11-145B19; CTD-2593J12; CTD-321517; RP11-381D10; RP11-76908; RP11-95H4; RP11-552E8; RP11-914P23; RP11-904F1; RP11-164C14; CTD-3040^a20; RP11-1152E8; CTD-3065D24; CTD-3243617; CTD-3243D18; CTD-3243D19; CTD-3113H2; RP11-1120E20; CTD-3046I16; RP11-635J20; RP11-114M20; RP11-1018N4; CTA-344N3; RP11-137K7; RP11-689C9; RP11-1005B18; RP11-126M20; CTD-213413; RP11-701F4; CTD-3236J23; CTD-3047L19; CTD-3240G16; CTD-3148N6; RP11-22J24; RP11-1094D2; CTD-2182K19; RP11-107^a13; RP11-134P22; RP11-636P15; RP11-78F17; CTD-2221P22; CTD-2011N14; RP11-626B11; y RP11-27K24. Un marcador podría ser una región cromosómica que codifique un gen o que no codifique un gen. Un marcador podría ser una molécula obtenida de un gen tal como, por ejemplo, un ARN como el mARN, el siARN, o una proteína.

El átomo de hidrógeno situado en la posición 5 del uracilo se ha sustituido en el 5-FU por fluorina, y esto da lugar a como mínimo tres mecanismos de acción diferentes como se ha representado en la Figura 1. Por semejanza al UTP, el 5-FU se incorpora en el ARN mediante polimerasas del ARN, y el 5-FU inhibe la síntesis del ADN a través de la inhibición de timidilato sintasa (TYMS o TS). Se han propuesto también la incorporación del 5-FU en el ADN y la alteración de la función de membrana como posibles mecanismos citotóxicos.

La inhibición del TYMS se ha sugerido como el principal resultado citotóxico de la exposición prolongada a bajas dosis de 5-FU, mientras que un efecto mediato del ARN podría ser el resultado principal de la administración de una inyección intravenosa (C Aschele 1992; AF Sobrero 1997). Se ha estudiado ampliamente el valor de pronóstico y predictivo del TYMS, y parece que unos niveles altos de TYMS predicen resistencia a los inhibidores de TYMS en el cáncer colorrectal avanzado (CG Leichman 1997; HJ Lenz 1998; A. Paradiso 2000). Parece que los marcadores genéticos del TYMS son predictivos para el 5-FU (T Watanabe 2001; H Elsaleh ASCO 2001, 493), mientras que los resultados del IHC son menos claros (T Takenoue 2000; D Edler 2002; CJ Allegra ASCO 2001, 491).

La dihidropirimidina dehidrogenasa (en adelante DPD ó DPYD) es una enzima catabólica de pirimidina y es la etapa de limitación de tasa inicial en el camino del catabolismo del uracilo y de la timina. Cataboliza aproximadamente un 80% del 5-FU, a un compuesto no tóxico (<http://genome.ucsc.edu/>, R.B. Diasio Clinical Pharmacokinetics, 16: 215-237, 1989). En relación con la sensibilidad del 5-FU, varios estudios han mostrado una correlación inversa, mientras que un bajo nivel de DPD parece predecir un grado de respuesta. Mediante inmunotinción esto se ha mostrado en el cáncer de mama (J. Horiguchi British Journal of Cancer, 86(2) 222-225, 2002), aunque una expresión coherente de ARN en cáncer colorrectal (D. Salonga Clinical Cancer Research, 6 (4):1322-1327, 2002) un cáncer celular de transición (Y. Hirano Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 51 (1) 29-35, 2003), y líneas gastrontestinales (Y. Kirijara Interantional Journal of Oncology, 14 (3) 551-556, 1999) demostraron la misma significación. En contraste con lo anterior, Fujii y colaboradores no encontraron una relación significativa de actividad de DPD en el cáncer colorrectal (R. Fujii Int J Clin Oncol, 8: 72-78, 2003), y similarmente Jacob y colaboradores no encontraron correlación en expresión de mRNA de DPD y respuesta del 5-FU (C. Jacon Journal of Pathology, 204 (5): 562-568, 2004). En un estudio de cánceres colorrectales se encontró una expresión de ARN de DPD más alta en el tejido normal en comparación con el tejido cancerosos (E.A. Clinical Cancer Research, 11(7) 2612-2619, 2005). El gen DPD está situado en 1p21, y los estudios de hibridación genómica comparativa (en adelante CGH) del cáncer de mama han demostrado una frecuencia de pérdidas en el meningioma inducido por radiación (en adelante 1p11) -y en la enfermedad arterial oclusiva (en adelante 1p31) (P. O'Connell Breast Cancer Research and Treatment, 78 (3): 347-537, 2003). Por tanto, se produce un agotamiento de DPD en varios cánceres que podría causar potencialmente un aumento de sensibilidad hacia el tratamiento con 5-FU.

La timidina fosforilasa (TP) codificada por el gen ECGF1 cataliza la fosforilación reversible de la timidina, desoxiguridina y sus análogos. La TP tiene también propiedades angiogénicas, e impide que las células tumorales entren en apoptosis (muerte celular programada) (H Ishitsuka 2000). La expresión del TP es elevada en muchos tumores sólidos incluyendo carcinomas *in situ* e invasivos (lee 1999; A. Kanzaki 2002). La expresión del TP se correlaciona con el crecimiento y la invasión agresivos (Y Takebayashi 1996) y los estudios preclínicos han demostrado una correlación entre la resistencia a la fluoropirimidina y niveles altos del TP (B van Triest 2000).

El dihidrofolato reductasa (DHFR) es importante en la proliferación de células, donde cataliza la conversión del dihidrofolato (DHF) a tetrahidrofolato (THF). El THF se requiere para la biosíntesis de purinas como precursor del CH₂-THF para la síntesis de timina (G.J. Peters Biochimica Et Biofísica Acta-Molecular Basis of Disease, 1587 (2-3), 194-205, 2002, D.B. Longley Nature Reviews Cancer, 3(5) 330-338, 2003). La disminución del DHFR por inhibición de antifolato interfiere con la biosíntesis de timidilato, y múltiples estudios se han concentrado en la consecuencia del agotamiento del DHFR tras la exposición al metotrexato (E. Chu Journal of Biological Chemistry, 256 (15) 8470-8478, 1990). Otros estudios tienen autorregulación translacional, mutaciones y multiplicaciones correspondientes como un mecanismo de resistencia contra el metotrexato en la leucemia, revisados en (D. Banerjee Biochimica Et Biofísica Acta-Molecular Basis of Disease, 1587 (2-3), 164-173, 2002). No se ha estudiado intensamente una relación directa entre la sensibilidad del 5-FU y la del DHFR, pero Backus y colaboradores han demostrado que las líneas de células cancerosas desarrolladas en un entorno bajo en folato tienen una sensibilidad mayor al 5-FU, por lo que la actividad del TYMS se puede vincular al nivel de folato (H.H.J. Backus International Journal Of Cancer, 87 (6) 771-778, 2000). Un estudio de la expresión del ARN demostró que el DHFR era más alto expresado en tejido tumoral comparado con el tejido normal en el cáncer colorrectal (E.A. Kidd Clinical Cancer Research, 11 (7): 2612-2619, 2005). Los estudios de CGH del cáncer de mama, revisados en (P. O'Connell Cancer Research and Treatment, 78 (3): 347-357, 2003) demostraron una frecuencia de pérdidas del 45% en 5q, donde está situado el DHFR, y con el folato reducido es un co-sustrato para el TYMS, los cambios en el DHFR podrían interferir con la sensibilidad al 5-FU.

La timidinaquinasa (TK1 alias TK) cataliza la fosforilación de timidina a desoxitimidina monofosfato El gen está situado en 17q25.2q25.3. El gen contiene muchas inserciones no codificadas y numerosas secuencias de Alu. La secuenciación de nucleótidos indicaba una considerable conservación evolutiva del gen TK. La secuenciación de todo el gen humano de TK de 12.9 kb (Flemington 1987) y las regiones de flaqueo mostraron que el gen de TK se compone de 7 exones. En la región de flaqueo 5 prima del gen TK (Sauve 1990) está situada una posición de las secuencias de nucleótidos de tal manera que puede actuar como zona de fijación para los factores de transacción así como potenciales secuencias *in cis*. Estas últimas se compararon con el activador del gen humano antígeno nuclear de células en proliferación (en adelante PCNA) Tanto el TK como el PCNA se expresan con carácter máximo en el límite G1/S del ciclo celular.

La homeostasis de folato intracelular depende del 5,10 metilenetetrahidrofolato reductasa (en adelante MHTFR), una enzima crítica en el metabolismo del folato que cataliza la conversión irreversible del 5-metiltetrahidrofolato. El sustrato 5,10-metilene tetrahidrofolato se requiere para la síntesis del ADN y para mantener el equilibrio del agrupamiento de nucleótidos, mientras que el 5-metiltetrahidrofolato se requiere para reacciones de metilación, incluyendo la metilación de homocisteína a metionina y el mantenimiento de los patrones de metilación del ADN (OMIM, 607093).

La enzima citoplásmica 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa, MTR) cataliza la transferencia de un grupo metilo desde el metiltetrahidrofolato a la homocisteína para generar tetrahidrofolato y metionina a partir de la homocisteína. El gen se localiza en el cromosoma 1q43.

Se ha propuesto un polimorfismo de C677T para modular el efecto citotóxico del 5-FU y del metotrexato (MTX), porque los modos de acción del 5-FU y del MTX dependen críticamente de la composición celular de los folatos. Sohn y colaboradores (2004) demostraron que las líneas de células con mutante C677T MTHFR habían disminuido la actividad del MHTFR, cambiado la distribución intracelular del folato, acelerado la tasa de crecimiento, y aumentado la actividad del TYMS. En dos líneas de células de cáncer de mama y de colon, respectivamente, la mutación del C677T aumentó la quimiosensibilidad al 5-FU, pero disminuyó la quimiosensibilidad de la línea de células de mama al MTX. Basándose en estas observaciones preliminares *in vitro*, se propone que los cambios de número de copia (CNC) de los genes MTHFR y TK sean predictivos para el resultado del paciente cuando se le trate con 5-FU, MTX o con regímenes combinados que contengan estos fármacos, por ejemplo, tratamiento con CMF.

En una realización, la composición comprende al menos dos sondas que fijan al menos a dos marcadores del camino del 5-FU seleccionados del grupo que consiste en timidilato sintasa ((TYMS), dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina fosforilasa (TP), dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), metilentetrahidrofolato reductasa (MTH-FR) y timidina quinasa (TK) y 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferasa (metionina sintasa, MTR). En una realización de la composición acorde con el invento, dichos al menos dos marcadores del camino del 5-FU son TYMS y DHFR. En otra realización, la composición acorde con el invento comprende al menos tres sondas que se fijan a como mínimo tres marcadores del camino del 5-FU. Un ejemplo sin carácter limitativo de dichos tres marcadores son, por ejemplo, TYMS, DHFR y TS.

En una realización, la composición acorde con el invento comprende al menos una sonda de ADN que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU seleccionado del grupo consistente en TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MTR. En otras realizaciones, la composición comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sondas que se fijan a marcadores del camino del 5-FU, en donde al menos una o más o todas las sondas son sondas de ADN. El marcador (o marcadores) podrían ser independientemente TYMS, DHFR, TP, SPD, MTHFR y TK.

En una realización adicional, la composición comprende al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador de referencia.

En una realización, la composición acorde con el invento comprende al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador del camino del 5-FU seleccionado del grupo consistente en TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MTR, y al menos una sonda que se fija a un marcador de referencia, en donde al menos una de dichas sondas es una sonda de ADN. En otras realizaciones, dicha composición comprende dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete sondas que se fijan a marcadores del camino del 5-FU. El marcador (o marcadores) podrían ser independientemente TYMS, DHFR, TP, SPD, MTHFR y TK.

Un marcador de referencia es un marcador tal como se ha descrito anteriormente que se pueda seleccionar como marcador de referencia porque no es el marcador de interés. Un marcador de referencia se incluye algunas veces cuando haya que determinar un nivel relativo de un marcador. Por ejemplo, cuando hay que calcular un número relativo de copias de gen en una muestra, debe identificarse la ploidía de la célula, y por tanto se podría usar un marcador que indicase el número de cromosomas que portan el gen del marcador de referencia. Los marcadores de referencia utilizados podrían ser un gen marcador de referencia tal como un centrómero u otro gen o región cromosómica, o bien podría ser una proteína de marcador de referencia tal como un centrosoma u otra proteína. Un marcador de referencia podría ser también un marcador de referencia de ARN o cualquier otro marcador de referencia que pueda servir como tal marcador de referencia.

En una realización del invento, dicho al menos un marcador de referencia de la composición se podría seleccionar de cualquier marcador no comprendido en el camino del 5-FU. En otra realización del invento, dicho al menos un marcador de referencia de la composición es una secuencia de ácidos nucleicos de una región sin codificación de un cromosoma. En una realización, la sonda que se fija al marcador de referencia es una sonda de ADN o de PDN, o una combinación de ambas.

En una realización del invento, dicho al menos un marcador de referencia es un centrómero (en adelante Cen). Podría ser también un producto de gen, tal como una proteína de centrosoma.

En una realización del invento, dicho al menos un marcador de referencia de la composición se selecciona del grupo que consiste en Cen 1, Cen 2, Cen 5, Cen 10, Cen 12, Cen 15, Cen 18 y Cen 22.

Un gran componente del genoma humano comprende secuencias de repeticiones que pueden causar tinción de fondo. Las repeticiones más comunes son los elementos nucleares cortos y largos intercalados (en adelante SINE y LINE), respectivamente, donde las repeticiones más abundantes en el primero son repeticiones de Alu (70). El fondo se puede suprimir o bloquear mediante la adición de sondas sin etiquetar que se fijan a la secuencia de repeticiones aleatoriamente distribuida. Una solución es el desarrollo de moléculas de ácidos nucleicos o moléculas de análogos de ácidos nucleicos como el APN dirigidas contra secuencias específicas de repetición aleatoriamente distribuidas. Otra solución es el uso de una agrupación de ADN humanos sin etiquetar para bloquear, tal como, por ejemplo, el ADN de Cott o el ADN humano total. Ambas soluciones se podrían combinar para obtener una máxima supresión del fondo. Podría ser ventajoso usar una combinación de sondas de bloqueo de ADN y PDN.

