



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 208**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04753702 .2**
96 Fecha de presentación : **28.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1629111**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Métodos y composiciones para predecir la toxicidad del irinotecano.**

30 Prioridad: **30.05.2003 US 474826 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **University of Chicago**
5801 South Ellis Avenue
Chicago, Illinois 60637, US

72 Inventor/es: **Ratain, Mark, J.;**
Innocenti, Federico;
Di Rienzo, Anna y
Grimsley, Carrie

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Métodos y composiciones para predecir la toxicidad del irinotecano.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de farmacogenética y terapia contra el cáncer. Más particularmente, concierne a métodos y composiciones para predecir o anticipar el nivel de toxicidad del irinotecano y otros compuestos glucuronidados por una enzima UGT en un paciente. Tales métodos y composiciones se pueden usar para evaluar si la terapia basada en irinotecano o la terapia que implica un sustrato de UGT puede plantear problemas de toxicidad si se da a un paciente particular. Pueden sobrevenir alteraciones en la terapia sugerida si la toxicidad puede plantear un problema.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

El irinotecano es un inhibidor de la topoisomerasa I que está aprobado mundialmente para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico. El irinotecano tiene un papel bien establecido como agente individual en pacientes refractarios a 5-fluorouracilo (Rougier *et al.*, 1998; Cunningham *et al.*, 1998), así como en combinación con 5-fluorouracilo/leucovorina como terapia de primera línea (Saltz *et al.*, 2000; Rothenberg *et al.*, 2001). Se estudia su papel en el marco del adyuvante.

A pesar de su eficacia en esta enfermedad y su amplio espectro de actividad en otros tipos de tumores, el tratamiento con irinotecano se asocia con toxicidad significativa. Los principales efectos secundarios graves del irinotecano son diarrea tardía y mielosupresión. En los ensayos tempranos de agente único, se produjo diarrea de grado 3-4 en alrededor de un tercio de los pacientes y fue limitante de la dosis (Negoro *et al.*, 1991; Rothenberg *et al.*, 1993). Su frecuencia varía de estudio a estudio y también depende del programa. La frecuencia de la diarrea de grado 3-4 en la pauta de cada tres semanas (19%) es significativamente menor comparada con el programa de una vez por semana (36%, Fuchs *et al.*, 2003). Además de la diarrea, la neutropenia de grado 3-4 también es un hecho adverso común, con alrededor del 30-40% de los pacientes experimentándola en pautas tanto semanales como de cada tres semanas (Fuchs *et al.*, 20003; Vanhoefler *et al.*, 2001). Se han descrito sucesos mortales durante el tratamiento con irinotecano. Se han descrito tasas altas de mortalidad del 5,3 y el 1,6% en las pautas de irinotecano como agente único semanales y de cada tres veces semanas, respectivamente (Fuchs *et al.*, 2003).

Aunque se puede conocer alguna información sobre cómo predecir los pacientes que eventualmente sufrirán efectos secundarios intolerables (Ratain, 2002), la información adicional puede ser útil. Aunque este escenario parece desalentador, el riesgo de efectos secundarios graves se podría predecir entendiendo la farmacología del irinotecano e investigando la variación genética del metabolismo del irinotecano. La hidrólisis del irinotecano por la carboxilesterasa-2 es responsable de su activación a SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), un inhibidor de la topoisomerasa I de mucha mayor potencia que el irinotecano (ref). La principal vía de inactivación del irinotecano es la biotransformación del SN-38 activo en el SN-38 glucuronido (SN-38G) inactivo. Las diferencias entre pacientes en la formación sistémica de SN-38G han mostrado que tienen consecuencias clínicas claras en pacientes tratados con irinotecano. Los pacientes con mayor glucuronidación de SN-38 están protegidos con mayor probabilidad de los efectos secundarios de la diarrea limitantes de dosis en el plan semanal (Gupta *et al.*, 1994). El SN-38 se glucuronida por la UDP-glucuronosiltransferasa 1A1 (UGT1A1) (Iyer *et al.*, 1997).

La variación genética de *UGT1A1* se ha investigado extensivamente en relación a síndromes hiperbilirrubinémicos, ya que la enzima UGT1A1 cataliza la glucuronidación de la bilirrubina (ref). Se han encontrado un número variable de repeticiones (5, 6, 7 y 8) en la caja TATA de *UGT1A1*. La eficacia de transcripción génica se ha correlacionado inversamente con el número de repeticiones TA (Beutler *et al.*, 1998). La homocigosis para el alelo (TA)₇ se ha asociado con la imagen clásica del síndrome de Gilbert, una hiperbilirrubinemia leve clásica (Burchell *et al.*; Monaghan *et al.*). El síndrome de Gilbert también se ha asociado con variantes que codifican mutaciones sin sentido en el gen *UGT1A1*, en particular en poblaciones asiáticas donde estas variantes son relativamente comunes.

Debido a la importancia clínica de la vía de la glucuronidación en tratamientos con irinotecano, *UGT1A1* es el gen candidato a ser investigado para predecir los sucesos de efectos secundarios graves después del tratamiento con irinotecano. Aunque se ha llevado a cabo el análisis retrospectivo de la variación genética de *UGT1A1* en relación a efectos secundarios graves después de varias pautas basadas en irinotecano en pacientes japoneses (Ando *et al.*, 2000), no se ha realizado la evolución prospectiva en un ensayo grande.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en la observación de el nucleótido en posición -3156 en la región corriente arriba de UGT1A1 está correlacionado con la toxicidad del irinotecano. Una A en esa posición se correlaciona positivamente con toxicidad del irinotecano mientras que una G en esa posición se correlaciona con tolerancia a irinotecano. De esta manera, la presente invención concierne a métodos y composiciones para evaluar, predecir, y determinar si un

paciente experimentará toxicidad del irinotecano. La toxicidad del irinotecano se evidencia a si misma como efectos secundarios de la droga, que son bien conocidos para los oncólogos y sus pacientes.

En algunas formas de realización de la invención, hay métodos para predecir si paciente puede padecer o estar sujeto a toxicidad del irinotecano si se le da esa droga. Los métodos implican determinar la secuencia del ácido nucleico de la base -3156 en el promotor de *UGT1A1* en uno o ambos alelos del paciente. La presencia de un nucleótido A indica que la persona tiene riesgo de toxicidad por irinotecano. Un genotipo AA está correlacionado más estrechamente con neutropenia de grado 4 que otros genotipos en esa posición. Además, en algunas formas de realización, esto no está relacionado con el genotipo de la indel TA en el promotor de *UGT1A1*.

Por consiguiente, si una persona se identifica como vulnerable para la toxicidad a irinotecano, se puede contemplar un curso alternativo de terapia o una dosis menor de irinotecano de la que normalmente se da. Además, los métodos también incluyen determinar la secuencia de otros polimorfismos o indels (inserciones/deleciones) en el desequilibrio de ligamiento (LED) con la variante -3156. Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, se evalúa la indel TA para determinar el número de repeticiones. Además, se puede evaluar cualquier otra variante en *UGT1A1* o en cualquier otro gen (el término “gen” incluye regiones no codificantes que afectan el nivel de expresión o actividad del polipéptido codificado) para variantes en LED con la variante -3156.

Las composiciones de la invención incluyen ácidos nucleicos que se pueden usar para determinar la secuencia en la posición -3156 de *UGT1A1* u otros reactivos a ese respecto. También se incluyen matrices y otros ensayos para el cribado de muestras múltiples como parte de la invención.

El metabolismo de SN-38, un metabolito activo de irinotecano, a través de la glucuronidación representa un mecanismo para proteger a los pacientes de los efectos tóxicos del irinotecano, así una reducción en la glucuronidación de SN-38 contribuye a la probabilidad de que los pacientes experimenten toxicidad asociada con irinotecano. Aunque se han identificado algunas bases genéticas para la glucuronidación reducida de SN-38, se tienen que identificar todavía otras bases. Por lo tanto, permanece una necesidad de métodos y composiciones mejorados para evaluar polimorfismos en uno o ambos genes *UGT1A1* de un paciente y correlacionar un genotipo con los efectos adversos de varias terapias.

La presente invención se basa en el hecho de que la variación genética se correlaciona con la expresión de *UGT1A1* y tiene varias implicaciones clínicas importantes. Los métodos y composiciones mejorados de la presente invención se pueden usar para determinar si un tratamiento tiene propensión a afectar de forma adversa a un paciente o qué tratamiento puede ser apropiado o inapropiado para un paciente particular. La transcripción basal de *UGT1A1* está afectada por una repetición (TA) polimórfica (ver Fig. 4, leyenda en Innocenti *et al.*, 2002), además de un módulo potenciador que responde a fenobarbital (PBREM) que contiene variantes que afectan la expresión inducible del gen, como se describe aquí. Un “polimorfismo” o “polimorfismo genético”, como se menciona aquí, es la existencia de dos o más formas variantes de una característica particular, por ejemplo, un único nucleótido o una repetición de un nucleótido o nucleótidos. En general, las variaciones son debidas a la adición, delección, o sustitución de uno o más nucleótidos en un sitio o una variación en el número de repeticiones en tándem de una secuencia de ADN. En varias formas de realización, se pueden usar otros polimorfismos dentro o fuera del locus del gen *UGT1A1*, ver el número de acceso a Genbank AF297093 que se incorpora aquí por referencia, siempre que se pueda establecer una asociación de un polimorfismo con un fenotipo y/o haplotipo particular. Se pueden encontrar métodos ejemplares de determinar el genotipo de un gen *UGT1A1* al menos en las patentes de EE.UU. 6479236, 6472157 y 6395481, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia.

En varias formas de realización de la invención, un desequilibrio de ligamiento significativo entre un polimorfismo (TA) y variantes en el PBREM, u otras variantes dentro o fuera del locus del gen *UGT1*, indican que los pacientes que poseen tales otras variantes pueden ser vulnerables a la toxicidad de irinotecano. “Significativo” como se usa respecto al desequilibrio de ligamiento, determinado por el experto en la materia, se contempla que es un valor estadístico p ó α que puede ser 0,25 ó 0,1 y puede ser 0,1, 0,05, 0,001, 0,00001 o menor. “Desequilibrio de ligamiento” (“LD” como se usa aquí, aunque también se denomina como “LED” en la técnica) se refiere a una situación donde una combinación particular de alelos (es decir, una forma variante de un gen determinado) o polimorfismos en dos loci aparecen más frecuentemente de lo que se esperaría por azar. Se puede usar la relación entre los haplotipos PBREM-(TA)_n y la tasa de glucuronidación del sustrato de *UGT1A1* SN-38 para correlacionar el genotipo (es decir, la composición genética de un organismo) con un fenotipo (es decir, los caracteres físicos mostrados por un organismo o célula). “Haplotipo” se usa aquí para referirse a un genotipo colectivo de dos o más loci unidos estrechamente. Cada haplotipo define la secuencia de alelos o polimorfismos a lo largo de uno de los cromosomas homólogos. En algunas formas de realización, los polimorfismos pueden estar a 0,001, 0,01, 0,1, 0,2 cM o más entre ellos.

Varias formas de realización de la invención incluyen métodos para evaluar el riesgo de toxicidad del irinotecano, u otros sustratos de *UGT1A1*, en un paciente. Un polimorfismo puede ser un polimorfismo de nucleótido único (SNP) y puede estar en desequilibrio de ligamiento con una repetición (TA)_n. En ciertas formas de realización, los métodos incluyen detectar uno o más polimorfismos en una o ambas copias de gen *UGT1A1* y/o una o ambas copias de otro gen localizado en el locus del gen *UGT1* de un paciente. En formas de realización particulares se detecta polimorfismo en un promotor. Se contempla específicamente que los métodos y composiciones de la invención se pueden realizar para determinar si los polimorfismos de *UGT1A1* están presentes o ausentes en uno o ambos alelos.

ES 2 308 208 T3

En ciertas formas de realización, un polimorfismo puede ser un polimorfismo que afecta la transcripción de *UGT1A1*, tal como en la región del promotor o en la región flanqueante en 5' que afecta la transcripción (que incluye la región del promotor), y en particular un polimorfismo en la posición de nucleótido -3440, -3401, -3279, -3177, -3175 ó -3156 a partir de sitio de inicio de la transcripción del gen *UGT1A1*, que se designa como +1 sin nucleótido designado como 0. El número de repeticiones TA puede ser 5, 6, 7, 8 ó más repeticiones TA. En formas de realización particulares, el polimorfismo es el siguiente: -3440C>A, -3401T>C, -3279G>T, -3177C>G, -3175A>G -3156G>A, o cualquier combinación de los mismos. La notación -3440C>A, por ejemplo indica que el nucleótido citosina (C) en la posición -3440 está remplazado por una adenosina (A).

Los métodos de la invención pueden incluir obtener una muestra de ácido nucleico de un paciente y detectar uno o más polimorfismos en gen *UGT1A1* usando varios métodos. En ciertas formas de realización, la detección del polimorfismo puede incluir amplificar un ácido nucleico que contiene todo o parte de una región particular del gen *UGT1A1* para obtener productos de amplificación; y/o analizar los productos de la amplificación para la presencia o ausencia de uno o más polimorfismos. También se contemplan otros métodos de detección de polimorfismo conocidos en la técnica.

En ciertas formas de realización, se puede detectar un polimorfismo del promotor de un gen *UGT1A1* realizando uno de varios ensayos conocidos. Estos pueden incluir, pero no están limitados a, ensayos de hibridación, ensayos de secuenciación o microsecuenciación, ensayos de amplificación específica de alelo o cualquier otro método conocido para detectar polimorfismos en ácidos nucleicos, que pueden incluir o no la amplificación de un ácido nucleico. Se entiende que "detectar" un polimorfismo incluye identificar la secuencia de nucleótidos en ese sitio y/o determinar si el polimorfismo está presente o ausente.