En una realización, la composición comprende además una sonda de bloqueo capaz de bloquear, suprimir o prevenir la interacción de un marcador con otras sondas. Dichos marcadores a bloquear podrían ser uno o más segmentos de una secuencia de repeticiones distribuida aleatoriamente y seleccionada del grupo consistente en elementos SINE y LINE. Ejemplos sin carácter limitativo de estos elementos se podrían seleccionar del grupo consistente en elementos repetitivos Alu, elementos repetitivos Kpn, elementos repetitivos de di-nucleótidos, elementos repetitivos de tetranucleótidos, elementos repetitivos de pentanucleótidos, y elementos repetitivos de hexanucleótidos. Ejemplos sin carácter limitativo de uno o más segmentos de secuencias de elementos repetitivos distribuidas aleatoriamente podrían ser una fracción, o parte, de un elemento repetitivo unitario de cualquiera de las dos secuencias siguientes: i) una secuencia de elemento repetitivos Alu; ó ii): una secuencia consensuada de una secuencia de elementos repetitivos Alu. En una realización dicha sonda de bloqueo se compone de sondas o fragmentos de ADN. Sondas de PAN, o una combinación de sondas de ADN o fragmentos de ADN o sondas de PAN.

En una realización, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de como mínimo dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo método comprende las etapas de: detectar una señal de cada uno de los como mínimo dos marcadores del camino del 5-FU en dicha muestra aislada, y determinar el nivel basándose en las como mínimo dos señales detectadas. En particular, se podría determinar el nivel de tres, cuatro, cinco o seis marcadores. Los marcadores se podrían seleccionar con independencia de entre los TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MTR. En una realización especial, el nivel es indicativo de multiplicaciones o eliminaciones, o de una combinación de multiplicación (o multiplicaciones) y eliminación (o eliminaciones). En ciertos casos, el nivel es indicativo de multiplicación (o multiplicaciones) o de eliminación (o eliminaciones) en combinación con un nivel normal. En otra realización del método acorde con el invento, dicho método comprende además etapas de detectar una señal de cómo mínimo un marcador de referencia, y determinar el nivel basándose en la correlación de una señal de cada uno de cómo mínimo dos marcadores del camino del 5-FU y una señal de al menos un marcador de referencia.

En una realización, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de como mínimo un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo método comprende las etapas de: detectar una señal del como mínimo un marcador del camino del 5-FU en dicha muestra aislada usando al menos una sonda de ADN que se fije al como mínimo un marcador del camino del 5-FU, y determinar el nivel basándose en la como mínimo una señal detectada. En particular, se podría determinar el nivel de dos, tres, cuatro, cinco o seis marcadores. El marcador (los marcadores) se podría (o se podrían) seleccionar con independencia de entre los TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MTR. En una realización especial, el nivel es indicativo de multiplicación (o multiplicaciones) o eliminación (o eliminaciones), o de una combinación de multiplicación (o multiplicaciones) y eliminación (o eliminaciones). En ciertos casos, el nivel es indicativo de multiplicación (o multiplicaciones) o de eliminación (o eliminaciones) en combinación con un nivel normal. En otra realización del método acorde con el invento, dicho método comprende además etapas de detectar una señal de cómo mínimo un marcador de referencia, y determinar el nivel basándose en la correlación de una señal de cada uno de cómo mínimo dos marcadores del camino del 5-FU y una señal de al menos un marcador de referencia.

En una realización, el presente invento se refiere a un método para determinar el nivel de como mínimo un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo método comprende la etapa de: detectar una señal de como mínimo un marcador del camino del 5-FU en dicha muestra aislada usando al menos una sonda que se fije al como mínimo un marcador del camino del 5-FU, detectar una señal de al menos un marcador de referencia en dicha muestra aislada usando al menos una sonda que se fije al como mínimo un marcador de referencia, en el que una de dichas sondas es una sonda de ADN, y determinar el nivel de dicho al menos un marcador del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal de dicho al menos un marcador del camino del 5-FU y una señal de dicho al menos un marcador de referencia. En particular, se podría determinar el nivel de dos, tres, cuatro, cinco o seis marcadores. El marcador (o los marcadores) se podría (o se podrían) seleccionar con independencia de entre los TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MTR. En una realización especial, el nivel es indicativo de multiplicación (o multiplicaciones) o eliminación (o eliminaciones), o de una combinación de multiplicación (o multiplicaciones) y eliminación (o eliminaciones). En ciertos casos, el nivel es indicativo de multiplicación (o multiplicaciones) o de eliminación (o eliminaciones) en combinación con un nivel normal.

El paciente podría ser cualquier individuo o ser humano. El paciente podría ser una persona sana o una persona enferma, tal como uno que tenga un cáncer o del que se sospeche que lo tiene. Ejemplos de cánceres son el de mama, el de pulmón, el colorrectal, el de próstata, el de cabeza y cuello, el de estómago, el de páncreas, el de esófago, el de hígado, y el de vejiga.

Existen una serie de análisis, muchos de los cuales son conocidos en la técnica. El análisis preciso usado en el método acorde con el invento se debería seleccionar cuidadosamente según la naturaleza de los marcadores y de las sondas. La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se ha convertido en una herramienta importante para determinar el número, el tamaño o la localización de secuencias específicas de ADN en las células. Típicamente, la reacción de hibridación tiñe por fluorescencia las secuencias de tal manera que su localización, tamaño o número se puedan determinar usando microscopia por fluorescencia, citometría de flujo, u otra instrumentación adecuada. Se pueden estudiar secuencias de ADN que abarquen desde genomas completos hasta varias kilobases usando técnicas actuales de hibridación en combinación con la instrumentación comercialmente disponible. En la hibridación genómica comparativa (CGH) se tiñen genomas completos y se comparan con genomas normales de referencia para la detección de regiones con número de copia anómalo. En la técnica FISH multicolor (m-FISH) cada cromosoma normal separado se tiñe mediante un color separado (Elis y colaboradores, Cytogenetics Cell Genet 82: 160-71 (1998)). Cuando se use un material anormal, las sondas colorearán los cromosomas anómalos, deduciendo de ese modo los cromosomas normales de los que se han obtenido (Macville M y colaboradores, Histochem Cel, Biol., 108: 299-305 1997). La tinción basada en FISH es suficientemente distinguible, de tal manera que las señales de la hibridación se pueden ver tanto en dispersiones de metafase como en núcleos de interfase. Se han aplicado FISH individuales y multicolor, usando sondas de ácidos nucleicos, a diferentes aplicaciones clínicas conocidas generalmente como citogenética molecular, incluyendo diagnóstico prenatal, diagnóstico de leucemia, y citogenética de tumores. Otros métodos podrían ser la reacción de la cadena polimerasa en transcripción inversa (en adelante RT-PCR) y la hibridación *in situ* (en adelante ISH) incluyendo la hibridación cromogénica *in situ* (en adelante CISH). En particular, se podría usar una combinación de CISH y FISH, por ejemplo, etiquetando la sonda con una etiqueta fluorescente o con una etiqueta cromogénica, y subsiguientemente convirtiendo la señal de FISH en una señal de CISH o viceversa. Alternativamente, se podría etiquetar una sonda con una etiqueta fluorescente y una etiqueta cromogénica, con el fin de permitir la detección separada de la señal de FISH o de la señal de CISH.

Los ensayos basados en proteínas podrían ser, por ejemplo, técnicas basadas en inmunología, tales como, por ejemplo, la inmunohistoquímica (en adelante IHC), la inmunocitoquímica (en adelante ICC), la citometría de flujo, el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en adelante ELISA), la transferencia, y la precipitación.

Los genes, los ácidos ribonucleicos mensajeros (en adelante ARNm) y las proteínas podrían ser todos ellos marcadores predictivos relevantes para un tratamiento estratificado individual. Para más sencillez en la exposición, solamente se mencionan los genes más adelante, pero se pueden hacer agrupaciones similares para la detección de ARNm o de proteínas. El modo más sencillo sería cortar el número pertinente de secciones a partir de tejido embebido en parafina, e hibridar una sonda a cada sección. Alternativamente se pueden usar tejido congelado o improntas. Esta solución se podría usar para pruebas iniciales. En este caso, cada gen objetivo y el correspondiente gen de referencia se analizan en secciones separadas que requieren solamente dos colores diferentes. Sin embargo, se contemplan también múltiples ensayos, en los que todos los genes se prueban en una sola hibridación sobre la misma sección. Existen otras varias posibilidades, la mayoría basadas en sondas con cubre-objetos. La hibridación demanda solamente condiciones estándar. Para la mayoría de las sondas debería incluirse una referencia interna, por ejemplo una sonda centromérica. La sonda de gen y la sonda de referencia se deberían etiquetar en colores diferentes tales como, por ejemplo, rojo y verde, respectivamente. El color rojo diamidino-fenilindol (en adelante DAPI) se podría usar para contratinción, con el fin de asistir en la localización e identificación de tejido. Podría ser útil también la disponibilidad de controlar una sección cortada de hematoxilina y eosina.

Los estudios de disposiciones de cromatina de orden superior son una parte esencial de los intentos en curso para explorar cambios en la estructura epigenómica y sus implicaciones funcionales durante el desarrollo y la diferenciación de células. Entre divisiones de células, la fibra de cromatina de cada cromosoma se restringe a un sub-volumen del núcleo de célula de interfase denominado territorio de cromosoma (en adelante CT). La organización interna de estos territorios muestra una constitución específica tipo célula (Stadler 2004). El reposicionamiento de los locus cromosómicos durante la diferenciación podría ser una consecuencia de los cambios generales en la morfología del CT necesariamente relacionados con cambios transcripcionales. La disposición topológica de los CT se ha conservado durante la evolución de los primates durante un período de aproximadamente 30 millones de años. Evidencias recientes demuestran que el posicionamiento de la cromatina en los núcleos de linfocitos humanos está correlacionado con la densidad de los genes (Tanabe 2002). Se ha informado (Croft 1999) de las diferencias relacionadas con la densidad de los genes en la disposición radial de los CT con CT de replicación tardía y deficientes en genes situados hacia la periferia nuclear y CT de replicación temprana con abundancia de genes en la periferia nuclear. En los núcleos de las células tumorales, se ha observado una pérdida parcial del orden de la cromatina radial (Cremer 2003). Usando nuevas herramientas para estudiar las disposiciones cromosómicas tridimensionales (en adelante 3D) (Bolzer 2005) se ha demostrado que los dominios de la cromatina, que son deficientes en genes, forman un estrato por debajo de la envoltura nuclear, mientras que la cromatina densa en genes está enriquecida en el interior nuclear.

Se puede medir el nivel de un marcador como la cantidad real de un marcador presente en la muestra. Para los genes podría ser, por ejemplo, el número de copias de genes y para las proteínas podría ser el número de proteínas. El nivel se podría informar también como una relación, en la que la cantidad del marcador de interés se correlaciona con la cantidad de un marcador de referencia. En algunos casos, se puede correlacionar el nivel de un marcador con un estado o una enfermedad, y por tanto se podría usar para describir o predecir dichos estados o enfermedades, y podría depender del estafo o enfermedad reales, y del análisis utilizado. A menudo se hace referencia a dichos niveles como valores de corte.

En una célula normal están presentes dos copias de cada uno de nuestros genes. Teóricamente, serían visibles dos señales. Sin embargo, debido al corte de las secciones a partir de tejido embebido en parafina, no estarán presentes los núcleos completos. Por tanto, se ha observado una diferencia entre el número teórico y el número real de señales, y los niveles de corte entre los números normal y anormal de señales por célula se tendrán que determinar empíricamente. Usando una sonda de referencia, deberían verse dos señales de sonda de referencia en una célula normal, y teóricamente la relación entre las señales de la sonda de gen y la sonda de referencia debería ser 1 (uno). Sin embargo, debido a razones técnicas, biológicas y estadísticas, este valor absoluto se determina como un intervalo, por ejemplo entre 0,8 y 2,0 en el caso de una FISH con HER2 (inserción de paquete, equipo Dako HER2 FISH pharmDx™, código K5331). El ensayo de FISH se puede realizar con y sin una o más sondas de referencia (los productos HER2 FISH que usan ambas modalidades están en el mercado). Sin una sonda de referencia, solamente se contabilizan las señales en un color de la sonda de gen objetivo, y el corte entre normal y multiplicado es 4-5, aunque el valor teórico es 2. Las eliminaciones no se pueden contabilizar sin una sonda de referencia o una muestra de referencia.

Un ensayo con FISH podría incluir una o más sondas de referencia adicionalmente a la sonda de gen marcador, etiquetadas en colores diferentes. Por ejemplo, se podría calcular el número de copias de genes usando una sonda de referencia. Se detectan la señal de cada copia de gen marcador y la señal de la correspondiente copia de gen de referencia y se calcula la proporción. La referencia es una medida del nivel de ploidía, y por tanto el número de copias de cromosomas, del núcleo. El valor de corte más aceptado de un número de copias de genes normal se indica mediante una relación entre 0,8 y 2,0. La eliminación de gen se indica por una relación inferior a 0,8. Sin embargo, se han comunicado y usado otros valores de corte (Järvinen, 1999, por ejemplo entre 0,67 y 1,5. Un valor verdadero de corte debería determinarse basándose en los datos de resultados de pacientes (Bonetti y Gelber, 2000), y esto todavía no se ha hecho. Para la mayoría de los marcadores, se espera que un número normal de copias de genes será predictivo para la respuesta al 5-FU, mientras que un número disminuido de copias de genes será predictivo para una respuesta reducida o una carencia de respuesta al tratamiento con quimioterapia con 5-FU. Sin embargo, para algunos marcadores podría existir una correlación inversa. Por ejemplo, se espera que la eliminación del gen DPD indique un grado de respuesta, y se ha especulado si la multiplicación indicaría que no hay grado de respuesta. No obstante, aún no se ha entendido por completo el impacto de las multiplicaciones. El estudio del valor predictivo de los cambios del número de copias del gen TOP2A (GCN) demostró que tanto las eliminaciones como las multiplicaciones predecían respuesta al tratamiento con antraciclina, mientras que los pacientes con un GCN normal no se beneficiaron del tratamiento (Knoop 2003).

La sonda que se fija a un marcador de referencia se puede considerar como objetivo contra la región centromérica del cromosoma donde está localizado el objetivo de interés. Mediante la aplicación de la referencia sobre el mismo cromosoma, el nivel específico de ploidía del cromosoma dado es decisivo en cuanto a si la sonda genómica se hallará multiplicada, eliminada o normal. Se podrían emplear ambas sondas de ácidos nucleicos, las sondas de análogos de ácidos nucleicos así como las sondas de proteínas. A pesar de la gran homología en el ADN centromérico de los seres humanos, se han identificado y construido clones que contienen centrómeros específicos de cromosomas humanos para uso en una FISH. La longitud de la sonda se podría reducir drásticamente sin reducción de la intensidad de la señal cuando se usen secuencias de sondas centroméricas objetivo contra secuencias centroméricas de elementos repetitivos. La ventaja de usar sondas centroméricas de referencia estriba en que no contribuyen a la tinción de fondo, puesto que no contienen elementos SINE y LINE.