Se puede usar una correlación entre uno o más polimorfismos y la tasa de glucuronidación de irinotecano u otros sustratos de *UGT1A1*, incluyendo pero sin estar limitado a bilirrubina, estriol, beta-estradiol, 2-hidroxiestriol, 2-hidroxiestrone, 2-hidroxiestradiol, tiroxina (T4), rT3, galato de octilo, galato de propilo, ácido antraflávic, quercetina, fisetina, naringenina, 1-naftol, y etinilestradiol, para determinar varios aspectos de una pauta de tratamiento, incluyendo irinotecano y/o otras drogas o compuestos metabolizados directa o indirectamente por *UGT1A1*. En algunas formas de realización los métodos también incluyen analizar la tasa de glucuronidación asociada con varios polimorfismos y combinaciones de polimorfismos, para métodos y composiciones ejemplares relacionados con el análisis de las tasas de glucuronidación ver la patente de EE.UU. 6319678, que se incorpora aquí por referencia. Los métodos también pueden incluir determinar la capacidad de transporte biliar del paciente. En formas de realización particulares se puede usar la evaluación del polimorfismo del promotor para optimizar la dosis de irinotecano u otros compuestos para el tratamiento de un paciente o para reducir su toxicidad.

Los métodos de la invención pueden incluir además tratar un paciente administrando al paciente irinotecano en combinación con otros agentes farmacéuticos a dosis apropiadas, de modo que se reduzca la toxicidad del irinotecano u otros sustratos de *UGT1A1*. En formas de realización particulares, se puede administrar junto con el irinotecano un segundo agente que reduzca la excreción de una especie de irinotecano activa a través de la bilis en base a determinaciones hechas usando métodos y composiciones de la invención, para métodos y composiciones relacionadas ver las patentes de EE.UU. 6407117, 6287834 y 5786344, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia.

La presente invención también se basa en la observación de que el nucleótido en la posición -3156 en la región corriente arriba de *UGT1A1* se correlaciona con la toxicidad del irinotecano. Una A en esa posición se correlaciona positivamente con la toxicidad del irinotecano mientras que una G en esa posición se correlaciona con tolerancia al irinotecano. De esta manera, la presente invención concierne a métodos y composiciones para evaluar, predecir, y determinar si un paciente experimentará toxicidad por irinotecano. La toxicidad del irinotecano se muestra a sí misma como efectos secundarios de la droga, que son bien conocidos por los oncólogos y sus pacientes.

En algunas formas de realización de la invención, hay métodos para predecir si un paciente puede padecer o ser el sujeto de toxicidad de irinotecano si se le da este que implica determinar la secuencia de ácido nucleico de la base -3156 en la región flanqueante en 5' de *UGT1A1* en uno o ambos alelos del paciente. La presencia de un nucleótido A indica que la persona es vulnerable a la toxicidad de irinotecano. Un genotipo AA se correlaciona más estrechamente con neutropenia de grado 4 que otros genotipos en esa posición. Además, en algunas formas de realización, esto no está relacionado con el genotipo de la indel TA en el promotor de *UGT1A1*. Se contempla que estos métodos relativos a la indel en la posición -3156 en la región flanqueante en 5' de *UGT1A1* se pueden realizar con métodos que implican determinar uno o más polimorfismos en la región flanqueante en 5' de *UGT1A1* del mismo paciente.

Por consiguiente, si una persona se identifica como vulnerable a la toxicidad del irinotecano en base a cualquiera de las formas de realización discutidas aquí, se puede contemplar un curso alternativo de terapia o una dosis menor de irinotecano de la que se da normalmente. Además, los métodos también incluyen determinar las secuencias de otros polimorfismos o indels (inserciones/deleciones) en desequilibrio de ligamiento (LD) con la variante -3156. Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, se evalúa la indel TA para determinar el número de repeticiones. Además, se puede evaluar cualquier otra variante en *UGT1A1* o cualquier otro gen (el término "gen" incluye las regiones no codificantes que afectan el nivel de expresión o actividad del polipéptido codificado) para variantes en LD con la variante -3156.

También se describe un kit para evaluar el riesgo de toxicidad de irinotecano en un paciente. El kit puede incluir varios envases, reactivos y similares. El kit puede incluir un cebador oligonucleótido para amplificar una región del promotor de un gen o genes *UGT1A1*, cebadores para amplificación específica de SNPs etiquetas de haplotipo o alelos del gen *UGT1A1* o cualquier otro cebador dentro del locus del gen *UGT1*. Los cebadores específicos de SNPs etiquetas de haplotipo o alelo se pueden usar para amplificar un polimorfismo en una o más posiciones de nucleótidos de gen *UGT1A1* u otros del locus del gen *UGT1*. En formas de realización particulares, la posición del nucleótido puede estar en -3440, -3401, -3279, -3177, -3175, ó -3156, o una combinación de las mismas, a partir del sitio de inicio de la transcripción de gen *UGT1A1*. El kit puede incluir los cebadores específicos de SNPs etiquetas de haplotipo o alelo en placas de ensayo multipocillo. El kit también puede incluir sondas de hibridación específicas para SNPs etiquetas de haplotipo o alelo para varios polimorfismos del promotor. Las sondas de hibridación específicas para SNPs etiquetas de haplotipo o alelo pueden detectar polimorfismos en las posiciones de nucleótido -3440, -3401, -3279, -3177, -3175, ó -3156 a partir del sitio de inicio de la transcripción de gen *UGT1A1*. El kit puede incluir sondas de hibridación específicas para SNPs etiquetas de haplotipo o alelo comprendidas en una matriz o micromatriz de oligonucleótidos.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para querer decir “y/o” a menos que explícitamente se indique que se refiere a alternativas solo o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas y a “y/o”.

A lo largo de esta solicitud, el término “alrededor” se usa para indicar que el valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa junto con el término “comprender” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, al tiempo que indican formas de realización específicas de la invención, se dan solo a modo de ilustración, ya que serán evidentes varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y ámbito de la invención para los expertos en la técnica de esta descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar además ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor mediante referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de formas de realización específicas presentadas aquí.

Fig. 1. *Correlación entre ANC y el genotipo indel TA*. Las barras representan las medias. Análisis de tendencia no paramétrico ($7/7 < 6/7 < 6/6$, $z = -2,72$, $p = 0,01$).

Fig. 2. *Niveles totales de bilirrubina pretratamiento y distribución de los genotipos -3156 dentro de cada genotipo indel TA*. Los genotipos -3156 AA se describen con cuadrados, los genotipos GA con círculos y los genotipos GG con triángulos. Las barras representan los valores medios. Se describió una tendencia significativa ($7/7 > 6/7 > 6/6$, $z = 2,88$, $p < 0,01$, análisis de tendencia no paramétrico).

Fig. 3. *Correlación entre $\ln(\text{nadir de ANC})$ y los niveles totales de bilirrubina pretratamiento*. Los pacientes con niveles de bilirrubina menores de 0,6 mg/dl se representan con cuadrados. Aquellos con niveles de bilirrubina mayores de 0,7 mg/dl se representan por círculos.

Descripción de formas de realización ilustrativas.

Se citan las siguientes patentes: patente de EE.UU. No. 6395481 y 6472157.

La presente invención proporciona métodos y composiciones mejorados para identificar los efectos de varios polimorfismos, polimorfismos de promotor o cualquier combinación de los mismos en la expresión de *UGT1A1* o la tasa de glucuronidación de *UGT1A1* para evaluación del potencial de riesgo para toxicidad de irinotecano en un individuo o paciente. El desarrollo de estos métodos y composiciones mejorados permite el uso de tal evaluación para optimizar el tratamiento de un paciente y disminuir el riesgo de toxicidad. En ciertos aspectos de la invención se pueden usar varias combinaciones de polimorfismos del promotor en esta evaluación, en particular, se pueden usar polimorfismos en la región PBREM y polimorfismos en las repeticiones TA.

La variación genética en la expresión de *UGT1A1* tiene varias implicaciones clínicas importantes. La transcripción basal de *UGT1A1* está afectada por una repetición (TA) polimórfica. Otro elemento regulador importante en el módulo potenciador que responde a fenobarbital (PBREM) que pueden contener variantes que afectan la expresión génica inducible. Los ejemplos proporcionados aquí estudian el nivel de desequilibrio de ligamiento entre el polimorfismo (TA) y variantes en el PBREM y promotor de *UGT1A1*. La relación entre los haplotipos PBREM-(TA)_n y la tasa de glucuronidación del sustrato de *UGT1A1* SN-38 también se aborda aquí. Los estudios descritos en los ejemplos

ilustran que las tasas de formación de SN-38G se correlacionaban con genotipos (TA) y variantes del promotor. En varios aspectos variantes (TA) particulares están en desequilibrio de ligamiento con varios otros polimorfismos.

Ciertos aspectos de la invención se basan en, pero no están limitados a, la observación y caracterización de nuevos polimorfismos en la región PBREM del gen *UGT1A1*. Debido a las implicaciones clínicas de la regulación de la actividad de *UGT1A1* genéticamente modificada, se secuenció la región PBREM y se genotiparon los polimorfismos en la caja TATA del promotor de *UGT1A1*, como se describe en la sección de Ejemplos más adelante.

I. Glucuronidación hepática por enzimas UGT

La glucuronidación hepática es el resultado de las actividades de una familia multigénica de enzimas UGT, los miembros de la cual muestran especificidad para varios sustratos endógenos y xenobióticos. Las enzimas UGT se clasifican extensamente en dos familias de genes distintos. El locus *UGT1* codifica múltiples isoformas de UGT, todas ellas comparten un C-terminal codificado por una serie única de exones 2-5, pero que tienen un N-terminal variable codificado por diferentes primeros exones, cada uno con su propio promotor independiente (Bosma *et al.*, 1992; Ritter *et al.*, 1992). Los primeros exones variables confieren la especificidad de sustrato a la enzima. Las isoformas de la familia UGT2 son productos génicos únicos de los que se han identificado al menos ocho isoenzimas (Clarke *et al.*, Handbook of Experimental Pharmacology, 1994). La isoforma *UGT1A1* es la enzima principal de glucuronidación de la bilirrubina. Defectos genéticos en el gen *UGT1A1* pueden producir una actividad de glucuronidación disminuida que lleva a niveles anormalmente altos de bilirrubina no conjugada en suero que pueden entrar en el cerebro y producir encefalopatía e ictericia nuclear (Owens & Ritter, 1995). Esta afección se conoce normalmente como síndrome de Gilbert. El defecto molecular en el síndrome de Gilbert es un cambio en la caja TATA en el promotor de *UGT1A1* (Bosma *et al.*, 1995 y Monaghan *et al.*, 1996). Este promotor normalmente contiene un elemento (TA)₆ TAA, pero otro alelo, denominado *UGT1A1**28 o alelo 7, también está presente en poblaciones humanas con alta frecuencia y contiene la secuencia (TA)₇ TAA. Este polimorfismo en el promotor del gen *UGT1A1* da como resultado una expresión reducida del gen y responde por la mayoría de los casos de síndrome de Gilbert (Bosma *et al.*, 1995). En conjunto, los niveles de expresión génica para los alelos del promotor de *UGT1A1* están inversamente relacionados con la longitud de la repetición TA en la caja TATA.

La variación observada en este promotor también puede responder por la variación interindividual e interétnica en el metabolismo de drogas y respuesta a exposición a xenobióticos. Se ha mostrado que las UGTs contribuyen a la detoxificación y eliminación de compuestos tanto exógenos como endógenos. Por ejemplo, un papel típico de la isoforma *UGT1A1* es la glucuronidación de SN-38 (7-etil-10-hidroxycamptotecina) al glucurónido correspondiente (10-O-glucuronil-SN-38, SN-38G) así como la glucuronidación de TAS-103 (diclorhidrato de 6-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-3-hidroxi-7H-indeno[2,1-c]quinolino-7-ona) a su glucurónido correspondiente (TAS-103G). SN-38 es la forma activa del irinotecano (CPT-11, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carboniloxycamptotecina), que es un derivado de la camptotecina usado en el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico y otras neoplasias malignas. El metabolismo de SN-38 y TAS-103 (también conocido como flavopiridol) son meramente ilustrativos de la presente invención, también se contempla el metabolismo de otros sustratos de *UGT1A1*, tal como estradiol, bilirrubina, fenoles simples, flavonas, esteroides de C18, fenoles complejos y cumarinas.

El irinotecano es biotransformado por las carboxilesterasas de tejido y suero a un metabolito activo, SN-38, que tiene una actividad antitumoral de 100-1000 veces mayor que el irinotecano. SN-38 es glucuronidado por las uridina difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) hepáticas para formar SN-38 glucurónido (10-O-glucuronil-SN-38, SN-38G), que es inactivo y se excreta en la bilis y la orina aunque, el SN-38G se podría desconjugar para formar SN-38 mediante la enzima β -glucuronidasa intestinal (Kaneda *et al.*, 1990).