Se ha averiguado que los centrómeros de cromosomas 1, 2, 6, 10, 12, 17, 18 y 22 se identifican específicamente mediante sondas de FISH derivadas de secuencias de clon que se pueden usar directamente como sondas de referencia. Sin embargo, se podrían elegir sondas de PNA sintético, para la detección de centrómeros en la FISH, debido a su especificidad para el ADN y a su mayor intensidad de señal, con una reducción del fondo no específico. Un PNA es un oligonucleótido sintético en el que la cadena principal imita a un péptido en lugar de la cadena principal de desoxirribosa fosfodiéster del ADN. Para la construcción de PNA, es útil una secuencia de aproximadamente 10-25 bases. Alternativamente, se podría usar como referencia una sonda específica de locus (en adelante LSP). Ésta se debería colocar preferiblemente en el brazo de cromosoma opuesto al gen de interés, para eliminar una relación incorrecta de sonda a referencia si ocurren eliminaciones totales de brazo. La sonda de referencia no debería colocarse en una región que no tenga ninguna relación con las anomalías de genoma en el cáncer.

Una realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en un paciente, cuyo método comprende las etapas de determinar el nivel de cómo mínimo dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, y predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado.

Una realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en un paciente, cuyo método comprende además detectar una señal de cómo mínimo un marcador de referencia, y determinar el nivel de al menos dos marcadores del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal de cada uno de los al menos dos marcadores del camino del 5-FU y una señal del cómo mínimo un marcador de referencia.

Otra realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de tratar a un paciente con 5-FU, que comprende las etapas de determinar el nivel de anomalía de gen de al menos dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, y predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado.

Una realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en un paciente, cuyo método comprende además detectar una señal de al menos un marcador de referencia, y determinar el nivel de anomalía de gen de al menos dos marcadores del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal de cada uno de los al menos dos marcadores del camino del 5-FU y una señal del como mínimo un marcador de referencia.

Una realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en un paciente, cuyo método comprende las etapas de determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU, en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, usando una sonda de ADN que se fija a un marcador del camino del 5-FU, y predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado. En otra realización, el método comprende además detectar una señal de al menos un marcador de referencia, y determinar el nivel del al menos un marcador del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal del al menos un marcador del camino del 5-FU y una señal del al menos un marcador de referencia.

Otra realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de tratar a un paciente con el 5-FU, que comprende las etapas de determinar el nivel de anomalía de gen de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis usando al menos una sonda de ADN que se fije a un marcador del camino del 5-FU, y predecir el resultado del tratamiento con el 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado. En una realización, dicho método comprende además detectar una señal de al menos un marcador de referencia, y determinar el nivel de anomalía de gen del al menos un marcador del camino del 5-FU basándose en la correlación de una señal del al menos un marcador del camino del 5-FU y una señal del al menos un marcador de referencia.

Una realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de un tratamiento con el 5-FU en un paciente, que comprende las etapas de determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis usando al menos una sonda que se fije a dicho al menos un marcador del camino del 5-FU, detectar una señal de al menos un marcador de referencia usando una sonda que se fije al como mínimo un marcador de referencia, en el que una de dichas sondas es una sonda de ADN, y predecir el resultado del tratamiento con el 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado, basándose dicho nivel en la correlación de una señal de dicho al menos un marcador del camino del 5-FU y una señal del al menos un marcador de referencia.

Otra realización del invento se refiere a un método para predecir el resultado de tratar a un paciente con el 5-FU, que comprende las etapas de determinar el nivel de anomalías de genes de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis usando al menos una sonda que se fije a dicho al menos un marcador del camino del 5-FU, detectar una señal de al menos un marcador de referencia usando una sonda que se fije al como mínimo un marcador de referencia, en el que una de dichas sondas es una sonda de ADN, y predecir el resultado del tratamiento con el 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel determinado, basándose dicho nivel de aberraciones de gene en la correlación de una señal de dicho al menos un marcador del camino el 5-FU y una señal de dicho al menos un marcador de referencia.

La identificación de anomalías de genes se podría realizar usando sondas específicas, una que se fije a una copia de genes normales y otra que se fije a una copia de gen aberrante. Etiquetando las dos sondas de forma diferente, sería posible identificar la presencia y el número de copia de un gen aberrante. Algunas veces solamente una copia de un gen es anómala, y a veces dos o más copias son anómalas.

La anomalía de un gen abarca cualquier cambio en el ADN, y podría ser, por ejemplo, eliminación, multiplicación, translocación, mutación, inserción, fusión, inversión y metilación de un ADN.

En una realización del invento, el método comprende además poner en contacto la muestra con una composición del invento.

En una realización del invento, el análisis es un análisis de genes.

En una realización del invento, la muestra se obtiene de un tejido seleccionado del grupo que consiste en mama, pulmón, colorrectal, próstata, pulmón, cabeza y cuello, estómago, páncreas, esófago, hígado, y vejiga.

En una realización del invento, la muestra es una muestra de tejido, una preparación de células, una preparación de fragmentos de células, una preparación de componentes de células aislada o enriquecida, y una preparación de proteínas.

La muestra se podría aislar y procesar usando protocolos estándar. La muestra aislada de un paciente podría ser una muestra que se origine de varios tejidos tales como, por ejemplo, mama, pulmón, colorrectal, próstata, pulmón, cabeza y cuello, estómago, páncreas, esófago, hígado, y vejiga u otros tejidos relevantes y neoplasia de los mismos. La muestra podría tomar cualquier forma, tal como, por ejemplo, una muestra de tejido, una preparación de células, una preparación de fragmentos de células, una preparación de componentes de células aislada o enriquecida, o una preparación de proteínas. Ejemplos sin carácter limitativo podrían ser: tejido (podría ser una sección cortada de una biopsia), La preparación de células podría ser cualquier suspensión de células, muestra de sangre, aspiración con

ES 2 350 648 T3

aguja fina, fluido de ascitis, esputo, lavado de peritoneo, lavado de pulmón, orina, heces, raspaduras de células, frotis de células, células de citocentrifugado o de toma de muestras de útero. Las preparaciones de fragmentos de células se podrían obtener, por ejemplo, por homogeneización de las células, tratamiento de congelación-descongelación o lisis de las células. La muestra aislada se podría tratar de muchas formas diferentes dependiendo del propósito de la obtención de la muestra y de la rutina en la zona. A menudo la muestra se trata con diversos reactivos para conservar el tejido para análisis posteriores de la muestra, y alternativamente la muestra se podría analizar directamente. Ejemplos de métodos ampliamente usados para preservar muestras son la formalina fijada seguida por embutición en parafina y criopreservación.

En una realización del invento, el paciente recibirá, o ha estado recibiendo, al menos un tratamiento anti-cáncer.

La quimioterapia citotóxica con inhibidores de síntesis de ADN (como el 5-FU) ha demostrado actividad en un amplio intervalo de neoplasias malignas y tanto en estados incipientes como en estados tardíos de la enfermedad. Se ha observado actividad cuando el 5-FU y sus análogos se administran como simples agentes y en combinaciones con otros agentes citotóxicos o modalidades de tratamientos y con un amplio intervalo de administraciones incluyendo inyección intravenosa e infusión continua y administración oral. Incluso se ha observado actividad a continuación de un re-tratamiento después de usar otro inhibidor de síntesis de ADN o un programa diferente o con el mismo tratamiento en diferentes etapas de la enfermedad. Antes del ensayo y tratamiento con el 5-FU o sus análogos, el paciente podría haber recibido uno o más tratamientos de quimioterapia citotóxica, así como otras modalidades de tratamientos incluyendo terapia endocina, radioterapia y terapia dirigida. El tratamiento podría ser antineoplásico (antes de cirugía) o posquirúrgico (preciso después de la cirugía) o un tratamiento para enfermedad metastásica. La quimioterapia citotóxica recibida podría incluir el 5-FU, especialmente cuando el re-tratamiento se intenta después de la demostración de actividad anterior o de un intervalo sin enfermedad a continuación del tratamiento complementario.

En una realización del invento, el como mínimo un tratamiento es una monoterapia o una politerapia.

En una realización del invento, la politerapia se administra secuencial o simultáneamente.

En una realización del invento, el tratamiento se selecciona del grupo consistente en tratamiento quirúrgico, tratamiento radio-terapéutico y tratamiento quimioterapéutico.

En una realización del invento, el tratamiento quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en terapia citotóxica, anti-hormonal y dirigida.

En una realización del invento, el tratamiento quimioterapéutico es un tratamiento citotóxico quimioterapéutico.

Se anticipa que un nivel por debajo del número normal de copia de gen de al menos uno de los marcadores del camino del 5-FU es predictivo para menos susceptibilidad al tratamiento con el 5-FU.

En una realización del invento, la sonda (o las sondas) usada (o usadas) en el método acorde con el invento podrían ser sondas de ácidos nucleicos o sondas de análogos de ácidos nucleicos según se ha descrito.

En una realización del invento, las sondas comprendidas en el método se fijan al menos a dos marcadores seleccionados del camino del 5-FU en condiciones restrictivas. En otra realización, la sonda de ADN comprendida en el método se fija al menos a un marcador seleccionado del camino del 5-FU en condiciones restrictivas.

Las sondas podrían fijarse al marcador de interés e hibridar en condiciones restrictivas. Los que tengan una experiencia normal en la técnica de la hibridación reconocerán que los factores comúnmente usados para imponer o controlar la restricción de la hibridación incluyen la concentración de formamida (u otro reactivo químico desnaturante), la concentración de sal (es decir, la fuerza iónica), la temperatura de hibridación, la concentración de detergente, el pH y la presencia o ausencia de agentes caotrópicos. La restricción óptima para una combinación de sonda y secuencia de marcadores se ha encontrado mediante la técnica bien conocida de fijar varios de los factores de restricción anteriormente mencionados y luego determinar el efecto de variar un solo factor de restricción. Los mismos factores de restricción se pueden modular para controlar de ese modo la restricción de la hibridación de un APN a un ácido nucleico, con la excepción de que la hibridación de un APN es completamente independiente de la fuerza iónica. La restricción óptima para un ensayo se podría determinar experimentalmente mediante el examen de cada factor de restricción hasta que se consiga el grado de discriminación previsto. En general, cuanto más estrechamente relacionado esté el fondo que causa contaminantes de ácidos nucleicos con la secuencia de objetivos, más cuidadosamente deberá controlarse la restricción. De ese modo, las condiciones de hibridación adecuadas comprenden las condiciones bajo las que se obtenga el grado previsto de discriminación, de tal manera que un ensayo genere un resultado preciso (con la tolerancia prevista en el ensayo) y reproducible. Sin embargo, asistidos por no más de la experimentación rutinaria y por la exposición descrita en la presente memoria, los expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de hibridación adecuadas para realizar ensayos utilizando los métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Ejemplos sin carácter limitativo de condiciones restrictivas se describen más adelante en los procedimientos experimentales, y ejemplos adicionales no limitativos se podrían encontrar en el capítulo 11 de la publicación "Péptidos de ácidos nucleicos, protocolos y aplicaciones", segunda edición, Editor Peter E. Nielsen, Horizon Scientific Press, 2003.

ES 2 350 648 T3

Los marcadores o el marcador del camino del 5-FU se seleccionan independientemente del grupo consistente en TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MYR.

5 Adecuadamente, los marcadores TYMS, DHFR, TP, DPD, MTHFR, TK y MYR. se podrían seleccionar individualmente. Son ejemplos de combinaciones adecuadas TYMS y DHFR; TYMS, DHFR y TP; y TYMS, DHFR y TK. Cuando los marcadores se determinan en combinaciones, se entenderá que la detección se realiza usando muestras separadas o la misma muestra.

10 En una realización del invento, el paciente tiene un cáncer (o se sospecha que lo tiene).

En una realización del invento, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de hígado, y cáncer de vejiga.

15 En una realización del invento, el método contempla además el uso de sistemas de análisis de imágenes.

La lectura manual del resultado de muchas muestras consume mucho tiempo. Por tanto, sería de gran ayuda disponer de acceso a sistemas automatizados. Por ejemplo, la lectura de muchos campos de hibridación sería asistida mediante análisis de imágenes por fluorescencia con instalaciones de exploración de gran velocidad. La firma Me-
20 taSystems es un ejemplo de un proveedor de un sistema de análisis de imágenes que podría usarse.

El presente invento se refiere además al uso de la composición según se ha descrito anteriormente para determinar el nivel de al menos un marcador (usando al menos una sonda de ADN) o como mínimo dos marcadores (usando al menos dos sondas) seleccionados del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente. El presente invento se
25 refiere además al uso de la composición según se ha descrito anteriormente para determinar el nivel de al menos un marcador seleccionado del camino del 5-FU y como mínimo un marcador de referencia en una muestra aislada de un paciente, en donde al menos una de dichas sondas es una sonda de ADN.

En una realización del invento, la composición según se ha definido anteriormente se usa para determinar el nivel de
30 anomalías de genes. En una realización del invento, la composición se usa para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en un paciente. En una realización del invento, la composición se usa cuando el paciente es una persona que tenga un cáncer (o que se sospeche que lo tiene). En una realización del invento, la composición se usa donde el cáncer seleccionado es del grupo consistente en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de hígado, y cáncer de
35 vejiga.

El presente invento se refiere además a un equipo para determinar el nivel de al menos dos marcadores del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición
40 constituida por al menos dos sondas que se fijan a como mínimo dos marcadores del camino del 5-FU, e instrucciones para usar la composición. En una realización, el equipo para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis comprende además una sonda que se fija a un marcador de referencia.

Una realización del invento se refiere a un equipo para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en una
45 muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición que comprende al menos dos sondas que se fijan a como mínimo dos marcadores del camino del 5-FU, e instrucciones para usar la composición. En una realización, el equipo para predecir el resultado de un tratamiento con 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis comprende además como mínimo una sonda que se fija a un marcador de
50 referencia.

El presente invento se refiere además a un equipo para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición constituida
por al menos una sonda de ADN que se fija a como mínimo un marcador del camino del 5-FU e instrucciones para
55 usar la composición. En una realización adicional, dicho equipo comprende además al menos una sonda que se fija a un marcador de referencia.

Una realización del invento se refiere a un equipo para predecir el resultado de un tratamiento con el 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición constituida por
60 al menos una sonda de ADN que se fija al menos a un marcador del camino del 5-FU, e instrucciones para usar la composición. En una realización, el equipo para predecir el resultado de un tratamiento con el 5-FU comprende además una sonda que se fija a un marcador de referencia.

El presente invento se refiere además a un equipo para determinar el nivel de al menos un marcador del camino del 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición constituida
65 por al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador del camino del 5-FU, y al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador de referencia, en donde al menos una de dichas sondas es una sonda de ADN, e instrucciones para usar a composición.

ES 2 350 648 T3

Una realización del invento se refiere a un equipo para predecir el resultado de un tratamiento con el 5-FU en una muestra aislada de un paciente mediante un análisis, cuyo equipo comprende una composición constituida por al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador del camino del 5-FU, y al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador de referencia, en donde al menos una de dichas sonda es una sonda de ADN, e instrucciones para usar la composición.

El equipo de acuerdo con el invento se podría construir de cualquier modo adecuado. Por tanto, a continuación se indican realizaciones sin carácter limitativo.

En una realización, el equipo comprende cuatro sondas para marcadores del camino del 5-FU y cuatro sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 8 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (cuatro tinciones separadas de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende tres sondas para marcadores del camino del 5-FU y tres sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 6 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (tres tinciones separadas de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende dos sondas para marcadores del camino del 5-FU y dos sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 4 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos tinciones separadas de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende una sonda de ADN para un marcador del camino del 5-FU y una sonda para un marcador de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 4 colores) o bien se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende cuatro sondas para marcadores del camino del 5-FU y dos sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 6 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos tinciones separadas de 3 colores).

En algunas realizaciones, el equipo comprende tres sondas para marcadores del camino del 5-FU y dos sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 5 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos o tres tinciones separadas).

En una realización, el equipo comprende dos sondas para marcadores del camino del 5-FU y dos sondas para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 4 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos tinciones separadas de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende cuatro sondas para marcadores del camino del 5-FU y una sonda para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 5 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos o tres tinciones separadas).

En una realización, el equipo comprende tres sondas para marcadores del camino del 5-FU y una sonda para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 4 colores) o bien se podrían visualizar usando al menos dos colores (dos tinciones separadas de 2 colores).

En una realización, el equipo comprende dos sondas para marcadores del camino del 5-FU y una sonda para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 3 colores).

En una realización, el equipo comprende una sonda para marcadores del camino del 5-FU y una sonda para marcadores de referencia que se podrían visualizar usando colores individuales (una tinción de 2 colores).

Ejemplos

A continuación se ilustra el invento mediante los ejemplos siguientes, que en manera alguna tienen carácter limitativo.

Ejemplo 1

Sondas genómicas con FISH para ensayo con el 5-FU y procedimientos experimentales

La Figura 1b muestra los 4 marcadores principales para los que se han construido sondas y referencias de gen.

ES 2 350 648 T3

Lista de genes de marcador

1. TYMS (Timidilato sintasa) en 18p11.32
2. TP (ECGF1) (dihidropirimidina fosforilasa) en 22q13.32
3. DPD (DPYD) (dihidropirimidina dehidrogenasa) en 1p.22
4. DHFR (Dihidrofolato reductasa) en 5q1.2-q13.2

Referirse a las figuras 5 a 8.

Una intensidad de señal apropiada de una sonda de FISH depende de la longitud de la sonda y del tipo y cantidad de fluorocromos presentes. Se ha averiguado que se podrían usar aproximadamente 10.000 moléculas de sulforodamina 101 cloruro de ácido "texas red", (en adelante TxR) para detección que se obtienen normalmente mediante una sonda de 200-400 kb. La sonda de isotocianato de fluoresceína (en adelante FTIC) verde requiere aproximadamente 10.000 moléculas. Esto requiere una sonda mayor de 500 kb que se ha etiquetado extensamente.

Los clones que cubren la secuencia de genes objetivo se identificaron en el genoma navegador de la Universidad de California en Santa Cruz (en adelante UCSC). Mediante la alineación genómica de los extremos de los cromosomas artificiales bacterianos (en adelante BAC), se localizaron los clones en el genoma humano, y cuando se eligieron los clones, se tuvieron en consideración la correspondencia de longitud e identidad. En algunos casos, son necesarias combinaciones de más clones para obtener una sonda con alta intensidad de señal, por lo que se seleccionaron algunos clones como una prolongación de unos de otros. La Figura 3 muestra los clones seleccionados para cubrir la secuencia de los cuatro genes, mientras que la Figura 4 muestra las sondas de referencia seleccionadas. Todos los clones se probaron por comparación del patrón de restricción entre una digestión teórica y el ADN real, donde se identificó la secuencia total de clones de plena longitud y se combinó con el factor relevante. La digestión se realizó con la enzima de restricción *bacillus amyloliquefaciens* (en adelante BamHI).

Cultivo y cosecha de estirpes celulares

Se eligió la estirpe celular BT-20 como una herramienta de validación para la verificación de la detección de la multiplicación del TYMS. Esta estirpe celular tiene ganancias de todo el brazo de 5p, 7p, 10p, 16p, 16q y 20q y un aumento de número de copias regional en 4q32-q34 y 6q21-q22 (55). No se hicieron desviaciones del método descrito en el capítulo anterior durante el cultivo y el re-enchapado. Se realizaron dos preparaciones de portaobjetos diferentes cuando se recolectó para optimizar la formación de la propagación de metafase. En primer lugar, los portaobjetos se lavaron en agua miliQ antes de su uso, y en segundo lugar los portaobjetos se pulimentaron brevemente con etanol (en adelante EtOH) al 70% antes del lavado en agua fría miliQ. Se evaluó en el microscopio el número de metafases, y pareció que estaban presentes más metafases después del pre-tratamiento con etanol. No aparecieron muchas metafases por portaobjetos, y quizás la optimización de la solución hipotónica podría mejorar el rendimiento, pero para este estudio se obtuvieron suficientes dispersiones.

Preparación de células para cito-portaobjetos

La estirpe celular BT-20 se cultivó en Medio Mínimo Esencial (en adelante MEM) de Eagles con sal de Earles (Gibco) suplementados con un 10% de suero bovino fetal (*in vitro* A/S), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1 mM de piruvato sódico (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco) y se incubó en una incubadora Sanyo MCO-20 AIC CO2 a 37°C y un 5% de CO2. El medio se cambió 2-3 veces a la semana, y cuando alcanzó la confluencia, las células se separaron por tratamiento suave con un 0,25% de tripsina con ácido etilendiamino tetraacético (en adelante EDTA) (Gibco) durante 8-12 minutos a 37°C, después de un breve aclarado con solución tampón de fosfato salino (en adelante PBS) (D-PBS, Gibco). Las células obtenidas de sangre humana, se lavaron dos veces con PBS antes del cultivo en el medio Roswell Park Memorial Institute (en adelante RPMI) 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (*in vitro* A/S), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1 mM de piruvato sódico (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) y penicilina/estreptomicina (Gibco) y se incubó en una incubadora Sanyo MCO-20 AIC CO2 a 37°C y un 5% de CO2. para las propagaciones de metafases, se añadieron 10 µl de Karlomax Colcemid (GibcoBRL) por 10 ml de cultivo de células y se incubó a 37°C durante 2 horas para inhibir la formación de husos, deteniendo de ese modo las células en metafase. Después de la tripsinización, las células se volvieron a suspender en 60 mM de solución hipotónica (60 mM de KCl) durante 20 minutos, seguida por la fijación en fijador fresco (3: 1 en volumen de metanol-ácido acético) y se dejó reposar durante 5 minutos. Las células se aislaron por centrifugación durante 10 minutos a 189XG y la solución se volvió a suspender en 10 ml de fijador. Esta etapa se repitió dos veces antes de aplicar fijador en un volumen produciendo una suspensión ligeramente nubosa. Los portaobjetos Superfrost™ de la casa Menzel-Glaserr se pulimentaron brevemente con EtOH al 70% antes de lavar en agua fría milliQ. Se eliminó el exceso de agua y se aplicaron 10 µl de suspensión de células en dos puntos en cada portaobjetos, y se secó durante 5 minutos en un ambiente con una humedad del 50-60%, seguido por un secado en una campana de humos durante 1-2 días. Los portaobjetos se pre-trataron durante 2 minutos en formaldehído al 3,7% en

ES 2 350 648 T3

TBS (50 mM de Tris pH 7,6 y 0,15 mM de NaCl), se lavó en PBS (10 mM de NaPO₄ y 0,145 mM de NaCl, pH 7,2), y se deshidrató en una serie de etanol al 70%, 85% y 96% durante 2 minutos cada una y se secó al aire antes de la adición de las sondas.

5

Preparación de tejido para histo-portaobjetos

Se cortó tejido incluido en parafina y fijado con formalina a secciones de 3-7 μ m. Se extrajo la parafina mediante la colocación de portaobjetos de 2x5 min en xileno, lavando en series de etanol al 99%, 96% y 70% durante 2 minutos cada vez, antes de lavar durante 2 minutos en Tampón de lavado (Vial 3, juego de accesorios FISH de histología K599, 10
Dako). Los portaobjetos se metieron en una incubadora durante 10 minutos en solución de pre-tratamiento (Vial 1, juego de accesorios FISH de histología K599, Dako), se precalentaron a 97°C usando microondas (MicroMED, T/T Milestone). Se dejaron enfriar los portaobjetos durante 15 minutos en solución de pre-tratamiento antes de lavar durante 2x3 min en tampón de lavado. Se extrajo el agua en exceso y se añadieron a cada portaobjeto 5-8 gotas de 15
pepsina fría (2°C-8°C) lista para usar (Vial 2, juego de accesorios FISH de histología K599, Dako). Los portaobjetos se metieron en una incubadora durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lo anterior, se extrajo la pepsina lavando los portaobjetos durante 2x3 min en tampón de lavado. Finalmente, se lavaron los portaobjetos en una serie de etanol al 70%, 96% y 99% durante 2 minutos en cada concentración, y se secaron al aire antes de la adición de las sondas.

20

Preparación del ADN para la FISH

Aislamiento de sonda de única secuencia: la etapa inicial en el método preferido de preparar sondas es multiplicar el clon por crecimiento, antes del aislamiento, y la purificación del ADN que tiene la inserción de única secuencia del anfitrión de crecimiento (Zhao E., Stodolsky M, Métodos en Biología Molecular. Construcción de biblioteca, Representación física, y secuenciación Vol. 1 primera edición, 2004, Humana Press).

El ADN precursor de sonda se etiquetó directamente con fluorocromo por traducción de Nick. Para etiquetar el ADN precursor de sonda, en hielo, se re-suspendieron 10 μ g de ADN en 0,250 ml de tampón de reacción consistente en 25 μ l de tampón de 10x traducciones de Nick (Tris-HCl 500 mmol/L, 100 mmol/L de MgCl₂, 1 mmol/L de DTT, 100 mg/L de BSA, pH 7,5), 25 μ L de 10x mezcla de dNTP (Tris-HCl 50 mmol/L, 10 mmol/L de EDTA, 0,5 mmol/L de dATP, 0,5 mmol/L de dGTP, 0,5 mmol/L de dCTP, 0,34 mmol/L de dTTP, pH 7,6), 4 μ l de dUTP-fluorocromo (1mmol/L), 10 μ L de ADN polimerasa, (Invitrogen, 10 U/ μ l), y 0,3 μ L de Dnase (Sigma-Aldrich, determinado empíricamente). 30
La mezcla se metió en una incubadora a 15°C durante 4 horas, antes de detener la reacción mediante la adición de 25 μ L 500 mmol/L de EDTA, e incubando a 65°C durante 10 minutos. Se retiraron los nucleótidos no incorporados por centrifugación usando dispositivos de filtro centrífugos Microcon YM-10 (Milipore). La sonda purificada etiquetada se re-suspendió en 25 μ l de solución TE (Tris-HCl 10 mmol/L, 0,1 mmol/L de EDTA, pH 0,8). Esta solución se almacenó a -20°C hasta su uso.

40

Protocolo de FISH

La mezcla de hibridación para un área objetivo en un portaobjetos contenía entre 2 y 150 ng de objetivo y sonda de referencia, 1 μ g de ADN humano total no etiquetado y sonificado disuelto en tampón de hibridación (45% de formamida, 45
10% de dextran sulfato, 0,3 M de NaCl, 5 mM de fosfato sódico, 5 μ mol/L de Oligo de bloqueo de APN). En cada área de objetivo, se aplicaron 10 μ L de mezcla de hibridación, se cerró herméticamente con una tapa deslizante y cemento de goma, seguido por una desnaturalización a 82°C durante 5 minutos, y de una hibridación a 45°C durante 18 horas usando un hibridizador (Dako). Después de la hibridación, se retiró la tapa deslizante y se lavó el portaobjetos durante 10 minutos en tampón de lavado restrictivo (0,2 x SSC, 0,1% de Triton X-100), se precalentó a 65°C, seguido 50
2 veces durante 3 min en tampón de lavado y deshidratación en una serie de 70%, 85%, y 96% de etanol. Después de secar al aire, el portaobjetos se montó con 15 μ l de Vectashield H-1000 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame) suplementado con 0,1 μ g/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma Chemicals) y se cerró herméticamente con una tapa deslizante. La detección se realizó dentro de una semana después de la hibridación usando un microscopio de fluorescencia Leica u Olympus BX G1, dotado de filtros de doble paso DAPI, FITC, TRITC y de filtros de triple paso 55
DAPI/FITC/TRITC bajo objetivo de inmersión en aceite 100x.

La Figura 5 muestra la hibridación de dihidropirimidina dehidrogenasa (en adelante DPYD) a cromosomas de metafase. (A) Dibujo del área cubierta por las sondas; (B) Hibridación de las sondas de DPYD a propagaciones de metafases de sangre periférica normal. Se han representado dos cromosomas normales 1 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. La hibridación de la sonda de DPYD a núcleos muestra dos señales rojas y dos señales verdes. La sonda de referencia es una sonda de ADN específica de locus situada en el mismo brazo telómero al gen DYPD de interés; (C) Hibridación de la sonda de DYPD a propagaciones de metafases de la estirpe celular BT-20 de tumor de mama con sensibilidad química. Se han representado dos cromosomas normales teniendo 65
una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. (D) Hibridación de la sonda de DPYD a tejido, que da una relación entre la señal roja y la señal verde de 0,49 indicativa de una eliminación del gen DPYD.