Las principales toxicidades limitantes de dosis de irinotecano incluyen diarrea y, en menor grado, mielosupresión. La diarrea inducida por irinotecano puede ser seria y con frecuencia no responde de forma adecuada a agentes anti-diarreicos convencionales (Takasuna *et al.*, 1995). Esta diarrea puede ser debida a lesión entérica directa producida por el metabolito activo, SN-38, que se ha mostrado que se acumula en el intestino después de la administración intraperitoneal de irinotecano en ratones atímicos (Araki *et al.*, 1993). Los resultados de un reciente ensayo clínico de fase I completado, demostraron que había una relación inversa entre las tasas de glucuronidación del SN-38 y la gravedad de las incidencias de diarrea en pacientes tratados con dosis crecientes de irinotecano (Gupta *et al.*, 1994). Estos descubrimientos indican que la glucuronidación de SN-38 protege contra la toxicidad gastrointestinal inducida por irinotecano. Se puede encontrar una discusión completa de la correlación entre la diarrea y la glucuronidación de SN-38, así como una descripción de los métodos bioquímicos para determinar los niveles de glucuronidación en la patente de EE.UU. 5786344 y WO96/01127 que se incorporan ambas aquí por referencia en su totalidad. Asimismo, los resultados de estudios usando TAS-103 demuestran que la glucuronidación de TAS-103 puede proteger frente a la toxicidad inducida por TAS-103. Por lo tanto, la conversión de estos dos compuestos tóxicos por las UGTs hepáticas demuestra la importancia de seguir la actividad de glucuronidación como un indicador de susceptibilidad a toxicidad causada por exposición a compuestos que se metabolizan por las UGTs. Además, las tasas diferenciales de glucuronidación de SN-38 entre sujetos pueden explicar la considerable variación interindividual en las estimaciones de parámetros farmacocinéticos y toxicidades observadas después del tratamiento con drogas anticáncer o exposición a xenobióticos (Gupta *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1997).

Cuando se analizaron dos especies, ratas Gunn (Gunn, 1938) y pacientes de CN-1, que son deficientes en isoformas *UGT1A1* para la actividad de glucuronidación de TAS-103 y SN-38, hubo aproximadamente un 80% menos en la tasa

de glucuronidación de TAS-103 *in vitro* y glucuronidación de SN-38 no *in vitro* comparado con donantes sanos de hígado. Estos resultados demuestran el papel de la familia UGT1 en catalizar la conjugación de SN-38 y TAS-103. Además, estos resultados demuestran que la familia UGT2 no tiene ningún papel en la glucuronidación de SN-38. Por otra parte, mientras que las isoformas de la familia UGT1 son las isoformas predominantes implicadas en la glucuronidación de TAS-103, la isoforma de la familia UGT2 también puede participar en la glucuronidación de TAS-103. El fallo para glucuronidar SN-38 y TAS-103 en estos casos puede ser el resultado específicamente de defectos genéticos en la familia de genes UGT1.

Otros experimentos confirman la asociación entre la isoforma *UGT1A1* y la glucuronidación de SN-38 y TAS-103. Estos estudios muestran que existe una variabilidad genética sustancial en la familia de la isoforma *UGT1A1* y particularmente en el promotor de *UGT1A1*. Se ha mostrado que esta variabilidad genética se correlaciona con la expresión génica. Por ejemplo, la presencia del alelo 5 en el promotor de *UGT1A1* lleva a un aumento en la expresión génica mientras que la presencia del alelo 8 lleva a una expresión génica reducida. Las diferencias en los niveles de expresión génica pueden dar lugar a individuos con capacidad variables de glucuronidar compuestos metabolizados por UGTs. Esta predicción se confirmó mediante un análisis de correlación del genotipo del promotor de *UGT1A1* y la tasa de glucuronidación *in vitro* de SN-38 y TAS-103.

Resulta por lo tanto que los individuos con el alelo 8 también pueden tener susceptibilidades diferentes a xenobióticos cuando se comparan con otros genotipos si esos compuestos se metabolizan por las UGT1A1s. Por otra parte, la presencia del alelo 5 que se correlaciona con aumento en la expresión génica y mayor actividad de glucuronidación puede dar como resultado la administración de dosis de drogas menores de la óptima. Por ejemplo, cuando se administra una droga metabolizada por UGT1A1s a un individuo con este polimorfismo, la actividad aumentada de glucuronidación puede producir que se convierta más droga en el metabolito inactivo en un período más corto, reduciendo de esta manera la eficacia de la droga. Por el contrario, en el caso raro de drogas y xenobióticos que requieren glucuronidación para su activación, la actividad de glucuronidación reducida puede producir que esté disponible menos de la forma activada de la droga o xenobiótico.

El hecho de que las secuencias repetidas son intrínsecamente inestables y tienden a alargarse o acortarse como resultado de una recombinación desigual durante la meiosis puede explicar la presencia de otros alelos, además de (TA)₆ y (TA)₇, en la población. Se han identificado dos alelos adicionales en las poblaciones humanas: alelo 5, que contiene la secuencia (TA)₅ TAA y alelo 8, que contiene la secuencia (TA)₈ TAA, ver la patente de EE.UU. 6395481, que se incorpora aquí en su totalidad por referencia. De forma interesante, se encontraron los alelos 5 y 8 de forma predominante en muestras de poblaciones del África subsahariana, donde se dan con frecuencias menores que los alelos comunes 6 y 7 aunque es posible que estos dos alelos estén presentes a través de diferentes grupos étnicos. La frecuencia de los alelos 6 y 7 también parece ser significativamente diferente a través de grupos étnicos, con las poblaciones asiática y amerindia mostrando las frecuencias mayores del alelo 6. Por el contrario, los alelos 6 y 7 se dan con frecuencias intermedias y similares entre caucásicos y africanos subsaharianos.

Se pueden proponer varias hipótesis respecto a las presiones selectivas que podrían ser responsables para el patrón observado de variación intrapoblacional en el promotor de UGT1A1. Se ha propuesto previamente que el mantenimiento de niveles intermedios de bilirrubina es adaptativo (Beutler *et al.*, 1998), y que los alelos en este promotor se mantendrían en la población mediante selección de equilibrio. Esta hipótesis se basa en la observación de que la bilirrubina es un potente oxidante que podría tener significación fisiológica (Stocker *et al.*, 1987). Sin embargo, también se sabe que la glucuronidación es un paso de detoxificación importante para muchos compuestos endógenos así como exógenos (Clarke & Burchell, 1994). Además de TAS-103 y SN-38, es probable que UGT1A1 actúe sobre otros sustratos presentes en el medio, por ejemplo, componentes de la dieta, contaminantes del medio ambiente y carcinógenos, que requieren detoxificación así como que tenga un papel en el metabolismo de la bilirrubina y otros compuestos endógenos. En este marco, mantener niveles altos de la expresión génica UGT1A1 aseguraría una eliminación rápida de compuestos tóxicos o endógenos y sería ventajoso.

Como se describe aquí, se ha mostrado que la correlación entre la tasa de glucuronidación *in vitro* y el polimorfismo del promotor de UGT1A1 encontrado para los alelos 6 y 7 se extiende a los alelos 5 y 8. Puesto que estos alelos parecen ser más frecuentes en subseries de poblaciones humanas (por ejemplos, en las de origen africano), se podría esperar una variabilidad interindividual incluso mayor en el metabolismo de SN-38 y TAS-103 dentro de estas poblaciones. Puesto que la relación inversa entre el tamaño de la repetición TA y la tasa de glucuronidación de SN-38 se extiende a los alelos 5 y 8, un ensayo de cribado que identifique estos alelos puede facilitar la individualización de la terapia con drogas, identificar individuos susceptibles a la exposición a xenobióticos, y se puede usar para mejorar los cálculos de dosis de drogas.

A. Experimentos previos que afectan a UGT1A1

Los experimentos que afectan UGT1A1 se describen en la solicitud de patente de EE.UU. No. de serie 10/751606 presentada el 5 de enero de 2004, que se incorpora aquí por referencia. Estos experimentos se describen a continuación.

1. Genotipado del polimorfismo (TA)_N

El alelo (TA)₆ fue el alelo más común con una frecuencia de 0,58 mientras que el alelo (TA)₇ tuvo una frecuencia de 0,36 (tabla posterior). También se encontraron los alelos (TA)₅ y (TA)₈, aunque con frecuencias menores (0,02 y

0,05, respectivamente). En la muestra de población ($n = 107$), el genotipo más común fue 6/7 (0,41), seguido por el genotipo 6/6 (0,34). Los genotipos raros ($< 0,02$) incluyen los genotipos 5/6, 5/7 y 5/8. Las frecuencias de los alelos (TA)₆ y (TA)₇ no fueron significativamente diferentes entre caucásicos y afroamericanos (prueba de ji cuadrado, $P = 0,7$). De forma similar las frecuencias de los genotipos 6/6, 6/7 y 7/7 no fueron diferentes entre los dos grupos étnicos (prueba de ji cuadrado, $P = 0,8$). Un individuo asiático tenía un genotipo 6/6, mientras que dos individuos de otras etnias tenían genotipos 6/7 y 7/7.

Polimorfismo (TA)_n: frecuencias de genotipos

(TA) _n	5/6	5/7	5/8	6/6	6/7	6/8	7/7	8/8
Muestra de población (n=107)	0,01	0,02	0,01	0,34	0,41	0,06	0,13	0,03
Caucásicos (n=56)	0,02	0	0	0,38	0,46	0	0,13	0,02
Afroamericanos (n=39)	0	0,05	0,03	0,26	0,33	0,15	0,13	0,05

2. Secuenciación de PBREM

En 103 muestras, se encontraron seis polimorfismos, y dos de ellos (-3279G>T y -3156G>A) son comunes, con frecuencias de 0,39 y 0,30, respectivamente (Fig. 4, Tabla posterior). Los seis polimorfismos están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P>0,5$). En base a comparaciones con la secuencia del babuino (número de acceso AC091778, que se incorpora aquí por referencia), es posible que -3279G y -3156G sean los estados ancestrales. El polimorfismo más común -3279G>T se localiza en la secuencia espaciadora del dominio NR3 de PBREM (Fig. 4). No se encontraron variantes en el dominio gNR1, el sitio de unión para el receptor constitutivo activo (CAR). -3279G fue significativamente más común en afroamericanos comparado con caucásicos (ji cuadrado = 13,82, $P = 0,001$) mientras que la frecuencia de -3156A no difería significativamente entre los dos grupos étnicos (prueba ji cuadrado, $P = 0,9$).

Secuenciación de PBREM: frecuencias de genotipos

Posición	-3440		-3401		-3279			-3177		-3175		-3156		
Genotipo	CC	CA	TT	TC	GG	GT	TT	CC	CG	AA	AG	GG	GA	AA
Muestra población (n=103)	0,96	0,04	0,99	0,01	0,38	0,46	0,16	0,99	0,01	0,99	0,01	0,49	0,43	0,08
Caucásicos (n=55)	0,96	0,04	1	0	0,18	0,58	0,24	1	0	1	0	0,47	0,44	0,09
Afroamericanos (n=37)	0,95	0,05	0,97	0,03	0,73	0,24	0,03	0,97	0,03	0,97	0,03	0,51	0,41	0,06

3. Desequilibrio de ligamiento y estructura de haplotipo del promotor de UGT1A1

Una prueba de razón de probabilidad detectó desequilibrio de ligamiento por pares entre los sitios -3279, -3156 y el polimorfismo (TA)_n en la muestra de población ($n = 103$, $P<0,0001$). Cuando se usaron solo los alelos comunes (TA)₆ y (TA)₇ para el análisis de desequilibrio de ligamiento, se obtuvieron los mismos resultados ($P<0,0001$). Cuando se evaluó de forma separada el desequilibrio de ligamiento por pares en caucásicos y afroamericanos, se detectó de forma similar un equilibrio de ligamiento muy significativo en caucásicos ($P<0,0001$). En afroamericanos, también se detectó desequilibrio de ligamiento por pares entre todos los sitios, sin embargo, el nivel de significación varió mucho entre las comparaciones por pares. Solo el desequilibrio de ligamiento entre (TA)_n y -3156 tuvo niveles de significación similares a los vistos para caucásicos ($P<0,0005$) mientras que el desequilibrio de ligamiento tuvo sólo niveles de bajos de significación entre (TA)_n y -3279 ($P = 0,02$) y entre -3279 y -3156 ($P = 0,04$).

La conclusión del haplotipo multisitio produjo diez haplotipos a lo largo de las variantes PBREM y el polimorfismo (TA)_n (ver la tabla posterior). Los haplotipos I-IV incluyen el alelo (TA)₆, y el haplotipo I difiere del haplotipo II en la posición -3279 en el dominio NR3 de PBREM. Los haplotipos VI, VII y VIII incluyen la repetición (TA)₇ y los haplotipos VI y VII difieren entre si en la posición -3156. Hay una sugerencia de que la estructura de haplotipo del alelo (TA)₆ es diferente en la submuestra de afroamericanos. Comparados con los caucásicos, el haplotipo I es menos común en afroamericanos (ji cuadrado = 27,06, $P<0,0001$), mientras que el haplotipo II es más común (ji cuadrado = 14,84, $P = 0,0001$). Las diferencias en las frecuencias de los haplotipos VI y VII no eran estadísticamente significativas entre los dos grupos (prueba ji cuadrado, $P = 0,44$ y $0,48$, respectivamente).

Entre las muestras examinadas, se encontraron 21 combinaciones diferentes de estos haplotipos. En caucásicos, los pares de haplotipos más frecuentes son I/VI (0,35), I/II (0,24) y I/III (0,11), mientras que para afroamericanos son I/II (0,11), II/VI (0,11), II/VIII (0,08), I/VI (0,08), II/VII (0,08) y VI/VI (0,08). Los números efectivos de haplotipos, que reflejan cuantos haplotipos relativamente muy frecuentes se observan, fueron 5,2 y 2,6 en afroamericanos y caucásicos, respectivamente (tabla posterior). Por último, la diversidad ($\pm$ DE) de los haplotipos (TA)₆ fue 0,555 $\pm$ 0,070 y 0,262 $\pm$ 0,065 en afroamericanos y caucásicos, respectivamente ($P < 0,05$).