La Figura 6 muestra la hibridación de dihidrofolato reductasa (en adelante DHFR) a cromosomas de metafase. (A) Dibujo del área cubierta por las sondas; (B) Hibridación de las sondas de DHFR a propagaciones de metafases de sangre periférica normal. Se han representado dos cromosomas normales 5 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. La hibridación de la sonda de DHFR a núcleos muestra dos señales rojas y dos señales verdes. La sonda de referencia es una sonda de ADN específica de locus situada en el brazo contrario al gen DHFR de interés; (C) Hibridación de la sonda de DHFR a propagaciones de metafases de la estirpe celular BT-20 de tumor de mama con sensibilidad química. Se han representado dos cromosomas normales 5 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. (D) Hibridación de la sonda de DHFR a tejido, que da una relación entre la señal roja y la señal verde de 0,76 indicativa de una eliminación del gen DHFR.

La Figura 7 muestra la hibridación de timidilato sintasa (en adelante TYMS) a cromosomas de metafase. (A) Dibujo del área cubierta por las sondas; (B) Hibridación de las sondas de TYMS a propagaciones de metafases de sangre periférica normal. Se han representado dos cromosomas normales 18 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. La hibridación de la sonda de TYMS a núcleos muestra dos señales rojas y dos señales verdes. La sonda de referencia es una sonda de ADN específica de locus situada en el brazo contrario al gen TYMS de interés; (C) Hibridación de la sonda de TYMS a propagaciones de metafases de la estirpe celular BT-20 de tumor de mama con sensibilidad química. Se han representado dos cromosomas normales 5 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. (D) Hibridación de la sonda de TYMS a tejido, que da una relación entre la señal roja y la señal verde de 0,95, indicativa de un número de copias normal.

La Figura 8 muestra la hibridación de timidina fosforilasa (en adelante ECGF1) a cromosomas de metafase. (A) Dibujo del área cubierta por las sondas; (B) Hibridación de las sondas de ECGF1 a propagaciones de metafases de sangre periférica normal. Se han representado dos cromosomas normales 22 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. La hibridación de la sonda de ECGF1 a núcleos muestra dos señales rojas y dos señales verdes. La sonda de referencia es una sonda de ADN específica de locus situada en el mismo brazo centrómero al gen ECGF1 de interés; (C) Hibridación de la sonda de ECGF1 a propagaciones de metafases de la estirpe celular BT-20 de tumor de mama con sensibilidad química. Se han representado dos cromosomas normales 22 teniendo una señal roja y una verde situadas en el mismo cromosoma. (D) Hibridación de la sonda de ECGF1 a tejido, que da una relación entre la señal roja y la señal verde de 0,2,89, indicativa de una multiplicación del gen ECGF1.

Ejemplo 2

Ensayo predictivo para el resultado del tratamiento con el 5-FU en cáncer de mama

Antecedentes: No se ha desarrollado un marcador predictivo utilizable en medios clínicos para el resultado clínico de un tratamiento que contenga el 5-FU. La eficacia del 5-FU se participa a través de un camino de timidilato sintasa que funcione y debería bloquearse por la ausencia o la reducción de función de las enzimas fundamentales del camino. Se utilizó hibridación *in situ* con fluorescencia (en adelante FISH) para identificar los cambios de números de copias en cuatro genes candidatos del ciclo del timidilato.

Material y métodos

Población de pacientes. Basándose en los archivos de registro de pacientes en el Departamento de Oncología del Rigshospitalet y del Hospital de la Universidad de Herlev, se identificaron los pacientes que empezaron un tratamiento con capecitabina entre 1998 y 2004 para cáncer de mama metastásico. El equipo participante de oncólogos emprendió una revisión *in situ* de todos los archivos origen de pacientes. Se seleccionaron dos grupos de pacientes. Un grupo sin beneficio clínico (progresión de la enfermedad en menos de 3 meses) y un segundo grupo con beneficio clínico (tiempo hasta la progresión por encima de 6 meses). Se recogió el tejido de archivo del tumor primario de 35 pacientes. No se pudo identificar un área de tumor en el tejido recibido de 6 de estos pacientes. A los 29 pacientes restantes se les hizo un análisis para los cambios en el número de copias de genes (en adelante CGN) mediante la técnica de FISH en 4 de los genes (TYMS, DHFR, TS-ECGF1 y DPD) involucrados en la incorporación primaria del 5-FU al ADN.

El régimen terapéutico: se administró un tratamiento con capecitabina (Xeloda®) de acuerdo con hojas de flujo y recomendaciones predeterminadas. Se administraron 1250 mg/m² de capecitabina por vía oral dos veces al día desde los días 1 al 14 cada 3 semanas. Se continuó el tratamiento hasta la evolución de la enfermedad, toxicidad grave, rechazo del paciente, o un tiempo máximo de un año. La toxicidad grave que requirió la discontinuación del tratamiento incluyó un aumento de bilirrubina > 10 X límite superior de lo normal (en adelante ULN) o un aumento de las transaminasas ≥20; o cualquier evento adverso grave o que amenazase la vida. El tratamiento se pospuso una semana si la cuenta de $\leq 3,0 \times 10^9 / l$ o de plaquetas $\leq 100 \times 10^9 / l$. Se usó el sistema de graduación de criterios de toxicidad de la Organización Mundial de la Salud (en adelante WHO). La dosis de capecitabina se redujo en un 25% después de una estomatitis de grado 1, en un 50% después de una estomatitis de grado 2, y se detuvo permanentemente después de una estomatitis de grado 3. Después del síndrome mano-pie de grado 1, se redujo la dosis de capecitabina en un 25%, y después de una reacción de la piel de mano-pie de grado 2 se interrumpió la capecitabina hasta la recuperación y entonces fue obligatoria una reducción en la dosis del 50%. Después de una diarrea del grado 1-2 se trató al paciente con Imodium y se redujo la dosis de capecitabina en un 50%. El tratamiento se detuvo permanentemente después de una diarrea del grado 3-4.

Clasificación de pacientes, recogida de datos y métodos estadísticos. Las investigaciones pre-tratamiento realizadas dentro de las 4 semanas de iniciación de la terapia incluían el historial completo y la exploración física, recuento sanguíneo completo (en adelante CBC), el perfil químico del suero, radiografía de tórax, gammagrafía ósea o radiografía ósea, y ecografía específica de zona según fuese apropiado. Los recuentos CBC se obtuvieron el día 1 de cada ciclo, y el perfil químico del suero se realizó cada 3 ciclos. El criterio de valoración principal y pre-definido del análisis fue el beneficio clínico (en adelante CB), clasificado por categorías como CB bueno, CB incierto, y ausencia de CB. El CB bueno se definió como supervivencia sin evolución (en adelante PFS) de 6 meses o más, la ausencia de CB se definió como una PFS de 3 meses o menos, y una PFS incierta se definió como una PFS de más de 3 meses pero menos de 6 meses. La PFS se calculó como el tiempo transcurrido desde la iniciación de evolución de la enfermedad con capecitabina o la muerte usando criterios de la WHO. Se calculó el valor p de dos caras usando la prueba exacta para una distribución hipergeométrica.

Análisis de FISH: el ensayo de FISH se realizó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1 y en la descripción detallada del invento. Se evaluó mediante la FISH la relación entre las señales verde y roja en muestra de 29 pacientes que contenían células tumorales. Se contaron un total de 60 células por paciente, y solamente se evaluaron las células que contenían una señal roja y una señal verde. Se hizo una prueba de detección sistemática del tejido tumoral, y se seleccionó para la evaluación el recuento realizado en el área con la desviación más pronunciada con respecto a la relación 1. Las señales del mismo color con una distancia menor o igual al diámetro de las señales se evaluaron como una. En cuanto al equipo pharmDx™ de FISH de HER2 y TOP2A, una relación inferior a 0,8 se consideró una eliminación, mientras que una relación superior a 2,0 se consideró una multiplicación. Las relaciones comprendidas entre 0,8 y 2,0 se consideraron normales.

Análisis IHC para la proteína TS: La proteína TS se evaluó por métodos IHC estándar usando anticuerpo Dako de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

TABLA 1

Características de pacientes (en diagnóstico principal)

	Total		Beneficio clínico		Beneficio no clínico	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pacientes elegibles	24	100	15	63	9	37
Edad en operación (Años)						
Media	51		50		51	
Intervalo	34-76		34-76		35-75	
Tamaño del tumor						
Medio	23		15		25	
Intervalo	8-80		8-60		20-80	
Tumor maligno						
Grado I	4	17	3	20	1	11
Grado II	7	29	4	27	3	33
Grado III	8	33	4	27	4	44
No ductal o						
Desconocido	5	21	4	27	1	11
Estado receptor de hormonas						
Positivo (gen ER						
o PgR)	9	38	7	47	3	33
Negativo	10	42	5	33	4	44
Desconocido	5	21	3	20	2	22
CMF						
Complementaria	9	38	5	33	4	44

Resultados: se recogieron muestras de tejido de los 35 pacientes y se analizaron en cuanto a cambios de números de copias mediante los ensayos de FISH para los cuatro genes involucrados en la incorporación principal del 5-FU al ADN: TYMS, TP, DHFR. Y DPD. Los detalles técnicos se describen en el ejemplo 1 No se identificó tejido de tumor en los bloques de tejido obtenidos de 6 pacientes, y en 5 casos el análisis con FISH no fue satisfactorio para como mínimo 3 de los genes de los pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión. El análisis con FISH fue satisfactorio para 24 pacientes (véase Tabla 3 más adelante). Los pacientes 1 a 15 tuvieron TTP mayor de 6 meses, mientras que los pacientes 16 a 24 tuvieron TTP menores de 6 meses.

De la Tabla 3 se deduce que está claro que el ensayo de DPD no puede servir para predecir el resultado clínico del tratamiento con el 5-FU, puesto que de 8 a 15 pacientes (53%) con respuesta clínica tuvieron una eliminación del gen DPD, mientras que de 6 a 9 pacientes (67%) resistentes al tratamiento con el 5-FU tuvieron una eliminación. En total, 14 de 24 pacientes (58%) mostraron una eliminación de DPD. Sin embargo, las relaciones basadas en los otros 3 ensayos con FISH mostraron una distribución claramente no aleatoria. Un total de 15 pacientes tuvieron un beneficio clínico (TTP > 6 meses) del tratamiento con el 5-FU. Los 15 pacientes tuvieron un número normal de copias de genes de los 3 genes TYMS, TP y DHFR. Un total de 9 pacientes no tuvieron beneficio clínico (TTP < 3 meses). Siete de estos pacientes tuvieron eliminación de al menos uno de los 3 genes. Esta distribución (Tabla 4) es muy significativa ($p = 0,002$).

TABLA 2

Relaciones de los cuatro ensayos de GCN usando una referencia específica de cromosoma situada en el mismo cromosoma que el gene objetivo

Patient	TYMS	DHFR	TP	DPD
1	0,92	1,13	1,02	0,60
2	0,99	1,14	1,04	0,68
3	0,98	1,08	1,00	0,76
4	0,96	1,20	1,06	0,92
5	1,02	1,14	0,97	0,85
6	0,86	1,11	1,01	0,88
7	1,08	1,07	0,93	0,73
8	0,94	1,41	0,84	0,76
9	0,96	1,14	0,92	0,54
10	0,99	1,10	0,98	0,79
11	0,91	0,96	1,03	0,93
12	0,95	1,03	1,06	0,84
13	0,86		0,89	0,86
14	0,94	1,10	1,71	0,68
15	1,01	1,10	1,06	0,99

16	0,59	1,01		0,77
17	0,90	1,16	1,03	0,93
18	1,00	0,46	0,99	0,95
19	0,76	1,49	0,58	0,69
20	0,99	0,76	0,43	0,95
21	0,99	0,81	0,96	0,77
22	0,57	1,21	0,90	0,50
23	0,81	0,77	0,95	0,72
24	1,02	0,74	0,34	0,49
Norm	0,93	1,02	0,96	1,04

Código de colores: Blanco = normal, relación 0,8-2,0;

Verde = eliminación, relación < 0,8; rojo = multiplicación, relación > 2,0

La expresión de la proteína TS se evaluó por IHC. Con respecto al nivel de proteínas, los pacientes se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos de resultados clínicos.

TABLA 3

Distribución de GCN normales y anormales en relación al beneficio clínico

	Número normal de copias de los 3 genes (TYMS, DHFR, TP)	Número anormal de copias de al menos 1 de los 3 genes	Total
Beneficio clínico	15 (100%)	0 (0%)	15 (62,5%)
Sin beneficio clínico	2 (22%)	7 (78%)	9 (37,5%)
Total	17 (71%)	7 (29%)	24 (100%)

Nueve de los pacientes analizados recibieron previamente un tratamiento complementario que contenía 5-FU. Cinco de ellos tuvieron un TTP mayor de 6 meses, y un GCN normal. De los 4 pacientes con un TTP menor de 3 meses, dos tenían un GCN normal y dos tenían un GCN anormal.

Discusión: Estos datos preliminares muestran que un ensayo de FISH con 3 genes (TYMS, DHFR y TP) puede predecir resistencia al tratamiento v con el 5-FU. La resistencia está en relación de asociación con la eliminación de al menos uno de los genes. El genotipo resistente se identificó en el tumor primario, y la resistencia a la terapia con

el 5-FU parece haberse preservado en gran escala. Por tanto, la resistencia es una característica presente en las células tumorales antes de iniciarse el tratamiento con el 5-FU, y por tanto no es una característica adquirida durante el (o como consecuencia del) tratamiento. En esta serie de pacientes, el estado de los genes de TS no añadió información alguna al valor predictivo, por lo que este gen se podría haber omitido en el análisis. No obstante, esta observación se confirmará en una serie más extensa de pacientes que incluya el análisis de los 4 genes adicionalmente a los genes TK y MTHFR. Este estudio es la primera observación de las eliminaciones de genes en el camino del 5-FU.

La proteína TS valorada por IHC no se correlacionó con el estado de los genes ni con el resultado clínico.