Estructura de haplotipos de las mutaciones del promotor y frecuencias de haplotipos. También se da el número efectivo de haplotipos

Haplotipo	-3440	-3401	-3279	-3177	-3175	-3156	(TA) _n	Muestra población (n=103)	Caucásicos (n=55)	Afro americanos (n=37)
I	C	T	T	C	A	G	(TA) ₆	0,39	0,53	0,15
II	C	T	G	C	A	G	(TA) ₆	0,15	0,07	0,28
III	A	T	G	C	A	G	(TA) ₆	0,02	0,02	0,03
IV	C	C	G	C	A	G	(TA) ₆	0,01	0	0,01
V	C	T	G	C	A	A	(TA) ₆	0,01	0	0,01
VI	C	T	G	C	A	A	(TA) ₇	0,29	0,31	0,28
VII	C	T	G	C	A	G	(TA) ₇	0,07	0,05	0,08
VIII	C	T	G	G	G	A	(TA) ₇	0,01	0	0,01
IX	C	T	G	C	A	G	(TA) ₈	0,05	0,01	0,12
X	C	T	G	C	A	G	(TA) ₅	0,02	0,01	0,04
								3,7 ^a	2,6 ^a	5,2 ^a

4. Fenotipado de UGT1A1 y asociación con polimorfismo (TA)_n y haplotipos

La actividad UGT1A1 se midió como tasas de glucuronidación de SN-38 en microsomas de 83 hígados humanos. Se observaron un coeficiente de variación el 46% (1,90 f 0,87 SN-38G/IS, media f DE) y un intervalo de 10 veces en la glucuronidación de SN-38.

Debido al pequeño número de sujetos en los genotipos 5/7, 5/6, 6/8 y 7/8, solo se usaron 6/6, 6/7 y 7/7 en el análisis ANOVA. El fenotipo fue significativamente diferente a través de estos tres genotipos ($P = 0,008$) (Fig. 5A). El grado de variación de la tasa de glucuronidación a través de los genotipos fue similar en distintos grupos étnicos ($P > 0,1$). Se mostró una tendencia disminuyente significativa a través de los genotipos 6/6, 6/7 y 7/7 en caucásicos ($P < 0,001$, prueba JT, Fig. 5B) y a través de los genotipos 6/6, 6/7, 6/8 y 7/7 en afroamericanos ($P = 0,33$ prueba JT) (Fig. 5C). Cuando se juntaron muestras con antecedentes étnicos asiáticos ($n = 1$), otros ($n = 2$) y desconocidos ($n = 10$), no se pudo encontrar una tendencia significativa a través de los genotipos (TA)_n ($P > 0,1$, prueba JT) (Fig. 5D). En la muestra de caucásicos, las comparaciones por pares del fenotipo entre dos grupos de genotipos mostraron diferencias significativas entre los grupos 6/7 y 7/7 ($P = 0,007$, prueba de Wilcoxon exacta unilateral) y 6/6 y 7/7 ($P = 0,0002$). La comparación por pares no fue significativa en los afroamericanos, probablemente debido al pequeño número de muestras de cada genotipo.

Cuando se consideraron los genotipos (TA)_n como la suma del número de repeticiones TA en ambos cromosomas (es decir genotipos ≤ 12 (5/6, 6/6, 5/7), 13 (6/7) y ≥ 14 (7/7, 6/8, 7/8)), se midió una tendencia significativa de actividad UGT1A1 reducida ($P < 0,01$) a través de los grupos (siendo el menor el grupo de genotipo ≥ 14) en muestra de población total, en caucásicos, en afroamericanos pero no en muestras de etnias asiática/otras/desconocida ($P = 0,66$). Las comparaciones por pares (prueba de Wilcoxon exacta unilateral) mostraron actividad UGT1A1 significativamente reducida ($P < 0,01$) en genotipos ≥ 14 comparados con 13 y con ≤ 12 , y en genotipos de 13 comparados con ≤ 12 en la muestra de población total y en los caucásicos. En los afroamericanos el genotipo ≤ 12 tiene actividad UGT1A1 significativamente mayor comparada con los genotipo 13 o ≥ 14 ($P = 0,028$ y $0,016$, respectivamente), pero la actividad UGT1A1 no era significativamente diferente entre los genotipos 13 y ≥ 14 ($P = 0,11$).

En muestras de origen caucásico y africano, las tasas de glucuronidación de SN-38 varían significativamente a través de los haplotipos con una tendencia descendente ($P < 0,0001$, prueba de JT) (Fig. 6). Sin embargo, esta correlación aparente haplotipo-fenotipo se puede deber posiblemente al efecto del polimorfismo (TA)_n que está en desequilibrio de ligamiento con las variantes de PBREM. Por lo tanto, se investigaron los efectos funcionales posibles de las variantes comunes -3279G>T y -3156G>A comparando las tasas de glucuronidación de SN-38 a través de los genotipos que diferían solo en la variante que se examinaba. Respecto a la variante -3279G>T, la glucuronidación de SN-38 se redujo

en los pares I/II comparado con los pares I/I entre caucásicos, aunque sin alcanzar significación estadística ($2,06 \pm 0,74$ frente a $2,53 \pm 0,82$ SN-38G/IS, respectivamente) (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, $P = 0,18$). Respecto a la variante -3156G>A, aunque la glucuronidación de SN-38 está ligeramente reducida en los pares I/VII comparados con I/VI, la diferencia no es estadísticamente significativa (prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, $P = 0,64$).

5. Materiales y métodos para los experimentos descritos anteriormente

a. Productos químicos y reactivos

Se compró la exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba (exo/SAP) de USB (Cleveland, Ohio, EE.UU.). El kit de secuenciación ABI Big Dye terminator cycle-sequencing se obtuvo de Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.). Los cebadores para amplificación, secuenciación de PBREM, y amplificación del polimorfismo (TA)_n se obtuvieron de GibcoBRL (Invitrogen Co., Carlsbad, California, EE.UU.). SN-38 fue amablemente proporcionado por el Dr. Kiyoshi Terada (Yakult Onza Co., Ltd., Japón). Camptotecina, UDPGA, cloruro de magnesio, trizma base, hidrogenofosfato de potasio y ácido 1-heptanosulfónico se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EE.UU.). Acetonitrilo, tetrahidrofurano y ácido clorhídrico se obtuvieron de Fisher Scientific (Hanover, Illinois, EE.UU.).

b. Hígados humanos

Los hígados humanos normales ($n = 83$) se obtuvieron principalmente de Liver Tissue Procurement and Distribution System (National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Minneapolis, Minnesota). El ADN se aisló usando el kit de Qiagen RNA/DNA Maxi Kit (Qiagen Inc., Valencia, California, EE.UU.), y los microsomas se aislaron siguiendo métodos de centrifugación diferencial (Purba *et al.*, 1987). El ADN y los microsomas fueron proporcionados por Liver Core Bank Facility (St. Jude Children's Research Hospital) del grupo de investigación de farmacogenómica de agentes anticancerosos (PAAR). Para identificar los hígados en los que se producía la degradación enzimática, se buscaron muestras de hígado comprendidas consistentemente en percentilo 10 de actividades UGT1A1, UGT1A9 y UGT2B7. Las actividades UGT1A9 y UGT2B7 se midieron usando sondas específicas (datos no mostrados) (Ramírez *et al.*, 2002 e Innocenti, *et al.*, 2001). De ocho muestras en el percentilo 10 de UGT1A1, solo una muestra estaba comprendida en el percentilo 10 de actividades de las otras dos enzimas. Si se produjo degradación de proteínas de hígado o microsomas por manejo/almacenamiento diferente en esa muestra, esto no debería haber afectado al grado de correlación fenotipo/genotipo porque el individuo tenía un genotipo 7/7, y entre las muestras de genotipo 7/7 ($n = 11$), tenía el 4º valor más bajo. Además, la falta de correlación entre las actividades UGT1A1 y UGT2B7 ($n = 83$, $r = 0,07$, $P = 0,5$) muestra que diferencias en la integridad del tejido y la estabilidad de los microsomas tienen probablemente una ligera influencia (si alguna) en el genotipo UGT.

La composición étnica de los 83 donantes de hígado comprendía: 68% de caucásicos, 18% de afroamericanos, 1% de asiáticos, 2% de otras. El porcentaje de muestras de origen étnico desconocido fue del 12%.

c. Genotipado del polimorfismo (TA)_n

Para determinar el genotipo del polimorfismo (TA)_n, se sometieron aproximadamente 40 ng de ADN a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores de amplificación se han descrito previamente (Monaghan *et al.*, 1996), donde la secuencia del cebador directo es 5'-GTCACGTGACACAGTCAAAC-3' (SEQ ID NO: 2) y la cebador inverso es 5'-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 3). Estos cebadores flanquean el locus TA polimórfico en la región del promotor del gen UGT1A1 y amplifican un fragmento de 98 bp cuando está presente un alelo (TA)₆ y un fragmento de 100 bp cuando está presente un alelo (TA)₇. En presencia de los alelos (TA)₅ y (TA)₈, se amplifican alelos de 96 bp y 102 bp. El cebador inverso está marcado con un colorante fluorescente en su extremo 5' para permitir ver el producto de amplificación. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 10 µl que consistía en MgCl₂ 1,5 mmol, dNTPs 250 mmol, 0,8 mmol de cada cebador y 0,5 U de polimerasa Taq (Amplitaq Gold de Applied Biosystems). La polimerasa se activó a 95°C durante 10 minutos y el ADN se amplificó durante 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguido de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los ADNs control de individuos que se sabe tienen genotipo 6/6, 6/7 y 7/7 se incluyeron en el análisis por PCR. Los fragmentos de PCR se sometieron a electroforesis en gel en un analizador de ADN ABI 377 (Applied Biosystems). Los productos amplificados se diluyeron en tampón de carga con formamida y azul de dextrano y se combinó 1 µl con 1 µl de patrones de tamaño (GS-350 de Applied Biosystems), se desnaturalizaron a 95°C y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 6% desnaturalizante. La electroforesis se realizó durante 3,5 horas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usó el software Genescan y Genotyper (versión 3.7, Applied Biosystems) para analizar los fragmentos para la determinación del tamaño.

d. Secuenciación de PBREM

Se amplificó con éxito mediante PCR una región de 606 bp (-3641 a -3036) incluyendo el PBREM y se secuenció en 81 de los 83 ADNs de hígado humano y 22 de las 24 muestras de ADN de individuos afroamericanos (americanos de ascendencia africana, nacidos en los EE.UU.) incluidos en el NIGMS HGCR Human Variation Panel (Coriell Institute for Medical Research, Camden, Nueva Jersey, EE.UU.). La secuencia referencia mostrada en la Fig. 4 es la depositada en la base de datos del GenBank (número de acceso AF313454). La amplificación del producto de PCR se realizó en un volumen de reacción de 10 ó 25 µl usando los siguientes cebadores 5'-CTGGGGGATAAACATGGGGATG-3' SEQ ID NO: 4 (directo) y 5'-CACCACCACTTCTGGAACCT-3' SEQ ID NO: 5 (inverso). Estos cebadores se

diseñaron usando el software Primer 3 (Rozen *et al.*, 1998). Las condiciones de PCR fueron 2 minutos a 94°C, 32 ó 33 ciclos de un programa de ciclos de tres pasos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 66,8°C y 1 minuto a 72°C) y 72°C durante 3 minutos. Tras la limpieza con exo/SAP del producto de PCR, este amplicón se secuenció después en las direcciones directa e inversa usando los cebadores de amplificación, química de terminación Big Dye, y se corrieron en un ABI 3700 (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante. Las secuencias se analizaron y se determinó el genotipo de los individuos usando el software Poly-Phred (Nickerson *et al.*, 1997). Para determinar el estado ancestral de los polimorfismos encontrados en humanos, se comparó la secuencia con la del babuino (número de acceso AC091778).

e. Ensayo de glucuronidación de SN-38 en microsomas de hígado humano

Se determinó el fenotipo de las muestras usando SN-38 como sustrato para UGT1A1. La mezcla de incubación consistía en SN-38 5 μ mol, $MgCl_2$ 10 mmol, 1 mg/ml de microsomas, Tris-HCl 0,025 mol (pH 7,4) y UDP-GA 5 mmol. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La reacción se paró mediante la adición de metanol. Estas condiciones se seleccionaron después de optimización previa de la reacción enzimática (Iyer *et al.*, 1998). Se usó camptotecina (75 ng) como estándar interno. La glucuronidación de SN-38 se midió por HPLC (Hitachi Instruments, Inc. San Jose, California, EE.UU.) con detección de fluorescencia (λ de excitación = 355 nm, λ de emisión = 515 nm). Se usaron una columna μ BondapakTM C₁₈ (3,9 X 300 mm, 10 μ m; Waters Corp., Milford, Massachusetts, EE.UU.) y guardpak μ BondapakTM C₁₈ (Waters Corp.). Se usó una fase móvil de acetonitrilo/tetrahidrofurano/ácido heptanedfónico de sodio 0,9 mmol 8/4/88 en dihidrogenofosfato de potasio 50 mmol (pH 4) durante los primeros 7 minutos de la carrera. Entre 7,1-25 minutos el eluyente consistió acetonitrilo/ácido heptanedfónico de sodio 5 mmol 30/70 en dihidrogenofosfato de potasio 50 mmol (pH 4). La velocidad de flujo fue de 0,9 ml/min. Los tiempos de retención para SN-38G, SN-38 y camptotecina fueron de 13,3, 18,4 y 19,3 minutos, respectivamente. Se describieron las tasas de glucuronidación del SN-38 como las razones entre las alturas de los picos de SN-38 glucuronido (SN-38G) y el estándar interno (IS). Se determinó la variabilidad intraensayo llevando a cabo 10 incubaciones en el mismo día usando un conjunto de microsomas de hígado humano. Se evaluó la variabilidad interensayo incubando un conjunto de microsomas de hígado humano por triplicado en tres días diferentes. Las variabilidades inter- e intraensayo estaban dentro del 7%.

f. Análisis estadístico

La significación del desequilibrio de ligamiento entre pares de sitios polimórficos se evaluó usando datos genotípicos y una prueba de la razón de probabilidad proporcionado por ARLEQUIN, versión 2 (Schneider *et al.*, 2000). También se usó ARLEQUIN para correr un algoritmo modificado del paseo aleatorio de la cadena de Markov para probar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Después, se estimaron los haplotipos de multisitio usando el programa PHASE (Stephens *et al.*, 2001). Puesto que este programa no acepta sitios polimórficos tanto bialélicos como multialélicos, los haplotipos se estimaron solo para individuos bien con los alelos (TA)₆ o (TA)₇.