Ejemplo 3

Sondas para el 5-FU, MTX y tratamiento combinado conteniendo el 5-FU y el MTX, por ejemplo un tratamiento con CMF

Sondas con FISH

1. TYMS (timidilato sintasa) en 18p11.32
2. TP (ECGF1) (timidina fosforilasa) en 22q13.32
3. DPD (DPYD) dihidropirimidina dehidrogenasa) en 1p22.
4. DHFR (dihidrofolato eductasa) en 5q11.2-q13.2
5. TK1 (timidina quinasa) en 17q25.2-q25.3
6. MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa) en 1p36.3
7. ERCC1 (excisión del grupo de complementación cruzada 1) en 19q13.2
8. XPD (Xeroderma pigmentoso gen D)

La timidina quinasa (TK1 alias TK) cataliza la fosforilación de la timidina a desoxitimidina monofosfato. El gen está situado en 17q25.2-q25.3. El gen contiene inserciones sin codificar y numerosas secuencias Alu. La secuenciación de nucleótidos indicó una considerable conservación evolutiva del gen TK. La secuenciación de la totalidad del gen TK humano de 12.9 kb (Flemington 1967) y de las regiones flanqueantes demostró que el gen TK se compone de 7 exones. En la región flanqueante 5-prima del gen TK (Sauve 1990) está situada una posición de secuencias de nucleótidos que puede actuar como una zona de fijación para los factores intermoleculares así como para las secuencias potenciales de acciones intramoleculares. Estas últimas se compararon con las del activador del gen humano PCNA. Ambos genes TK y PCNA se expresan en grado máximo en el límite G1/S del ciclo celular.

La homeostasis de folato intracelular depende de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), una enzima crítica en el metabolismo del folato que cataliza la conversión irreversible del 5-metiltetrahidrofolato. El sustrato 5,10-metilentetrahidrofolato se requiere para la síntesis del ADN y para mantener el equilibrio del agrupamiento de nucleótidos, mientras que el 5-metiltetrahidrofolato se requiere para reacciones de metilación, incluyendo la metilación de homocisteína a metionina y el mantenimiento de los patrones de metilación del ADN (OMIM, 607093).

Se ha propuesto un polimorfismo de la mutación C677T para modular el efecto citotóxico del 5-FU y del MTX (metotrexato), porque los modos de acción del 5-FU y del MTX dependen críticamente de la composición celular de los folatos. Sohn y colaboradores (2004) demostraron que las estirpes celulares con MTHFR C677T mutante habían disminuido la actividad del TYMS, cambiado la distribución intracelular del folato, acelerado la tasa de crecimiento, y aumentado la actividad del TYMS. En dos estirpes celulares de cánceres de mama y colon, respectivamente, la mutación C677T aumentó la quimiosensibilidad al 5-FU, pero disminuyó la quimiosensibilidad de la estirpe celular de la mama al MTX.

Basándose en estas observaciones preliminares *in vitro*, se propone que los cambios de números de copias (en adelante CNC) de los genes MTHFR y TK sean predictivos para el resultado del paciente cuando se le trate con el 5-FU, con el MTX o con regímenes combinados que contengan estos fármacos, por ejemplo, el tratamiento con CMF.

ES 2 350 648 T3

TABLA 4

Clasificación de herencia mendeliana en línea en el hombre (en adelante OMIM) de los marcadores específicos de cáncer mencionados en el texto

Locus de gen	Gen	Proteína	Función	Nombres alternativos
1p36.3	MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa	Metabolismo de folatos, cofactor para el DHFR	
1p22	DPYD	Dihidropirimidina dehidrogenasa	Enzima inicial y limitadora de tasa en el catabolismo de uracilo y timidina	DHPD;DPD
1q43	MTR	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltranssferasa	Convierte el N5-metiltetrahidrofolato en tetrahidrofolato	MTR
5q11.2	DHFR	Dihidrifolato reductasa	Convierte el dihidrofolato en tetrahidrofolato	CG 14887 CT34709
8q24.12-q24.13	MYC		Oncógeno	c-myc
9p21	CDKN2	Inhibidor de quinasa 2A dependiente de ciclina	Involucrado en inversiones, translocaciones y eliminaciones	P16; p19; p14; TP16; MST1
11q13	CCND1	Ciclina D1		Ciclina D1 Pradl; BCL1 1
16q22.1	CDH1	Cadherina E		CADHERIN 1
17p13.1	TP53	p53	Proteína relacionada con transformación	TRP53
17q25.2-q25.3	TK1	Timidina quinasa	Cataliza la fosforilación de timidina a desoxitimidina	TK
17q21	ERBB2	HER2	Receptor	Her-2/neu

17q21	TOP2A	TopoII α	Topoisomerasa	TOP2
18p11.32	TYMS	Timidilato sintasa		TS; TMS dTMP sintasa
19q13.2	ERCC1	Gen de excisión del grupo de complementación cruzada 1	Gen de reparación de ADN	UV20
19q13.2-q13.3	XPD	Xeroderma pigmentoso Grupo D	Gen de reparación de ADN	XP, XPCD, TTD1, XPH
22q13	TP	Timidina fosforilasa	Defosforilación reversible de timidina y análogos	ECGF β , factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas
Centrómero 2 y 10	Repetir	Establecimiento de ploidía	Nivel de aneuploidía del tumor	Unidad de repetición de alfa

Ejemplo 4

Estudio similar en cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello u otros tipos de cáncer

Se están planificando estudios retrospectivos que usan el equipo que comprende sondas para genes del camino del 5-FU basados en ensayos clínicos y series de pacientes con cáncer colorrectal y de cabeza y cuello. Uno de estos ensayos es un ensayo neocomplementario en pacientes con tumores en la cavidad oral, bucofaríngeos, hipofaríngeos y de laringe que fueron seleccionados de forma aleatoria a la terapia locorregional en función de tres ciclos de cisplatina y del 5-FU seguidos por terapia locorregional. Se ha recuperado el tejido tumoral de archivo de los pacientes que recibieron previamente el 5-FU complementario de acuerdo con el régimen Mayo después de un cáncer colorrectal completamente reseccionado. Se han analizado los pacientes con IHC en cuanto a la expresión del TS mostrando un valor no predictivo de la expresión de la proteína TS (resumen de ASCO 2005). Está en planificación una evaluación de valor predictivo del equipo que comprende sondas para genes del camino del 5-FU. Se espera que ambos estudios muestren la correlación entre resultado clínico y cambios de GCN en el camino del 5-FU.

Ejemplo 5

Estudio de cáncer de mama complementario (protocolo 77-B y protocolo 82-C)

El Grupo cooperativo danés para el cáncer de mama (en adelante DBCG) ha realizado dos extensos ensayos aleatorizados que documentan la eficacia de la combinación de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo, (en adelante CMF). El ensayo 77B del DBCG incluía pacientes pre-menopáusicas con cáncer de mama invasivo y un tumor primario mayor de 5 cm reseccionado por mastectomía, o nodos auxiliares patológicamente involucrados extirpados en disección auxiliar. No se permitió un cáncer de mama localmente avanzado o una enfermedad a distancia. Los pacientes que participaron en el ensayo 77-B del DBCG se seleccionaron de forma aleatoria sólo a radioterapia (N= 287) o a radioterapia en combinación con un único agente de ciclofosfamida (N = 424) o a la CMF (N= 432). El ensayo 82-C del DBCG incluía pacientes postmenopáusicas con criterios de inclusión de otro modo similares, por ejemplo, cáncer de mama operable y, o bien un tumor primario mayor de 5 cm, o bien posibles nodos auxiliares. Los pacientes participantes en el ensayo 82-C del DBCG se seleccionaron de forma aleatoria para un año de tamoxifeno (N = 432) o a tamoxifeno más una CMF (N = 432). El valor predictivo del equipo que comprende sondas para genes

del camino del 5-FU se cuantificará mediante la razón de riesgo en un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Se espera que estos dos ensayos aleatorizados extiendan las observaciones expuestas en el ejemplo 2 para la monoterapia con el 5-FU para incluir también el 5-FU que contenga un tratamiento combinatorio, CMF.

Ejemplo 6

Diseño de equipo con diferentes sondas de referencia

Se explorará un diseño alternativo del equipo para la detección de los niveles de los genes en el camino del 5-FU. En el ejemplo 2, se usaron cuatro sondas de referencia, cada una situada en el mismo cromosoma que los genes objetivo. Se probará si la solución se puede sustituir por otros diseños de equipos sin pérdida de especificidad y sensibilidad de diagnóstico. Usando el centrómero 18 disminuye la sensibilidad de diagnóstico, y se probarán otras sondas de centrómero, preferiblemente el centrómero y el centrómero 10.

TABLA 5

Relaciones de los cuatro ensayos de CGN usando sonda de referencia del cromosoma 18

PACIENTE	TYMS	DHFR	TP	DPD
1	0,92	1,36	1,20	0,76
2	0,99	1,41	1,37	0,96
3	0,98	0,88	0,86	0,68
4	0,96	1,98	1,54	1,01
5	1,02	1,50	0,83	0,74
6	0,86	1,62	1,17	1,05
7	1,08	1,18	1,61	1,22
8	0,94	0,94	0,79	1,03
9	0,96	0,93	0,79	0,56
10	0,99	1,05	1,01	1,10
11	0,91	1,00	1,41	1,60
12	0,95	1,04	0,67	0,82
13	0,86		0,82	0,69
14	0,94	0,84	0,98	0,65
15	1,01	0,74	0,73	0,71

16	0,59	1,19		0,91
17	0,90	1,04	0,66	0,85
18	1,00	0,54	1,91	0,95
19	0,76	1,14	0,44	0,61
20	0,99	1,24	1,10	1,11
21	0,99	1,10	0,73	0,76
22	0,57	1,23	0,89	0,49
23	0,81	0,94	1,16	1,40
24	1,02	0,94	1,02	1,19
Norm	0,93	0,95	0,99	0,96

El gen DPD se distribuye de forma diferente a la que se ha visto en el Ejemplo 2: siete de 15 pacientes (47%) con respuesta clínica tuvieron una eliminación del gen DPD, mientras que 3 de 9 pacientes (33%) resistentes al tratamiento con el 5-FU tuvieron una eliminación. En total, 10 de 24 pacientes (42%) mostraron una eliminación del DPD.

TABLA 6

Distribución de números de copias de genes normales y anormales en relación con el beneficio clínico usando el centrómero 18 como referencia

	Número normal de copias de los 3 genes (TYMS, DHFR, TP)	Número anormal de copias de al menos 1 de los 3 genes	Total
Beneficio clínico	11 (73%)	4 (27%)	15 (62,5%)
Sin beneficio clínico	3 (33%)	6 (67%)	9 (37,5%)
Totales	14 (58%)	10 (42%)	24 (100%)

La distribución no es significativa ($p = 0,20$). Ni la inclusión del gen DOD ni la exclusión del gen TP resultarán en un patrón significativo de distribución. Se probarán referencias alternativas, y se determinará el número mínimo requerido de sondas de referencia.

Ejemplo 7

Cambios de números de copias de genes para la resistencia al 5-FU en cáncer colorrectal

Un paciente de 41 años de edad recibió, después de una resección completa de un carcinoma de colon Duke's B un tratamiento complementario con 5-fluorouracilo (5-FU). El tratamiento fue de acuerdo con la pauta terapéutica de Mayo, que incluía una infusión por inyección intravenosa de 5-FU (425 mg/m²) e isovorina (10 mg/m²) durante 5 días repetido cada 4 semanas para un total de 6 ciclos. Catorce meses y medio después de la iniciación del tratamiento complementario, el paciente tuvo una recaída de la enfermedad, y subsiguientemente, el paciente falleció 4 meses después, lo que podría deberse a la resistencia de la terapia al 5-FU.

Se analizó con carácter retrospectivo el tejido del tumor en cuanto a los caminos en los números de copias de genes (CGN) mediante una FISH usando sondas para 3 genes (DHFR, TYMS y TP), véase Ejemplo 1, involucrado en la incorporación principal del 5-FU al ADN. El procedimiento de la FISH se realizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Se determinó por separado cada uno de los marcadores.

Según se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2, se evaluó la relación entre las señales roja y verde, y solamente se evaluaron las células que contenían una señal roja y una señal verde. Se realizó una identificación sistemática del tejido tumoral y se seleccionó para evaluación la desviación más pronunciada con respecto a la relación 1. La relación entre el cromosoma y el gen TP en las células tumorales era inferior a 0,8, lo que indicaba una eliminación del gen TP. Esta observación sugiere con mucha fuerza una correlación con el fallo del tratamiento con el 5-FU.

Ejemplo 8

Cambios de los números de copias de genes para la resistencia del 5-FU al cáncer de cabeza y cuello

Se trató a un paciente con pocos años después de los sesenta que tenía un cáncer metastásico de cabeza y cuello con una infusión de 5-fluorouracilo (5-FU) a una dosis de 1000 mg/m² por cada 24 horas. El tiempo total de la infusión fue de 120 horas. Tras un mes y medio, se evaluó la respuesta al tratamiento y se averiguó que el paciente tenía una enfermedad progresiva. A continuación de la progresión en el 5-FU, se administró al paciente por vía intravenosa cisplatino en una dosis de 100 mg/m². El tratamiento con 5-FU y cisplatino se repitió en cada tercera semana durante un máximo de diez ciclos o hasta la enfermedad progresiva o la inaceptabilidad a la toxicidad. Después de otros 2 meses en tratamiento con cisplatino, el paciente falleció. Aparentemente, fracasó el tratamiento, lo cual podría deberse a la resistencia a la terapia.

Se analizó con carácter retrospectivo el tejido del tumor en cuanto a los cambios en los números de copias de genes (CGN) mediante una FISH usando sondas para 3 genes (DHFR, TYMS y TP), véase Ejemplo 1, involucrado en la incorporación principal del 5-FU al ADN. El procedimiento de la FISH se realizó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Se probó por separado cada sonda.

Según se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2, se evaluó la relación entre las señales roja y verde, y solamente se evaluaron las células que contenían una señal roja y una señal verde. Se realizó una identificación sistemática del tejido tumoral y se seleccionó para evaluación la desviación más pronunciada con respecto a la relación 1. La relación entre el cromosoma y el gen TYMS en las células tumorales era inferior a 0,8, lo que indicaba una eliminación del gen TYMS. Esta observación sugiere con mucha fuerza una correlación con el fallo del tratamiento con el 5-FU.

Ejemplo 9

Distribución del número normal y anormal de copias de genes en el cáncer colorrectal y en el cáncer de cabeza y cuello

Se investigó la distribución de los números normales y anormales de copias de genes para un extenso grupo de pacientes que padecían cáncer colorrectal o cáncer de cabeza y cuello, respectivamente. Se llevaron a cabo procedimientos de FISH como los que se han descrito en los Ejemplos 1 y 2. Las sondas de referencia usadas para los genes MTR, MTHFR y TK1 eran sondas específicas del APN para regiones de centrómeros en el cromosoma 1 (MTR y MTHFR) y 17 (TK1), respectivamente. La sonda de MTR utilizada era una sonda de ADN que se fijaba a una región situada en el cromosoma 1q43. En las Tablas 7, 8 y 9 se presentan los resultados.