Trece individuos eran heterocigotos para la repetición (TA)₅ o (TA)₈, tres de los cuales eran heterocigotos solo en la repetición TA y por lo tanto no ambiguos en los otros sitios. Para los 10 individuos restantes, se determinaron los haplotipos de forma manual asumiendo que el cromosoma con el alelo (TA)₆ o (TA)₇ contenía un haplotipo previamente identificado por el análisis de PHASE. En un caso, este método habría resultado en un nuevo haplotipo (TA)₈. Sin embargo, es más probable que este individuo hubiera tenido un haplotipo nuevo (TA)₆ (V), que es consistente con la observación de que el alelo (TA)₆ se encuentra en múltiples haplotipos, incluyendo otros raros. Una asignación incorrecta hubiera tenido poco efecto o ninguno en los análisis posteriores porque el nuevo haplotipo solo se produce una vez en 103 individuos y no en una muestra usada en estudios de correlación con el fenotipo.

Se calculó el número efectivo de haplotipos como el recíproco de la suma de la frecuencia al cuadrado. Se estimó la diversidad en los haplotipos (TA)₆ en caucásicos y afroamericanos, en base al número y frecuencia de haplotipos y ajustada por tamaño de la muestra, mediante DnaSP versión 3.53 (Rozas *et al.*) así como sus DEs. Se evaluó la significancia estadística usando una prueba t como se ha descrito previamente (Nei, 1987). Se usó la prueba de ji cuadrado para analizar las diferencias en las frecuencias de genotipo/haplotipo entre caucásicos y afroamericanos.

Se fenotipó la actividad UGT1A1 midiendo las tasas de glucuronidación de SN-38 de cada hígado como la media $\pm$ DE en un único experimento realizado en triplicado. El análisis estadístico de la relación entre el polimorfismo (TA)_n y el fenotipo se planificó para evaluar primero el efecto del genotipo sobre el fenotipo en la muestra de población (n = 83) usando el análisis de varianza (ANOVA). Si el efecto del genotipo era estadísticamente significativo entonces, dentro de cada grupo étnico, se realizó una prueba de tendencia a través de los genotipos usando la prueba exacta de Jonkheer-Terpsta (JT) (Gibbons *et al.*, 1992). Las comparaciones por pares entre dos genotipos se realizaron usando una prueba de Wilcoxon exacta unilateral. Además, se realizaron análisis de tendencia y comparaciones por pares en genotipos expresados como la suma de las repeticiones TA en ambos cromosomas (es decir, en muestras con genotipos ≤ 12 (5/6, 6/6, 5/7), 13 (6/7) y ≤ 14 (7/7, 6/8, 7/8) de repeticiones TA). Respecto a la relación haplotipo-fenotipo, se realizaron pruebas de Wilcoxon exactas bilaterales para comparar las tasas de glucuronidación de SN-38 entre dos haplotipos. Se usaron el sistema SAS (SAS Institute, Inc., Cary, Carolina del Norte) y StatXact-5 (CYTEL Software Corporation, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) para análisis estadísticos. Se usó el software GraphPad versión 3.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, EE.UU.) para análisis gráfico.

III. Detección de ácidos nucleicos

Algunas formas de realización de la invención conciernen a la identificación de polimorfismos en *UGT1A1*, correlacionando genotipo o haplotipo con fenotipo, en donde el fenotipo es una actividad o expresión de *UGT1A1* disminuida o alterada, y después identificando tales polimorfismos en pacientes a los que se les ha dado o dará irinotecano o drogas o compuestos relacionados. De esta manera, la presente invención implica ensayos para identificar polimorfismos y otros métodos de detección de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos, por lo tanto, tienen utilidad como sondas o cebadores para formas de realización que implican la hibridación de ácidos nucleicos. Se pueden usar en métodos de diagnóstico o cribado de la presente invención. La invención abarca la detección de los ácidos nucleicos que codifican *UGT1A1*, así como los ácidos nucleicos implicados en la expresión o estabilidad de polipéptidos o transcritos de *UGT1A1*. Los métodos generales de los métodos de detección de ácidos nucleicos se proporcionan a continuación, seguidos por ejemplos específicos empleados para la identificación de polimorfismos, incluyendo polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

A. Hibridación

El uso de una sonda o cebador de entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ó 15 y 50, 60, 70, 80, 90, ó 100 nucleótidos, preferiblemente entre 17 y 100 nucleótido de longitud, o en algunos aspectos de la invención hasta 1,2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula bicatenaria que es tanto estable como selectiva. Las moléculas que tienen secuencias complementarias en tramos continuos mayores de 20 bases de longitud son en general preferidas, para aumentar la estabilidad y/o selectividad de las moléculas híbridas obtenidas. En general se prefiere diseñar moléculas de ácido nucleico para la hibridación que tienen una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas donde se desee. Tales fragmentos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, sintetizando el fragmento directamente por medios químicos o introduciendo las secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para producción recombinante.

De acuerdo con esto, las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden usar por su capacidad de formar de forma selectiva moléculas bicatenarias con tramos complementarios de ADN y/o ARNs o proporcionar cebadores para amplificación de ADN o ARN de muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se desearía emplear condiciones de hibridación variables para alcanzar grados de selectividad variables de la sonda o cebadores para la secuencia diana.

Para aplicaciones que requieren gran selectividad, típicamente se desea emplear condiciones relativamente muy rigurosas para formar los híbridos. Por ejemplo, condiciones de relativamente baja sal y/o temperatura alta, tales como las que proporciona mediante alrededor de 0,02 M hasta alrededor de 0,10 M de NaCl a una temperatura de alrededor de 50°C hasta alrededor de 70°C. Tales condiciones muy rigurosas toleran poco, si algo, los errores de emparejamiento entre la sonda o cebadores y la hebra molde o diana y serían particularmente adecuados para el aislamiento de genes específicos o para detectar un polimorfismo específico. Generalmente se aprecia que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida. Por ejemplo, en condiciones muy rigurosas, la hibridación a ADN unido a filtro se puede llevar a cabo en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM a 65°C, y lavar en SSC 0,1 x/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel *et al.*, 1989).

Las condiciones se pueden hacer menos rigurosas aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, se puede proporcionar condiciones rigurosas medias mediante alrededor de 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de alrededor de 37°C hasta alrededor de 55°C, mientras que se pueden proporcionar condiciones poco rigurosas mediante alrededor de 0,15 M hasta alrededor de 0,9 M de sal, a temperaturas que varían desde alrededor de 20°C hasta alrededor de 55°C. En condiciones poco rigurosas, tal como condiciones moderadamente rigurosas el lavado se puede llevar a cabo por ejemplo en SSC 0,2 x/SDS al 0,1% a 42°C (Ausubel *et al.*, 1989). Las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras formas de realización, la hibridación se puede alcanzar en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotritol 1,0 mM, a temperaturas de entre aproximadamente 20°C hasta alrededor de 37°C. Otras condiciones de hibridación podrían incluir aproximadamente Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, a temperaturas que varían desde aproximadamente 40°C hasta alrededor de 72°C.

En ciertas formas de realización, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con medios apropiados, tal como un marcador, para determinar la hibridación. Se conocen en la técnica una gran variedad de medios indicadores apropiados, incluyendo fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos, tal como avidina/biotina, que se pueden detectar. En formas de realización preferidas, se puede desear usar un marcador fluorescente o una etiqueta enzimática tal como la ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros medioambientalmente indeseables. En el caso de etiquetas enzimáticas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que se pueden emplear para proporcionar medios de detección que son detectables de forma visible o espectrofotométrica, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen ácidos nucleicos complementarios. En otros aspectos, puede estar presente un sitio de corte de una nucleasa particular y se puede determinar la detección de una secuencia de nucleótidos particular mediante la presencia o ausencia de corte del ácido nucleico.

En general, se prevé que las sondas o cebadores descritos aquí sean útiles como reactivos en hibridación en solución, como en PCR, para detección de expresión o genotipo de los genes correspondientes, así como en formas de realización que usan fase sólida. En formas de realización que implican fase sólida, el ADN (o ARN) a ensayar se adsorbe o se fija de otra manera a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico fijado de cadena sencilla se somete entonces a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente del ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación particular de interés es bien conocida por los expertos en la materia. Después de la lavar las moléculas hibridadas para eliminar las moléculas de sonda unidas de forma no específica, la hibridación se detecta, y/o cuantifica, determinando la cantidad de marcador unido. Se divulgan métodos representativos de hibridación en fase sólida en las patentes de EE.UU. 5843663, 5900481 y 5919626. Otros métodos de hibridación que se pueden usar en la práctica de la presente invención se divulgan en las patentes de EE.UU. 5849481, 5849486 y 5851772. Las partes relevantes de estas y otras referencias identificadas en esta sección de la especificación se incorporan aquí por referencia.

B. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos usados como molde para la amplificación se pueden aislar a partir de células, tejidos u otras muestras según metodologías estándar (Sambrook *et al.*, 2001). En algunas formas de realización, el análisis se lleva a cabo en células enteras u homogenados de tejidos o muestras de fluidos biológicos con o sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular fraccionado o total. Donde se usa ARN, se puede desear convertir primero el ARN a ADN complementario.

El término “cebador”, como se usa aquí, se pretende que abarque cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de diez hasta veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero se pueden utilizar secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de cadena doble y/o de cadena sencilla, aunque se prefiere la forma de cadena sencilla.

Se ponen en contacto los pares de cebadores diseñados para hibridar selectivamente con ácidos nucleicos correspondientes al locus del gen *UGT1* (número de acceso del Genbank AF279093), el gen *UGT1A1* y/o SEQ ID NO: 1 o variantes de los mismos, y fragmentos de los mismos con el ácido nucleico molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. SEQ ID NO: 1 expone una secuencia de nucleótidos que incluye la mayoría del gen *UGT1A1*. SEQ ID NO: 1 incluye los nucleótidos 169.831 a 187.313 del locus del gen *UGT1* con el nucleótido 1645 de SEQ ID NO: 1 correspondiendo al nucleótido -3565 a partir del inicio de transcripción del gen *UGT1A1*, de este modo el inicio de la transcripción está situado en el nucleótido 5212 de SEQ ID NO: 1. Dependiendo de la aplicación deseada, se pueden seleccionar condiciones de hibridación muy rigurosas que solo permitirán la hibridación con secuencias que son completamente complementarias a los cebadores. En otras formas de realización, la hibridación se puede dar en condiciones menos rigurosas para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen un o más errores de emparejamiento con las secuencias de los cebadores. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, a las que también se denomina como “ciclos”, hasta que se produce una cantidad suficiente del producto amplificado.

El producto de amplificación se puede detectar, analizar o cuantificar. En ciertas aplicaciones, la detección se puede realizar por medios visuales. En ciertas aplicaciones, la detección puede implicar identificación indirecta del producto a través de quimioluminiscencia, gammagrafía radiactiva de radiomarcador o marcador fluorescente incorporado o incluso a través de un sistema usando señales de impulsos eléctrico o térmicos (tecnología Affymax; Bellus, 1994).

Hay disponibles un número de procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una determinada muestra de molde. Uno de los métodos de amplificación mejor conocido es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada como PCRTM) que se describe en detalle en las patentes de EE.UU. 4683195, 4683202 y 4800159, y en Innis *et al.*, 1988.

Otro método para amplificar es la reacción en cadena de la ligasa (“LCR”), divulgada en la solicitud europea no. 320308, incorporada aquí por referencia en su totalidad. La patente de EE.UU. 4883750 describe un método similar a la LCR para la unión de pares de sondas a un secuencia diana. También se puede usar un método basado en PCRTM y el ensayo de la ligasa de oligonucleótidos (OLA) (descrito en más detalle posteriormente), divulgado en la patente de EE.UU. 5912148.

Métodos alternativos que se pueden usar para la amplificación de secuencias diana de ácidos nucleicos se divulgan en las patentes de EE.UU. 5843650, 5846709, 5846783, 5849546, 5849497, 5849547, 5858652, 5866366, 5916776, 5922574, 5928905, 5928906, 5932451, 5935825, 5939291 y 5942391. También se puede usar como un método de amplificación en la presente invención la Qbeta replicasa.

También puede ser útil un método de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para alcanzar la amplificación de las moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[alfa-tio]-trifosfato en una hebra de un sitio de restricción, en la amplificación de los ácidos nucleicos en la presente invención (Walter *et*

al., 1992). Otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos es la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA), divulgada en la patente de EE.UU. 5916779 que implica múltiples rondas de desplazamiento de hebras y síntesis, es decir, traslado de mellas.

5 Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción (TAS), incluyendo la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989; WO 8810315).

10 WO 89/06700 divulga un esquema de amplificación de secuencia de ácidos nucleicos basado en la hibridación de una región de promotor/secuencia de cebador a un ADN de cadena sencilla ("ADNcs") diana seguido por la transcripción de muchas copias de ARN de esta secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes de los transcritos de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR en una dirección" (Forman, 19990; Ohara *et al.*, 1989).

15 C. Detección de ácidos nucleicos

Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de la amplificación del molde y/o el exceso de cebador. En una forma de realización, los productos de amplificación se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida usando métodos estándar (Sambrook *et al.*, 2001). Los productos de amplificación separados se pueden cortar y eluir del gel para manipulación adicional. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, se puede liberar la banda separada calentando el gel, seguido por una extracción del ácido nucleico.