TABLA 7

Distribución de números normales y anormales de copias de genes en el cáncer colorrectal

	Número normal de copias	Eliminados	Multiplicados
DHFR	232	8	0
TP	317	31	0
TYMS	325	17	0
TK1	33	1	1
MTHFR	36	0	0
MTR	19	0	0

Quando se usó un corte de 0,8 para una eliminación y de 2,0 para multiplicación, 8 de 218 pacientes (3,7%) presentaron eliminación del gen DHFR. Veintinueve de 299 pacientes (9,7%) presentaron eliminación del gen TP. Diecisiete de 302 pacientes (5,6%) presentaron eliminaciones del gen TYMS. Uno de 34 pacientes (2,9%) presentó eliminación, y 1 tuvo multiplicación del gen TK1, mientras que no se detectaron eliminaciones de los genes MTHFR y MTR.

TABLA 8

Distribución de GCN normales y anormales en el cáncer de cabeza y cuello

	Número normal de copias	Eliminados	Multiplicados
DHFR	34	3	0
TP	32	4	0
TYMS	25	1	0

Quando se usó un corte de 0,8 para una eliminación y de un 2,0 para multiplicación, 3 de 37 pacientes (8,1%) presentaron eliminación del gen DHFR. Cuatro de 36 pacientes (11%) presentó eliminación del TP, mientras que para el gen TYMS se detectó 1 eliminación en 1 de 26 pacientes (3,8%).

En la Tabla 9 se muestra la distribución de números normales y anormales de copias de genes para cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal. Ocho de 27 pacientes con cáncer de cabeza y cuello (29,6%) presentó eliminación en al menos 1 de los 3 genes (TYMS, DHFR, TP), mientras que 48 de 284 pacientes con cáncer colorrectal (16,9%) presentó eliminación de al menos 1 de los 3 genes. Para ambos cánceres, el número total es de pacientes con números normales de copias en los 3 genes o con eliminación de al menos 1 de los 3 genes.

TABLA 9

	Número normal de copias de los 3 genes (TYMS, DHFR, TP)	Número anormal de copias de al menos 1 de los 3 genes (TYMS, DHFR, TP)	Total
Cabeza y cuello	19 (70,4%)	8 (29,6%)	27 (100%)
Cáncer colorrectal	236 (83,1%)	48 (16,9%)	284 (100%)

Referencias

1. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer (eficacia del tratamiento con fluorouracilo y ácido folínico en el cáncer de colon). Investigadores del International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT). *Lancet* 1995; 345:939-44.
2. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials (Efectos de la quimioterapia y de la terapia hormonal para cáncer incipiente de mama). *Lancet* 2005; 365: 1687-717.
3. Ingvarsson S. Molecular genetics of breast cancer progression (Genética molecular de la progresión del cáncer de mama. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 277-88.
4. Thotlacius S, Thorgilsson B., Bjornsson J y colaboradores. TP53 mutations and abnormal p53 protein staining in breast carcinoma related to prognosis (Mutaciones del TP53 y tinción anormal de proteína p 53 en carcinomas de mama relacionados con prognosis). *Eur J Cancer* 1995; 31^a: 1856-61.
5. Overgaard J, Yilmaz M, Guldberg P, Hansen LI, Alsner J. TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer (La mutación del TP53 es un marcador de pronóstico independiente para resultados deficientes tanto en cáncer de mama negativo como en cáncer de mama positivo). *Acta Oncol* 2000; 39: 327-33.
6. Geisler S, Lonning PE, Aas T y colaboradores. Influence of TP53 alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer (Influencia de las alteraciones del gen TP53 en la expresión del oncogén c-erbB-2 sobre la respuesta al tratamiento con doxorubicina en cáncer de mama localmente avanzado). *Cancer Res* 2001; 61: 2505-12.
7. Mouridsen, H. T., Andersen J, Andersson, M., Donbomowsky, P., Ejlersten., B., Rose, C., Sorensen, P. G., Sandberg, E., Andersen, K., Jensen, M., B., Bengtson, N. O., Berg, J., y Nordenskjöld, B. Adjuvant anthracycline in breast cancer. Improved outcome in premenopausal patients following substitution of methotrexate in the CMF combination with epirubicin (Tratamiento complementario con antraciclina en el cáncer de mama. Resultado mejorado en pacientes premenopáusicas tras la sustitución de metotrexato por epirubicina en la combinación de CMF. *Proc Am Soc Clin Oncol* 18, 68^a. 1999. Ref Type; Abstract
8. Knoop AS, Knudsen H, Baislev E y colaboradores. Retrospective analysis of topoisomerase IIa in amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil (Análisis retrospectivo de topoisomerasa en multiplicaciones y eliminaciones como marcadores predictivos en pacientes de cáncer de mama primario asignados aleatoriamente a ciclofosfamida, metotrexato, y fluorouracilo, o ciclofosfamida, epirubicina, y fluorouracilo). Grupo Danés de Cooperación para el cáncer de mama. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7483-90.
9. Berger JM, Gambin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II (Estructura y mecanismo de la topoisomerasa II del ADN), *Nature* 1996; 379: 225-32.
10. Coukell AJ, Faulds D. Epirubicin. An updated review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in the management of breast cancer (Epirubicina. Una revisión actualizada de sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas y el rendimiento terapéutico en la gestión del cáncer de mama). *Drugs* 1997; 53; 453-82.
11. Muss HB, Thor AD, Berry DA y colaboradores. c-erbB expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer (Expresión del oncogén c-erbB-2 y respuesta a la terapia complementaria en mujeres con cáncer incipiente positivo de mama). *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-1266.
12. Thor AD, Berry DA, Budman DR y colaboradores. ErbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer El oncogén erbB-2, p53, y la eficacia de la terapia complementaria en el cáncer de mama linfático positivo). *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1346-60.
13. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C y colaboradores. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer (Acumulación de la proteína p53 y respuesta a la quimioterapia complementaria en mujeres premenopáusicas con cáncer de mama incipiente negativo). *J Clin Oncol* 1998; 16: 470-479.
14. Palk S, Bryant J, Tan-Chiu e y colaboradores. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-1 (El gen HER2 y la elección de quimioterapia complementaria para cáncer de mama invasivo. Protocolo B-15 de proyecto nacional de cirugía complementaria de mama e intestino). *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1991-98.

15. Di **Leo A, Larsimont D, Gancberg D** y colaboradores. HER2 and topo-isomerase II alpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide (El gen HER2 y la topoisomerasa II alfa como marcadores predictivos en una población de pacientes con cáncer de mama positivo tratados aleatoriamente con CMF complementaria o epirubina más ciclofosfaamida). *Ann Oncol* 2001; 12: 1081-89.
16. **Jarvinen TA, Tañer M, Rantanen V** y colaboradores. Amplification and deletion of topoisomerase II alpha associated with ErbB. 2 amplification and effect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer (Multiplicación y eliminación de topoisomerasa II alfa en relación de asociación con la multiplicación del ErbB-2 y efecto de la sensibilidad a la doxorubicina inhibidora de topoisomerasa II en el cáncer de mama). *Am J Pathol* 2000; 156: 839-47.
17. **Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S** y colaboradores. Amplification and overexpression of topoisomerase II alpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer (Multiplicación e hiperexpresión de la respuesta de predicción de la topoisomerasa II alfa a la terapia basada en antraciclina en cáncer de mama localmente avanzado). *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1061-67.
18. Di **Leo A, Gancberg D, Larsimont D** y colaboradores. HER-2 amplification and topoisomerase II alpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (Multiplicación del gen HER-2 y anomalías de genes de la topoisomerasa II alfa como marcadores predictivos en pacientes con cáncer de mama positivo tratados aleatoriamente o bien con una terapia basada en antraciclina o bien con ciclofosfamida, metotrexato, y 5 fluorouracilo). *Clin Can Res* 2002; 8: 1107-16.
19. **Park K, Kim J, Lim S.** Topoisomerase II alpha (topoII) and Her-2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy (La topoisomerasa II alfa (topoII) y la multiplicación del gen HER-2 en cánceres de mama y respuesta a la quimioterapia preoperatoria con doxorubicina. *Eur J Cancer* 2003; 39: 631-34.
20. **Harris LN, Yang L, Liotcheva V** y colaboradores. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy (La inducción de la actividad de la topoisomerasa II después de la activación del ErbB2 está en relación de asociación con una respuesta diferencial a la quimioterapia del cáncer de mama). *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1497-504.
21. **Reed E,** Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum-based anti-cancer chemotherapy (Aducto de platino-AND, reparación por excisión de nucleótidos y quimioterapia anti-cáncer basada en platino). *Cancer Treat Rev* 1998; 24:331-44.
22. **Jiang H, Yang LY.** Cell cycle checkpoint abrogator UCN.01 inhibits DNA repair: association with attenuation of the interaction of XPA and ERCC1 nucleotide excision repair proteins (El abrogador UCN-01 de punto de comprobación del ciclo celular inhibe la reparación del AND, asociación con la atenuación de la interacción de las proteínas de reparación por excisión de nucleótidos del XPA y ERCC!). *Cancer Res* 1999; 59: 4529-34.
23. **Leichman CG.** Thymidilate synthase as a predictor of response (La timidilato sintasa como un predictor de respuesta). *Oncology* (Williston Park). 1998; 12: 43-47.
24. **Lenz HJ, Danenberg KD, Leichman Cg** y colaboradores. p53 and thymidilate synthase expression in untreated stage II colon cancer: associations with recurrence, survival, and site (Expresión del p53 y de timidilato sintasa en el cáncer de colon en etapa no tratada II: asociaciones con recaída, supervivencia, y zona). *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1227-34.
25. **Paradiso A, Simone G, Petroni S** y colaboradores. Thymidilate synthase and p53 primary tumor expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients (Expresión de tumor primario con timidilato sintasa y p53 como factores predictivos para pacientes de cáncer colorrectal avanzado). *Br J Cancer* 2000; 82: 560-567.
26. **Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ** y colaboradores. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer (Predictores moleculares de supervivencia después de la quimioterapia complementaria para cáncer de colon). *N Eng J Med* 2001; 344: 1196-206.
27. **Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H.** A polymorphism in the enhancer region of the thymidilate synthase protoer influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil (Un polimorfismo en la región aumentadora del activador de timidilato sintasa influye en la supervivencia de los pacientes de cáncer colorrectal tratados con el 5-fluorouracilo). *Br J Cancr* 2001; 85: 827-30.
28. **Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K** y colaboradores. Relation between thymidilate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method (Relación entre la expresión de timidilato sintasa y la supervivencia en carcinoma de colon, y determinación de la aplicación apropiada del 5-fluorouracilo por el método inmunohistoquímico). *Ann Surg. Oncol* 2000; 7: 193-98.

29. **Edler D, Glimelius B, Hallstrom M** y colaboradores. Thymidilate syntase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy (Expresión de la timidilato sintasa en cáncer colorrectal: un marcador de pronóstico y predictivo de beneficio a partir de la quimioterapia basada en fluorouracilo). *J Clin Oncol* 2002; 20: 1721-28.

30. **Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH** y colaboradores. Prognostic value of thymidilate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Cancer Project collaborative study (Valor de pronóstico de la timidilato sintasa, Ki-67, y p53 en pacientes con cáncer de colon Duke B y C: un estudio de colaboración entre el Instituto Nacional del Cáncer y el Proyecto complementario quirúrgico nacional de cáncer de mama y de intestino). *J Clin Oncol* 2002; 21:241-50.

31. **Chu E, Drake JC, Boorman D, Allegra CJ.** Mechanism of thymidilate synthase inhibition by methotrexate in human neoplastic cell lines and normal human myeloid progenitor cells (Mecanismo de la inhibición de la timidilato sintasa por la inhibición de metotrexato en estirpes celulares neoplásicas humanas y células madre humanas mieloides). *J Biol. Chem* 1990; 265: 8470-8478.

32. **Banerjee D, Mayer Kuchuk P, Caplaux G, Budak-Alpdogan T, Gotlick R, Bertino JR.** Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidilate synthase (Aspectos novedosos de la resistencia a los fármacos dirigida y de la dihidrofolato reductasa y a la timidilato sintasa). *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587: 164-73.

33. **Malet-Martino M, Jolimaitre P, Martino R.** The prodrugs of 5-fluorouracil (Los profármacos del 5-fluorouracilo). *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002; 2: 267-310.

34. **Schuller J, Cassidy J, Dumont E.** y colaboradores. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients (Activación preferencial de capecitabina en tumores a continuación de la administración oral a pacientes de cáncer colorrectal). *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45:291-97.

35. **Omrod D, Holm K, Goa K, Spencer C.** Epirubicin: a review of its efficacy as adjuvant therapy and in the treatment of metastatic disease in breast cancer (Epirubicina; una revision de su eficacia como terapia complementaria y en el tratamiento de enfermedad metastásica en cáncer de mama.). *Drugs Aging* 1999; 15: 389-416.

36. **Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR** y colaboradores. Isolation of genetic supresor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA (Aislamiento de elementos supresores genéticos que induce la resistencia a los fármacos citotóxicos interactivos con la topoisomerasa II del ADN complementario de la topoisomerasa II humana). *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 3231-35.

37. **Berger JM, Gambling SJ, Harrison SC, Wang JC.** Structure and mechanism of DNA topoisomerase II (Estructura y mecanismo de la topoisomerasa II del ADN. *Nature* 1. 1996; 379: 225-32.

38. **Coukell AJ, Faulds D. Epirubicin.** Un updated review of its pharmaco dynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of breast cancer (Epirubicina. Una revisión actualizada de sus propiedades farmaco dinámicas y fármaco cinéticas y su eficacia terapéutica en la gestión del cáncer de mama). *Drugs* 1997; 53: 453-82.

39. **GREENSPAN EM, FIEBRE M, LESNICK G, EDELMAN S.** Response of advanced breast carcinoma to the combination of the antimetabolite, Methotrexate, and the alkylating agent, thio-TEPA (Respuesta del carcinoma de mama avanzado a la combinación del antimetabolito, metotrexato, y el agente alquilante, tiotepa). *J Mt Sinai Hosp. NY* 1963; 30: 246-67.

40. **Cooper, R.G.** Combination chemotherapy in hormone-resistant breast cancer (Quimioterapia combinada en el cáncer de mama resistente a las hormonas). *Proc Am soc Canver Res. Am Soc. Clin Oncol* 10, 15. 1969; 352: 930-942.

41. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (Poliquimioterapia para cáncer de mama incipiente: una vision de conjunto de los ensayos aleatorizados. Grupo de colaboración de ensayistas de cáncer de mama incipiente. *Lancet* 1998; 352: 930-942.

42. **HEIDELBERG C, CHAUDHURI NK, DANNEBERG P.** y colaboradores. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds (Las pirimidinas fluoradas, una nueva clase de compuestos inhibidores de tumores). *Nature* 1957; 179: 663-666

43. **Fung KP, Lam WP, COI YM, Lee CY.** Human tumpur necrosis factor-alpha inhibits glucose transport in cultured Ehrlich ascites tumour cells (El factor alfa de la necrosis de tumores humanos inhibe el transporte de glucosa en las células cultivadas de ascitis tumoral de Erlich.) *Life Sci* 1995; 57:L1-L6.

44. **Wang TL, Diaz LA Jr, RomansK, Bardelli A, Saha S, Galizia G, Choti M, Donehower R, Parmigiani G, Shih IeM, Iacobuzio-Donaahue C, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C.** Digital karyotyping identifies thymidi-

yate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluororacil in metastatic colorectal cancer patients (La cariotipia digital identifica la multiplicación de la timidilato sintasa como un mecanismo de resistencia al 5-fluorouracilo en pacientes con cáncer colorrectal metastásico). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101: 3089-9.

- 5 45. **Lönn U, Lönn S, Nilsson B.** Higher frequency of gne amplification in breast cancer patients who received adjuvant chemotherapy (Mayor frecuencia de multiplicación de genes en pacientes de cáncer de mama que han recibido quimioterapia complementaria). *Cancer*, 1996; 77: 107-12.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el resultado de tratar a un paciente con 5-FU, que comprende

a) incubar una muestra aislada de dicho paciente con una composición que comprende

(i) al menos tres sondas de hibridación *in situ* que se fijan al menos a tres marcadores del camino del 5-FU en relación de asociación con la resistencia principal de las células cancerosas al tratamiento del 5-FU, en donde las sondas de hibridación son sondas de ácidos nucleicos o sondas de análogos de ácidos nucleicos, y en donde los marcadores se seleccionan del grupo consistente en timidina sintasa (en adelante TYMS), dihidrofolato reductasa (en adelante DHFR), Timidina fosforilasa (en adelante TP), dihidropirimidina dehidrogenasa (en adelante DPD), metilentetrahidrofolato reductasa (en adelante MTHFR), timidina quinasa (en adelante TK) y metionina sintasa (en adelante MTR);

(ii) al menos una sonda que se fija a como mínimo un marcador de referencia *in situ*; y opcionalmente

(iii) al menos una sonda de bloqueo;

(b) determinar el nivel de anomalía de genes los al menos tres marcadores de (a) en dicha muestra por un análisis, en donde dicho análisis se basa en la correlación de una señal de dichos marcadores del camino del 5-FU y una señal de dicho al menos un marcador de referencia; y

(c) predecir el resultado del tratamiento con 5-FU en dicho paciente basándose en el nivel de anomalía de gen determinado,

donde dicho paciente es un paciente de cáncer al que no se ha tratado con 5-FU.

2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho análisis es un análisis de genes.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la muestra se obtiene a partir de un tejido seleccionado del grupo consistente en mama, pulmón, colorrectal, próstata, pulmón, cabeza y cuello, estómago, páncreas, esófago, hígado, y vejiga.

4. El método según la reivindicación 1, en el que los marcadores son TYMS, DHFR y TR o TYMS, DHFR y TK.

5. El método según la reivindicación 1, en el que el como mínimo un marcador de referencia es un centrómero seleccionado del grupo consistente en Cen 1, Cen 2, Cen 5, Cen 10, Cen 12, Cen 17, Cen 18 y Cen 22.

FIGURA 2

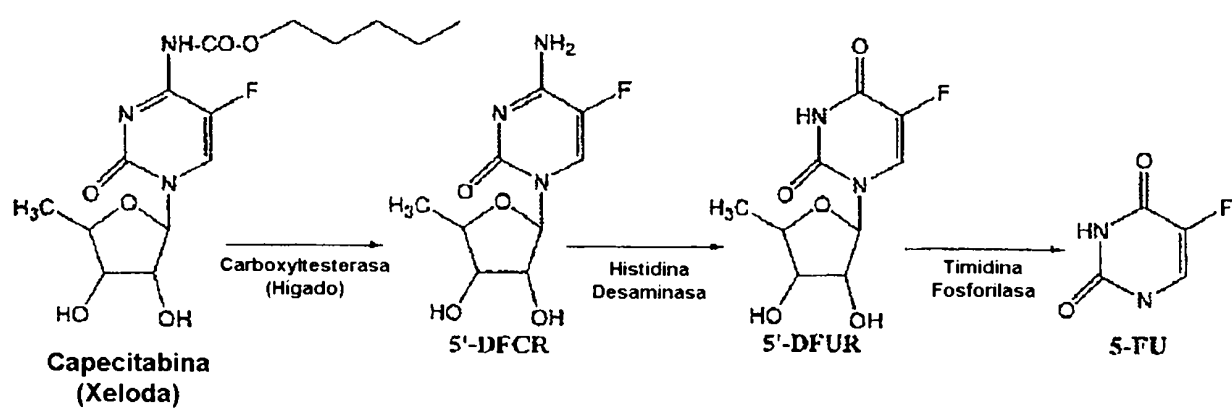


FIGURA 3

Clon	Longitud (kb)	Comienzo (n° de base)	Final (n° de base)	Clon	Longitud (kb)	Comienzo (N° de base)	Final (N° de base)
TYMS							
18p11.32	15,9	663.497	647.622	22q13.33	4,2	49.258.572	49.254.327
RP11-145B19	163,9	622.097	686.036	CTD-2552O4	173,1	49.112.016	49.285.072
RP11-381D10	173,8	611.361	785.199	RP4-579N16	106,7	49.153.144	49.259.882
RP11-806L2	203,7	611.332	715.019	CIT987SK-384D8	138,9	49.229.925	49.368.773
RP11-904T1	206,4	700.619	906.050				
DHFR				DPD			
5q14.1	27,8	79.958.449	79.988.119	1p21.3	843,3	97.255.322	98.098.600
RP11-643F22	198,1	79.882.591	80.079.121	CTD-2601E23	211,0	97.263.564	97.474.536
RP11-90A4	180,5	79.882.591	80.063.088	RP11-595B14	193,4	97.474.544	97.668.332
RP11-957J15	197,0	79.731.156	79.927.638	RP11-373P8	167,4	97.668.368	97.835.711
RP11-120L6	160,5	79.916.645	80.076.177	RP11-134M5	161,6	97.835.721	97.997.335
				CTD-2590D17	221,7	97.456.343	97.678.022

FIGURA 4

Ensayo	Secuencia de objetivo	Longitud	Clones/Situación
TYMS	Centrómero 18	1,7kb	2xBA
DHFR	5p12	561kb	RP11-671H24, 929P16, y 81G1
TP	22q11	408kb	Telómero al valor crítico * de BCR
DPD	1p32	566kb	Telómero al gen ** TAL1

* Esta sonda es parte de las sondas (Y5403) de señal escindida de FISH BCR.

** Esta sonda es parte de las sondas (Y5405) de señal escindida SIL-TAL1 FISH

FIGURA 5

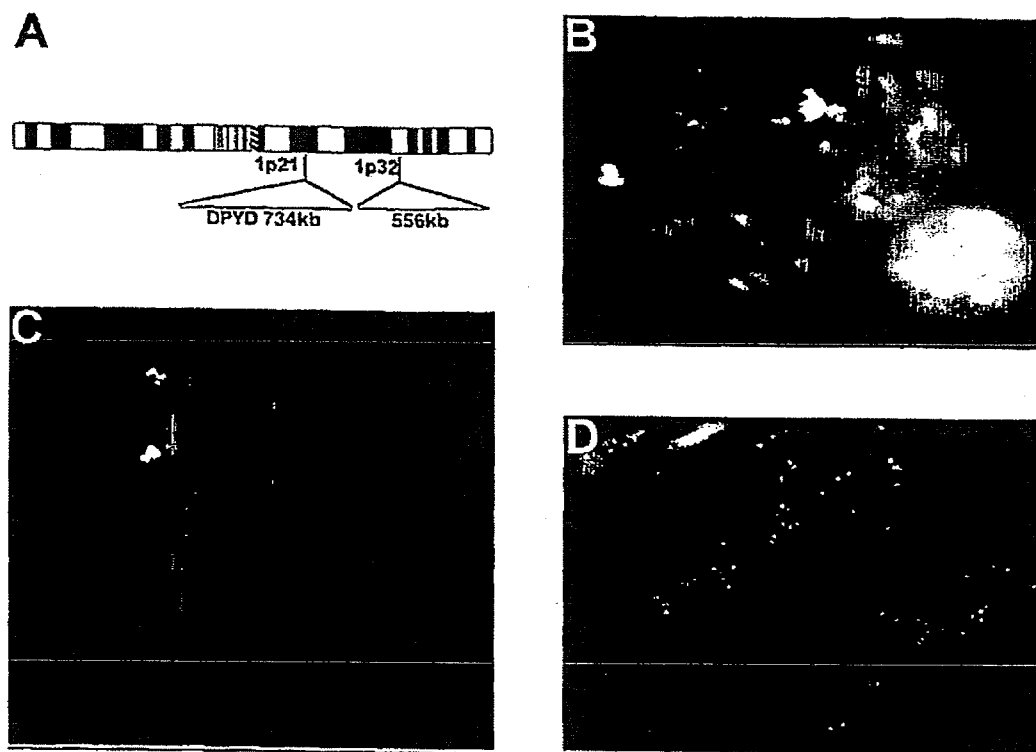


FIGURA 6

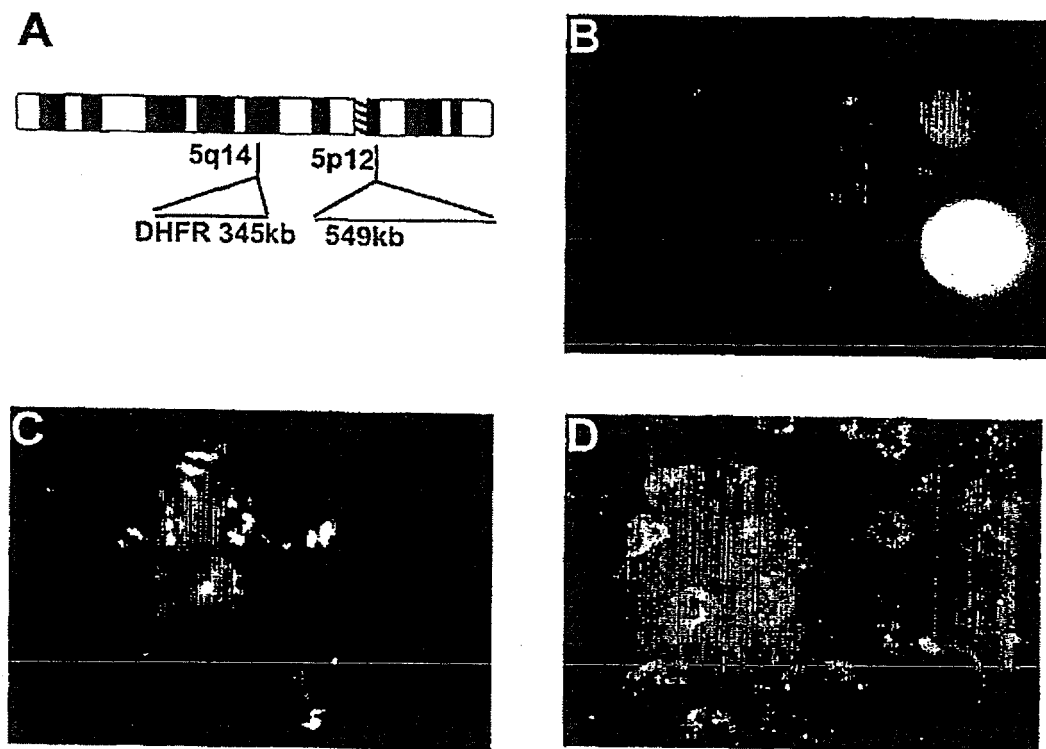


FIGURA 7

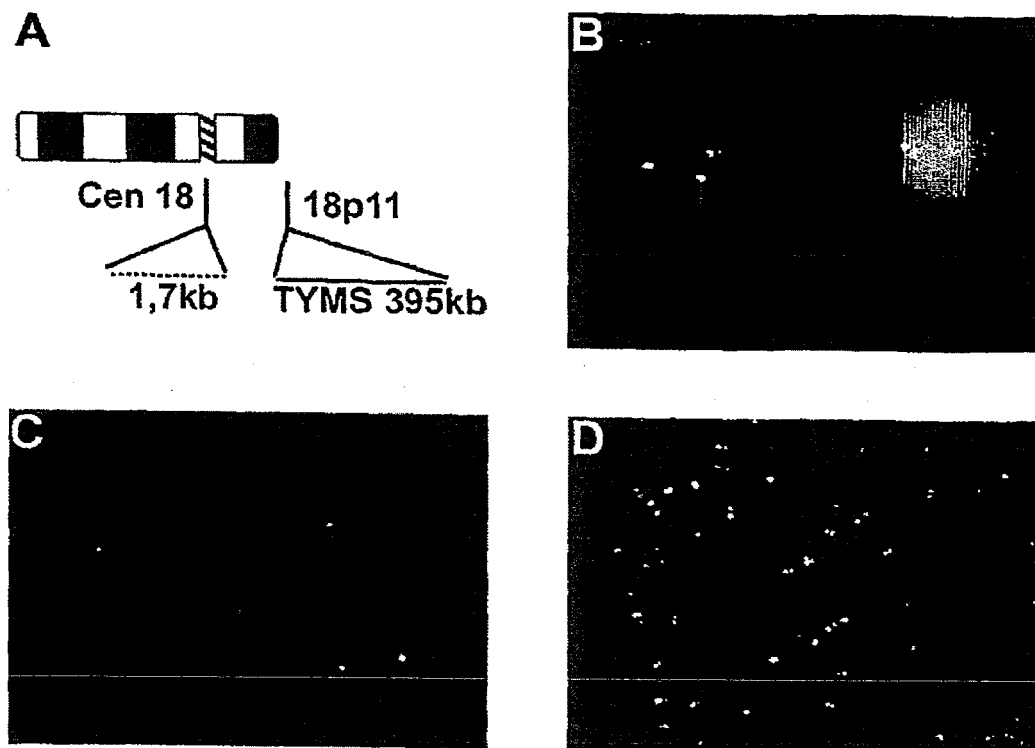


FIGURA 8