25 La separación de los ácidos nucleicos también se puede llevar a cabo mediante columnas de centrifugación y/o métodos cromatográficos conocidos en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografía que se pueden usar en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de hidroxipatita, de exclusión molecular, de fase inversa, en columna, en papel, en capa fina, y de gas, así como HPLC.

30 En algunas formas de realización, los productos de amplificación se visualizan, con o sin separación. Un método típico de visualización implica teñir un gel con bromuro de etidio y ver las bandas con luz UV. De forma alternativa, si los productos de amplificación están marcados integralmente con nucleótidos marcados de forma radiométrica o fluorométrica, los productos de amplificación separados se pueden exponer a una película de rayos X o ver con los espectros de excitación apropiados.

35 En una forma de realización, tras la separación de los productos de amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico marcado con la secuencia marcadora amplificada. La sonda está preferiblemente conjugada a un cromóforo pero puede estar radiomarcada. En otra forma de realización, la sonda se conjuga a una parte de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otra parte de unión que lleva un grupo detectable.

40 En formas de realización particulares, la detección es mediante Southern blot y la hibridación con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en el Southern blot son bien conocidas para los expertos en la materia (ver Sambrook *et al.*, 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de EE.UU. 5279721, incorporada aquí por referencia, que divulga un aparato y método para la electroforesis y transferencia automatizada de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y transferencia sin manipulación externa del gel y es idealmente adecuada para llevar a cabo métodos según la presente invención.

45 Otros métodos para la detección de ácidos nucleicos que se pueden usar en la práctica de la invención inmediata se divulgan en las patentes de EE.UU. 5840873, 5843640, 5843651, 5846708, 5846717, 5846726, 5846729, 5849487, 5853990, 5853992, 5853993, 5856092, 5861244, 5856732, 5863753, 5866331, 5905024, 5910407, 5912124, 5912145, 5919630, 5925517, 5928862, 5928869, 5929227, 5932413 y 5935791, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia.

D. Otros ensayos

55 Se pueden usar otros métodos para el cribado genético dentro del ámbito de la presente invención, por ejemplo, para detectar mutaciones en muestras de ADN genómica, ADNc y/o ARN. Los métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen electroforesis en gel en gradiente en condiciones desnaturalizantes ("DGGE"), análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ("RFLP"), métodos de corte químico o enzimático, secuenciación directa de regiones diana amplificadas mediante PCRTM (ver anteriormente), análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla ("SSCP") y otros métodos bien conocidos en la técnica.

60 Un método de cribado para mutaciones puntuales se basa en el corte por RNasa de errores de emparejamiento en pares de bases en heterodúplex de ARN/ADN o ARN/ARN. Como se usa aquí, el término "error de emparejamiento" se define como una región de uno o más nucleótidos sin emparejar o mal emparejados en una molécula de doble cadena ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN. Esta definición incluye de esta manera los errores de emparejamiento debidos a mutaciones de inserción/delección, así como mutaciones puntuales de bases únicas o múltiples.

La patente de EE.UU. 4946773 describe un ensayo de corte por error de emparejamiento por RNasa A que implica el alineamiento de muestras a ensayar de ADN o ARN de cadena sencilla con una sonda de ARN, y el posterior tratamiento de los ácidos nucleicos bicatenarios con RNasa A. Para la detección de los errores de emparejamiento, los productos de de cadena sencilla del tratamiento con RNasa A, separados de forma electroforética según tamaño, se comparan con controles bicatenarios tratados de forma similar. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de corte) que no se ven en los controles bicatenarios se puntúan como positivos.

Otros investigadores han descrito el uso de RNasa I en ensayos de errores de emparejamiento. El uso de la RNasa para la detección de errores de emparejamiento se describe en la bibliografía de Promega Biotech. Promega comercializa un kit que contiene RNasa I que se describe que corta tres de cada cuatro errores de emparejamiento conocidos. Otros han descrito el uso de la proteína MutS u otras enzimas de reparación de ADN para la detección de errores de emparejamiento de una sola base.

Métodos alternativos para la detección de mutaciones de delección, inserción o sustitución que se pueden usar en la práctica de la presente invención se divulgan en las patentes de EE.UU. 5849483, 5851770, 5866337, 5925525 y 5928870, cada una de las cuales se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

E. Ejemplos específicos de métodos de cribado de SNP

Las mutaciones espontáneas que se producen durante el curso de la evolución en los genomas de los organismos con frecuencia no se transmiten de forma inmediata por todos los miembros de la especie, creando de esta manera alelos polimórficos que coexisten en las poblaciones de la especie. Con frecuencia los polimorfismos son la causa de enfermedades genéticas. Se han identificado varias clases de polimorfismos. Por ejemplo, los polimorfismos de tipo nucleótido variable (VNTRs), provienen de duplicaciones en tándem espontáneas de motivos de nucleótidos repetidos de di- o trinucleótidos. Si tales variaciones alteran la longitud de los fragmentos de ADN generados mediante corte por endonucleasas de restricción, las variaciones se denominan polimorfismo de longitud del tamaño de restricción (RFLPs). Los RFLPs se han usado mucho en análisis genéticos de seres humanos y animales.

Otra clase de polimorfismos se generan por el cambio de un único nucleótido. Tales polimorfismos de nucleótido único (SNPs) raramente dan como resultado un cambio en un sitio de endonucleasa de restricción. De esta manera, los SNPs son raramente detectables mediante análisis de la longitud del tamaño de restricción. Los SNPs son las variaciones genéticas más comunes y ocurren una vez cada 100 a 300 bases y se ha encontrado que varias mutaciones SNP afectan a un solo nucleótido en un gen que codifica una proteína en una manera suficiente para causar realmente una enfermedad genética. Las enfermedades de SNP se ejemplifican por hemofilia, anemia falciforme, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, etc.

En el contexto de la presente invención, se determinarán las mutaciones polimórficas que afectan la actividad y/o niveles de los productos génicos de *UGT1A1*, que son responsables de la glucuronidación del irinotecano y otros agentes quimioterapéuticos y xenobióticos, mediante una serie de métodos de cribado. Una serie de métodos de cribado tiene como fin identificar los SNPs que afectan la inducibilidad, actividad y/o nivel de los productos génicos de *UGT1A1* en ensayos *in vitro* o *in vivo*. La otra serie de métodos de cribado se realizará después para analizar un individuo para existencia de los SNPs identificados antes. Para hacer esto, se tomará una muestra (tal como sangre u otro fluido corporal o muestra de tejido) de un paciente para el análisis del genotipo. La presencia o ausencia de SNPs determinará la capacidad de los individuos analizados para metabolizar irinotecano y otros agentes quimioterapéuticos que se metabolizan mediante los productos génicos de *UGT1A1*. Según los métodos proporcionados por la invención, estos resultados se usarán para ajustar y/o cambiar la dosis de irinotecano u otro agente administrado a un individuo para reducir el riesgo de efectos secundarios de la droga.

Los SNPs pueden ser el resultado de delecciones, mutaciones puntuales e inserciones y en general cualquier alteración de una única base, cualquiera que sea la causa, puede producir un SNP. La mayor frecuencia de SNPs significa que se pueden identificar más fácilmente que las otras clases de polimorfismos. La mayor uniformidad de su distribución permite la identificación de SNPs "más cercanos" a un rasgo particular de interés. El efecto combinado de estos dos atributos hace los SNPs extremadamente valiosos. Por ejemplo, si un rasgo particular (por ejemplo, la incapacidad de metabolizar el irinotecano de forma eficaz) refleja una mutación en un locus particular, entonces se puede usar cualquier polimorfismo que esté ligado al locus particular para predecir la probabilidad de que un individuo mostrará tal rasgo.

Se han desarrollado varios métodos para cribar polimorfismos y se dan algunos ejemplos más adelante. La referencia de Kwok y Chen (2003) y Kwok (2001) proporciona visiones generales de algunos de estos métodos; ambas de estas referencias se incorporan específicamente por referencia.

Se pueden caracterizar SNPs referentes a glucuronidación de agentes quimioterapéuticos mediante el uso de cualquiera de estos métodos o modificaciones adecuadas de los mismos. Tales métodos incluyen la secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción donde los alelos respectivos del sitio creen o destruyan un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas de alelo, el uso de anticuerpos que son específicos para proteínas codificadas por los diferentes alelos del polimorfismo, o cualquier otra interpretación bioquímica.

i) *Secuenciación de ADN*

El método más comúnmente usado para la caracterización de un polimorfismo es la secuenciación directa del locus genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Tal análisis se pueden conseguir usando bien el “método de terminación de cadena mediado por dideoxi”, también conocido como el “método de Sanger” (Sanger, F., *et al.*, 1975) o el método de “degradación química”, también conocido como el “método de Maxam-Gilbert” (Maxam, A.M., *et al.*, 1977). Se puede utilizar la secuenciación en combinación con tecnologías de amplificación específica de secuencia genómica, tal como la reacción en cadena de la polimerasa para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis, K. *et al.*, 1986; solicitud de patente europea 50424; solicitud de patente europea 84796, solicitud de patente europea 258017, solicitud de patente europea 237362; solicitud de patente europea 201184; patentes de EE. UU. 4683202, 4582788 y 4683194), todas las anteriores incorporadas aquí por referencia.

ii) *Resistencia a exonucleasa*

Otros métodos que se pueden usar para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio polimórfico utilizan un derivado de nucleótido especializado resistente a exonucleasa (patente de EE.UU. 4656127). Se hibrida un cebador complementario a una secuencia alélica inmediatamente 3' al sitio polimórfico con en ADN que se investiga. Si el sitio polimórfico del ADN contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente a exonucleasa presente, entonces el derivado se incorporará mediante la polimerasa en el extremo del cebador hibridado. Tal incorporación hace al cebador resistente al corte por exonucleasa y por lo tanto permite su detección. Como la identidad del derivado de nucleótido resistente a exonucleasa se conoce se puede determinar el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN.

iii) *Métodos de microsecuenciación*

Se ha descrito algún otro procedimiento de incorporación de nucleótidos guiados por cebador para ensayar los sitios polimórficos en el ADN (Komher, J. S. *et al.*, 1989; Sokolov, B. P., 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy *et al.*, 1991; Prezant *et al.*, 1992; Ugozzoli, L. *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estos métodos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para discriminar entre bases en un sitio polimórfico. Como la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se dan en carreras del mismo nucleótido dan como resultado una señal que es proporcional a la longitud de la carrera (Syvanen *et al.*, 1990).

iv) *Extensión en solución*

La patente francesa 2650840 y la solicitud de PCT WO91/02087 discuten un método basado en solución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. Según estos métodos, se usa un cebador complementario a las secuencias alélicas inmediatamente 3' del sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio polimórfico se determina usando derivados de desoxinucleótidos marcados que se incorporan al extremo del cebador si es complementario al nucleótido del sitio polimórfico.

v) *Genetic Bit Analysis o extensión de fase sólida*

La solicitud PCT WO92/15712 describe un método que usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia en 3' a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora es complementario al nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se evalúa y así se identifica. Aquí el cebador o molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

vi) *Ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA)*

Este es otro método de fase sólida que usa metodología diferente (Landegren *et al.*, 1988). Se usan dos oligonucleótidos capaces de hibridar con secuencias contiguas a un hebra sencilla de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos está biotinilado mientras que el otro está marcado de forma detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria precisa en la molécula diana, los oligonucleótidos hibridarán de modo que sus extremos sean contiguos, y crea un sustrato de ligación. La ligación permite la recuperación del oligonucleótido marcado usando avidina. También se han descrito otros ensayos de detección de ácidos nucleicos, basados en este método, combinados con PCR (Nickerson *et al.*, 1990). Aquí la PCR se usa para alcanzar la amplificación exponencial del ADN diana, que se detecta después usando OLA.

vii) *Análisis genético (Genetic Bit Analysis) mediado por ligasa/polimerasa*

La patente de EE.UU. 5952174 describe un método que también implica dos cebadores capaces de hibridar con secuencias contiguas de la molécula diana. El producto hibridado se forma sobre un soporte sólido al que se inmoviliza la diana. Aquí la hibridación se da de modo que los cebadores están separados entre si por un espacio de un único nucleótido. Incubar este producto hibridado en presencia de una polimerasa, una ligasa, y una mezcla de nucleósidos trifosfato que contiene al menos un desoxinucleósido trifosfato permite la ligación de cualquier par de oligonucleótidos hibridados contiguos. La adición de una ligasa da como resultado dos hechos principales requeridos para generar una señal, extensión y ligación. Esto proporciona una especificidad mayor y un “ruido” menor que los métodos que usan bien extensión bien ligación solas y a diferencia de los ensayos basados en polimerasa, este método aumenta la

especificidad del paso de la polimerasa combinándolo con un segundo paso de hibridación y ligación para que una señal se una a la fase sólida.

viii) Otros métodos para detectar SNPs

A continuación se presentan algunos otros métodos específicos para la detección e identificación de SNP y se pueden usar como tales o con modificaciones adecuadas conjuntamente con polimorfismos de identificación de los genes *UGT1A1* en la presente invención. También se describen algunos otros métodos en el sitio web de SNP del NCBI en la página web www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP, incorporado aquí por referencia.

En una forma de realización particular, se pueden determinar los haplotipos extendidos en cualquier locus determinado en un población, lo que permite identificar exactamente que SNPs serán redundantes y cuales serán esenciales en estudios de asociación. El ultimo se denomina como “SNPs con etiqueta haplotipo (htSNPs)”, marcadores que capturan los haplotipos de un gen o una región de desequilibrio de ligamiento. Ver Jonson *et al.* (2001) y Ke y Cardon (2003), cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia, para métodos ejemplares.

El ensayo VDA utiliza amplificación por PCR de segmentos genómicos por métodos de PCR larga usando reactivos TaKaRa LA Taq y otras condiciones estándar de reacción. La amplificación larga puede amplificar tamaños de ADN de alrededor de 2000-12000 bp. La hibridación de los productos a la matriz de detector variante (VDA) se puede llevar a cabo mediante un centro de cribado de alta eficacia Affymetrix y analizar con software de ordenador.

Un método denominado ensayo en chip usa la amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante protocolos de PCR estándar o larga. Los productos de hibridación se analizan mediante VDA, Halushka *et al.*, 1999, incorporada aquí por referencia. Los SNPs en general se clasifican como “ciertos” o “probables” basados en análisis por ordenador de los patrones de hibridación. Por comparación a métodos de detección alternativos tales como secuenciación de nucleótidos, los SNPs “ciertos” se han confirmado el 100% de las veces; y los SNPs “probables” se han confirmado el 73% de las veces mediante este método.

Otros métodos simplemente implican amplificación por PCR seguida por digestión con la enzima de restricción relevante. Otros incluso implican secuenciar los productos de PCR purificados de regiones genómicas conocidas.

En aún otro método, los exones individuales o fragmentos que solapan de los exones grandes se amplifican por PCR. Los cebadores se diseñan de secuencias publicadas o de bases de datos y la amplificación por PCR del ADN genómico se realiza usando las siguientes condiciones: 200 ng de ADN molde, 0,5 μ M de cada cebador, 80 μ M de cada uno de dCTP, dATP, dTTP y dGTP, formamida al 5%, $MgCl_2$ 1,5 mM, Taq polimerasa 0,5 U y 0,1 volumen de tampón de la Taq. Los ciclos térmicos se realizan y los productos de PCR resultantes se analizan mediante análisis por PCR-polimorfismo de conformación de cadena sencilla (PCR-SSCP), en varias condiciones, por ejemplo gel de poliacrilamida al 5 ó 10% con urea al 15%, con o sin glicerol al 5%. La electroforesis se realiza durante la noche. Los productos de PCR que muestran cambios de movilidad se reamplifican y se secuencian para identificar variaciones de nucleótidos.

En un método denominado CGAP-GAI (DEMIGLACE), se cargan en la memoria datos de secuencia y alineamientos (de un fichero PHRAP.file), puntuaciones de calidad para lecturas de base de secuencias (de los campos de calidad PHRED), información de distancias (de PHYLIP dnadist y programas vecinos) y datos de lecturas de base (de PHRED “-d” switch). Las secuencias se alinean y se examinan para cada trozo vertical (“rodaja”) del ensamblaje resultante por discrepancia. Cualquier rodaja se considera un candidato a SNP (DEMIGLACE). DEMIGLACE usa un cierto número de filtros para eliminar rodajas que probablemente no representen verdaderos polimorfismos. Estos incluyen filtros que: (i) excluyen secuencias en cualquier rodaja determinada de la consideración de SNP donde la puntuación de la calidad de la secuencia adyacente baja el 40% o más; (ii) excluye lecturas en las que la amplitud del pico está por debajo del percentilo quince de todas las lecturas de base para ese tipo de nucleótido; (iii) descalifica regiones de una secuencia que tiene un número alto de discrepancias con el consenso de participar en los cálculos de SNP; (iv) elimina de consideración cualquier lectura de base con una lectura alternativa en la que el pico toma hasta el 25% o más del área del pico leído; (v) excluye variaciones que suceden sólo en una dirección de lectura. Las puntuaciones de calidad PHRED se convirtieron en valores de probabilidad de error para cada nucleótido de la rodaja. Se usaron métodos bayesianos estándar para calcular la probabilidad posterior de que hay evidencia de heterogeneidad de nucleótidos en una localización determinada.

En un método denominado CU-RDF (RESEQ), se realiza la amplificación por PCR a partir del ADN aislado de sangre usando cebadores específicos para cada SNP, y después de los protocolos de limpieza típicos para eliminar los cebadores no usados y nucleótidos libres, secuenciación directa usando los mismos cebadores o anidados.

En un método denominado DEBNICK (MÉTODO-B), se realiza un análisis comparativo de secuencias EST agrupadas y se confirma mediante secuenciación de ADN basada en fluorescencia. En un método relacionado, denominado DEBNICK (MÉTODO-C), se realiza un análisis comparativo de secuencias EST agrupadas con calidad phred >20 en el sitio del emparejamiento erróneo, calidad phred media ≥ 20 durante 5 bases en los flancos 5' y 3' del SNP, sin errores de emparejamiento en 5 bases 5' y 3' del SNP, al menos dos casos de cada alelo y se confirma examinando los diagramas.

En un método identificado por ERO (RESEQ), se diseñan nuevas series de cebadores para STSs publicadas electrónicamente y se usan para amplificar ADN de 10 cepas distintas de ratones. El producto de amplificación de cada cepa se purifica mediante gel y se secuencian usando una técnica estándar de dideoxi de secuenciación en ciclo con terminadores marcados con ^{32}P . Todas las reacciones de ddATP terminadas se cargan entonces en líneas adyacentes de un de secuenciación seguidas por todas las reacciones de ddGTP y así sucesivamente. Los SNPs se identifican mediante observación visual de las radiografías.

En otro método identificado como ERO (RESEQ-HT), se diseñan nuevas series de cebadores para secuencias de ADN murinas publicadas electrónicamente y se usan para amplificar ADN de 10 cepas distintas de ratones. El producto de amplificación de cada cepa se prepara para secuenciación mediante tratamiento con exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba. La secuenciación se realiza usando un kit ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) y las muestras de secuencia se corren en un analizador de ADN 3700 (96 Capillary Sequencer).

FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica un método donde la región que contiene el SNP se amplifica por PCR usando los cebadores SAC2-FP3 y SCA2-RP3. Se amplifican aproximadamente 100 ng de ADN genómico en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de Tris 5 mM, KCl 25 mM, MgCl_2 0,75 mM, gelatina al 0,05% 20 pmol de cada cebador y 0,5 U de ADN polimerasa Taq. Las muestras se desnaturalizan, se alinean y se extienden y el producto de PCR se purifica de una banda cortada de un gel de agarosa usando, por ejemplo, el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se secuencian usando química de terminación con colorante en un secuenciador automatizado de ADN ABI Prism 377 con los cebadores de la PCR.

En un método identificado como JBLACK (SEQ/RESTRICT), se realizan dos reacciones de PCR independientes con ADN genómico. Los productos de la primera reacción se analizan mediante secuenciación, indicando un sitio de restricción único FspI. La mutación se confirma en el producto de la segunda reacción de PCR digiriendo con FspI.

En un método descrito como KWOK(1), los SNPs se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de cuatro individuos elegidos al azar mediante secuenciación directa de ADN de los productos de PCR con química de terminación con colorante (ver Kwok *et al.*, 1996). En un método relacionado identificado como KWOK (2) se identifican los SNPs comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos que se solapan tal como cromosomas bacterianos artificiales (BACs) o cromosomas artificiales basados en P1 (PACs). Se desarrolla entonces una STS que contiene este SNP y se confirma la existencia del SNP en varias poblaciones mediante secuenciación de conjuntos de ADN (ver Tallon-Miller *et al.*, 1998). En otro método similar llamado KWOK(3) se identifican los SNPs comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos que se solapan de BACs o PACs. Los SNPs encontrados mediante esta aproximación representan variaciones en la secuencia de ADN entre los dos cromosomas donantes pero las frecuencias alélicas en la población general no se han determinado todavía. En el método KWOK(5) se identifican los SNPs comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de una muestra de ADN homocigoto y una o más muestras de ADN juntado mediante secuenciación directa del ADN de los productos de PCR con química de terminación con colorante. Las STSs usadas se desarrollan a partir de datos de secuencias encontradas en bases de datos disponibles de forma pública. Específicamente, estas STSs se amplifican mediante PCR contra una mola hidatiforme completa (CHM) que se ha mostrado que es homocigoto en todos los loci y un conjunto de muestras de ADN de 80 padres CEPH (ver Kwok *et al.*, 1994).

En otro método, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), los SNPs se descubren mediante análisis de ordenador automatizado de regiones que solapan de secuencias de clones genómicos humanos de insertos largos. Para la adquisición de datos, las secuencias de los clones se obtienen directamente de centros de secuenciación a gran escala. Esto es necesario porque las secuencias de calidad base no están presente/disponibles a lo largo del GenBank. El procesamiento de datos crudos implica el análisis de las secuencias de los clones y la información acompañante de calidad base por consistencia. A las secuencias finalizadas ("base perfecta", tasa de error menor de 1 en 10000 bp) sin secuencias de calidad base asociadas se les asigna un valor de calidad base uniforme de 40 (tasa de error 1 en 10000 bp). Las secuencias borrador sin valores de calidad base se rechazan. Las secuencias procesadas se introducen en una base de datos local. También se almacena una versión de cada secuencia con repeticiones humanas enmascaradas conocidas. El enmascaramiento de las repeticiones se realiza con el programa "MASKERAID". Detección de solapamiento: los solapamientos putativos se detectan con el programa "WUBLAST". Siguen varios pasos de filtros para eliminar los resultados de falsa detección de solapamiento, es decir, similitudes entre un par de secuencias de clon que surgen debido a la duplicación de secuencias en contra del solapamiento verdadero. La longitud total del solapamiento, el porcentaje total de similitud, el número de diferencias de secuencia entre nucleótidos con valor alto de calidad base "errores de emparejamiento de alta calidad". Los resultados también se comparan con los resultados del mapeo de fragmentos de restricción de clones genómicos en el Centro de Secuenciación del Genoma de la Universidad de Washington, informes de los terminadores sobre solapamientos, y los resultados del esfuerzo construcción de secuencias cóntigo en el NCBI. Detección de SNP: se analizan pares de secuencias de clones que solapan para sitios candidatos a SNP con el software de detección de SNP "POLYBAYES". Las diferencias de secuencia entre los pares de secuencias se puntúan para la probabilidad de que representen verdaderas variaciones de secuencia en contraposición a errores de secuenciación. Este proceso requiere la presencia de puntuaciones de calidad de base para ambas secuencias. Se extraen los candidatos con puntuación alta. La búsqueda se restringe a variaciones de pares de bases individuales de tipo sustitución. La puntuación de confianza del SNP candidato se computa por el software PLYBAYES.

En el método identificado por KWOK (ensayo TaqMan), se usa el ensayo TaqMan para determinar los genotipos de 90 individuos al azar. En el método identificado por KYUGEN(Q1), se juntan las muestras de ADN de las poblaciones indicadas y se analizan mediante PLACE-SSCP. Las alturas de los picos de cada alelo en el análisis de conjunto se corrigen por aquellas en heterocigoto, y se usan posteriormente para calcular las frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas mayores del 10% se cuantifican de forma fiable mediante este método. La frecuencia alélica = 0 (cero) significa que el alelo se encontró entre individuos, pero el pico correspondiente no se ve en el conjunto examinado. La frecuencia alélica = 0-0,1 indica que los alelos menores se detectan en el conjunto pero los picos son demasiado bajos para cuantificar de forma fiable.

En aún otro método identificado como KYUGEN (método 1), los productos de PCR se marcan después con colorantes fluorescentes y se analizan mediante un sistema de electroforesis capilar automatizado en condiciones SSCP (PLACE-SSPC). Los ADNs de cuatro o más individuos se analizan con o sin los ADNs de conjunto (conjunto japonés y conjunto de padres CEPH) en una serie de experimentos. Los alelos se identifican mediante inspección visual. Se secuencian los ADNs individuales con genotipos diferentes y se identifican los SNPs. Las frecuencias alélicas se estiman a partir de la altura de los picos en las muestras de conjunto después de la corrección del sesgo de la señal usando la altura de los picos en heterocigotos. Para la PCR se etiquetan los cebadores para que tengan 5'-ATT ó 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas hebras. Las muestras de ADN (10 ng/ul) se amplifican en muestras de reacción que contienen el tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 ó 9,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM) 0,25 μ M de cada cebador, 200 μ M de cada dNTP, y 0,025 unidades/ μ l de la ADN polimerasa Taq premezclada con un anticuerpo anti-Taq. Las dos hebras de los productos de PCR se marcan diferencialmente con nucleótidos modificados con R1110 y R6G mediante una reacción de intercambio del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. La reacción se para añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatas alcalina de intestino de ternera. Para el SSCP: se añade una alícuota de productos de PCR marcados con fluorescencia y marcadores internos marcados con TAMRA a formamida desionizada, y desnaturalizada. Se realiza una electroforesis en un capilar usando un analizador ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Se usa software Genscan (P-E Biosystems) para la recogida de datos y el procesamiento de datos. Se somete el ADN de individuos (dos a once) incluyendo los que muestran genotipos diferentes en SSCP a secuenciación directa usando química de Big-Dye Terminator, en secuenciadores ABI Prism 310. Los diagramas de secuencias múltiples obtenidos del ABI Prism 310 se procesan y alinean mediante Phred/Phrap y se ven usando un visor Consed. Los SNPs se identifican mediante el software PolyPhred e inspección visual.

En aún otro método identificado como KYUGEN (Método 2), se buscan individuos con diferentes genotipos mediante HPLC desnaturalizante (DHPLC) ó PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997) y sus secuencias se determinan para identificar SNPs. La PCR se realiza con cebadores con etiquetas 5'-ATT ó 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas hebras. El análisis por DHPLC se lleva a cabo usando el sistema de análisis de fragmentos WAVW DNA (Transgenomic). Los productos de PCR se inyectan en una columna DANSep, y se separan en condiciones determinadas usando el programa WAVEMarker (Transgenomic). Las dos hebras de los productos de PCR que están marcadas diferencialmente con nucleótidos modificados con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. La reacción se para añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatas alcalina de intestino de ternera. Se realiza SSCP seguida por electroforesis en un capilar usando un analizador ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Software Genscan (P-E Biosystems). Se somete el ADN de individuos incluyendo los que muestran genotipos diferentes en DHPLC ó SSCP a secuenciación directa usando química de big-dye terminator, en secuenciadores ABI Prism 310. Los diagramas de secuencias múltiples obtenidos del ABI Prism 310 se procesan y alinean mediante Phred/Phrap y se ven usando un visor Consed. Los SNPs se identifican mediante el software PolyPhred e inspección visual. Los datos de los cromatogramas de secuencias EST en Unigene se procesan con PHRED. Para identificar posibles SNPs, se describen errores de emparejamiento de bases individuales a partir de alineamientos múltiples de secuencias producidos por los programas PHRAP, BRO y POA para cada grupo Unigene. BRO corrigió posibles orientaciones de EST mal descritas, mientras que POA identificó y analizó estructuras de alineamiento no lineales de mezcla de genes/quimeras que podrían producir SNPs falsos. Se usa la inferencia bayesiana para sopesar la evidencia de polimorfismos verdaderos frente a errores de secuencia, alineamientos incorrectos o ambigüedades, grupos incorrectos o secuencias EST quiméricas, evaluando datos tal como altura de cromatogramas sin procesar, agudeza, solapamiento y espaciamiento; tasas de errores de secuenciación; sensibilidad del contexto; origen de la genoteca de ADNc, etc.

En el método identificado como MARSHFIELD (Método B), se identifican secuencias de ADN humano que so-
lapan que contienen polimorfismos putativos de inserción/delección a través de búsquedas de bases de datos públicas. Los cebadores de PCR que flanquean cada sitio polimórfico se seleccionan a partir de secuencias consenso. Los cebadores se usan para amplificar ADN genómico humano individual o en conjuntos. Los productos de PCR resultantes se resuelven en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se usa un PhosphorImager para estimar las frecuencias alélicas de los conjuntos de ADN.

IV. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones acuosas pueden tener una cantidad eficaz de irinotecano y/o una cantidad eficaz de un compuesto (segundo agente) que aumenta la actividad conjugante de la enzima, representado por un compuesto que aumenta la actividad de la enzima conjugante de fase II, glucuronosiltransferasa o que disminuye el transporte biliar. Tales composiciones generalmente se disolverán o dispersarán en un soporte o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las frases “farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable cuando se administran a un animal, o ser humano, como sea apropiado. Como se usa aquí “soporte farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los principios activos, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar las composiciones principios activos suplementarios, como agentes anticáncer.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación con el tiempo; y cualquier otra forma actualmente en uso, incluyendo cremas, lociones, enjuagues bucales, inhalantes y similares.

A. Administración parenteral

Con frecuencia se formularán los principios activos para la administración parenteral, por ejemplo, formulados para inyección a través de las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea, o incluso intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa que contiene irinotecano y un segundo agente como principios activos será conocida para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Típicamente, se pueden preparar tales composiciones como inyectables, bien como soluciones líquidas bien como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para usar para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden ser emulsionadas.

Se pueden preparar soluciones de los principios activos como bases libres o sales farmacéuticamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un agente tensoactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar las dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol líquido; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos estos casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en tal grado que exista un inyectabilidad fácil. Debe ser estable en condiciones de producción y almacenamiento y debe estar conservada contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos.

Los principios activos se pueden formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tal como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaina y similares.

El soporte también puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes de retraso de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad requerida del solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requieran, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Tras la formulación, las soluciones se administran de una manera compatible con la formulación galénica y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas posológicas, tal como del tipo de las soluciones inyectables descritas antes, siendo incluso utilizables cápsulas de liberación de drogas y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación a esto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la materia a la luz de esta divulgación. Por ejemplo, una dosis se puede disolver en 1 mL de solución de NaCl isotónica y bien añadida a 1000 mL de líquido de hipodermocclisis o inyectada en el sitio de infusión propuesto, (ver por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosis dependiendo del estado del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

B. Administración oral

En algunas formas de realización, los compuestos activos se pueden administrar de forma oral. Esto se contempla para agentes que generalmente son resistentes, o se han hecho resistentes, a la proteólisis por las enzimas digestivas. Se contempla que tales compuestos incluyan todos aquellos compuestos, o drogas, que están disponibles en forma de comprimido del fabricante y derivados y análogos de los mismos.

Para la administración oral, los compuestos activos se pueden administrar, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un soporte asimilable comestible, o pueden estar comprendidos en cápsulas de gelatina dura o blanda, o comprimidos en comprimidos, o incorporados directamente en el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, los compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos no digeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones contendrán al menos el 0,1% de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede estar de forma conveniente entre alrededor del 2 hasta alrededor del 60% del peso de la unidad. La cantidad de compuestos activos en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tal como fosfato de dicalcio; un agente desintegrador, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente saborizante tal como menta, aceite de gualteria, o aroma de cereza. Cuando la forma de unidad posológica es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un soporte líquido. Pueden estar presentes algunos otros materiales como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la unidad posológica. Por ejemplo, se pueden recubrir los comprimidos, píldoras o cápsulas con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe de elixir puede contener el principio activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aroma, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma de unidad posológica debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Tras la formulación, los compuestos se administrarán en una manera compatible con la formulación posológica y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en varias formas posológicas, tal como las que se describen posteriormente en ejemplos específicos.

C. Liposomas

En una forma de realización particular, se contempla la formulación en liposomas. La encapsulación en liposomas de agentes farmacéuticos prolonga sus vidas medias comparadas con los sistemas convencionales de distribución de drogas. Puesto que se pueden empaquetar mayores cantidades de modo protector, esto permite la oportunidad de distribuir a las células dosis intensivas de esos agentes. Esto sería particularmente atractivo en la quimioterapia del cáncer cervical si hubiera mecanismos para mejorar específicamente el dirigir tales liposomas a estas células diana.

"Liposoma" es un término genérico que abarca varios vehículos de lípidos individuales y multilamelares formados por la generación de bicapas de lípidos encerradas. Según la presente invención se usan fosfolípidos para preparar liposomas y pueden llevar una carga neta positiva, una carga neta negativa o ser neutros. Se puede utilizar fosfato de dicetilo para conferir una carga negativa a los liposomas, y se puede usar estearilamina para conferir una carga positiva a los liposomas. Los liposomas se caracterizan por una membrana de bicapa de lípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen capas múltiples de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se resuspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lípidos sufren auto-reorganización antes de la formación de estructuras cerradas y cogen agua y disuelven solutos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan los complejos lípidos catiónicos-ácido nucleico, tal como los complejos lipofectamina-ácido nucleico.

Ejemplo 1

*Materiales y métodos*5 *Selección de pacientes*

Para participar en este estudio fueron elegibles pacientes con tumores sólidos confirmados histológicamente o con linfoma que se sabía respondían a irinotecano o para los cuales no existía terapia con beneficio probado. Otros criterios de elegibilidad incluyeron enfermedad medible por imágenes radiológicas o examen físico; edad de al menos 18 años; índice de Karnofsky de al menos el 70% (ambulatorio y capaz de autocuidarse); función orgánica adecuada definida como un número absoluto de neutrófilos (ANC) $\geq 1500 \mu\text{l}^{-1}$, número de plaquetas $\geq 100.000 \mu\text{l}^{-1}$, nivel de creatinina en suero $\leq 1,5 \text{ mg/dl}$ o depuración de creatinina $\geq 60 \text{ ml/min}$, niveles AST y ALT < 5 veces el límite superior de lo normal, y bilirrubina conjugada dentro de los límites normales. Los pacientes debían estar fuera de terapias anticáncer previas, incluyendo terapia de radiación, durante al menos 4 semanas (6 semanas si el tratamiento previo incluía nitrosourea o mitomicina C) y fuera del factor estimulante de colonias durante al menos 2 semanas. Se excluyeron del estudio los pacientes con historia de enfermedad inflamatoria del intestino que requerían terapia, síndrome de diarrea crónica, íleo paralítico, o trasplante de órgano o células madre. No se permitió el uso concurrente de medicaciones que pudieran ser sustratos de la enzima UGT1A1 o que pudieran ser inductores o inhibidores de la actividad UGT1A1. También se excluyeron de la participación mujeres embarazadas y en período de lactancia, y se requirió a aquellas con potencial reproductor que usaran un método anticonceptivo eficaz si estaban sexualmente activas.

Protocolo de tratamiento

El irinotecano fue suministrado por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) como una solución intravenosa a una concentración de 20 mg/ml en viales de 2 ml o 5 ml. La cantidad de irinotecano a administrar se recogió asepticamente del vial y se añadió a 500 ml de una solución salina al 0,9% o una inyección de dextrosa al 5%, USP. Treinta minutos después del pretratamiento con 20 mg de ondansetrón, se administró irinotecano 350 mg/m² como una infusión intravenosa de 90 minutos una vez cada 3 semanas - una dosis y plan estándar. Se realizaron historial, examen físico, hemograma completo (CBC) con diferencial, perfil químico de suero (electrolitos, nitrógeno de urea en sangre, creatinina, glucosa, albúmina, fosfatasa alcalina, GGTP, AST, ALT, bilirrubina total y conjugada, ácido úrico, y lactato deshidrogenasa), y perfil de coagulación (tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina) antes del primer tratamiento. Después, se llevaron a cabo historial, examen físico y evaluación de toxicidad en el día 1 de cada ciclo a menos que la toxicidad dependiente del tratamiento requiriera un seguimiento más frecuente. Se obtuvieron CBC y el perfil químico del suero una vez a la semana a lo largo del todo el tratamiento, aunque los CBCs se obtuvieron 3 veces por semana con la aparición de neutropenia de grado 3 ó 4 o trombocitopenia. La evaluación de la toxicidad se hizo según los criterios normales de toxicidad del NCI, versión 2.0 (sitio web: ctep.cancer.gov). Se realizó la evaluación objetiva del tumor mediante las imágenes radiográficas apropiadas antes de empezar la terapia y después de cada 2 ciclos.

40 *Tratamiento de la toxicidad y modificación de la dosis*

Para los pacientes que experimentaron diarrea, dolor abdominal, o diaforesis dentro de las 24 horas de la administración de irinotecano, se consideró la atropina intravenosa de 0,25 mg a 1 mg. La diarrea tardía, definida como diarrea que sucedía más de 24 horas después de la administración de irinotecano, se trató rápidamente con loperamida 4 mg al inicio y después con 2 mg cada 2 horas hasta que el paciente estuvo libre de diarrea durante al menos 12 horas. Para pacientes en los que falló la terapia de loperamida, se añadieron de forma secuencial difenoxilato, octreótido, y tintura de opio según fue necesario. Se instruyó a los pacientes para que se hidrataran de forma oral energicamente y fueron ingresados en el hospital para reemplazo de electrolitos y líquidos intravenoso cuando fue necesario. No se empezó un nuevo curso de terapia hasta que el ANC se recuperó al menos a $1500 \mu\text{l}^{-1}$, el número de plaquetas se recuperó al menos a $100.000 \mu\text{l}^{-1}$, y la diarrea relacionada con el tratamiento se resolvió del todo. A los pacientes con toxicidades de grado 3 ó 4 de cualquier tipo se les redujo la dosis en 50 mg/m² para ciclos posteriores.

Recogida de muestras

Antes de la primera infusión con irinotecano, se recogió sangre venosa (4,5 ml) para el genotipado en tubos Vacutainer® de tampón púrpura que contenían EDTA (Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, NJ) y se almacenaron a -80°C durante no más de 5 días antes del análisis. La sangre venosa para el análisis farmacocinético se recogió en el día 1 del ciclo 1 para el análisis farmacocinético. Se recogieron muestras de 7 ml en tubos Vacutainer® heparinizados de tapa verde antes de la infusión; a los 30, 60 y 90 minutos durante la infusión; y a los 10, 20, 30, 45, y 60 minutos y 1,5, 2, 4, 6, 12, y 24 horas después de la infusión. Las muestras se centrifugaron (2500 rpm, 20 minutos, 4°C) y el plasma se separó inmediatamente, se transfirió como dos alícuotas a tubos de almacenamiento, se congeló a -80°C hasta el análisis.

Ensayos de genotipado de UGT1A1

65 Hay una lista de las variantes tipadas en estudio en la Tabla 1. El polimorfismo de UGT1A1 (TA)_nTAA se genotipó mediante PCR y tamaño de producto como se ha descrito previamente (Te *et al.*, 2000). Los alelos con 6 repeticiones TA dieron como resultado un fragmento de 98 bp mientras que los alelos con 7 repeticiones TA dieron como resultado

un fragmento de 100 bp. Los alelos con repeticiones de 5 TA y 8 TA dieron como resultado fragmentos de 96 y 102 bp. Los alelos con repeticiones de 5, 6, 7 y 8 TA se describen como (TA)_n y los genotipos se asignan en base al número de repeticiones en cada alelo, es decir, 6/6, 6/7, 7/7, 6/8, etcétera.

5 Las variantes en la región 5' corriente arriba (-3279G>T y -3156G>A) y en el exón 1 [211G>A (G71R) y 686C>A (P229Q)] se genotiparon mediante extensión de base individual (SBE) y se separaron en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante (DHPLC) (Devaney *et al.*, 2001). El genotipado de las variantes -3279G>T y -3156G>A se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de la región 5' corriente arriba de UGT1A1 que contiene ambas variantes. Los cebadores de PCR usados fueron: 5'-ACC TCT AGT TAC ATA ACC
10 TGA A-3' (cebador directo) y 5'-AAT AAA CCC GAC CTC ACC AC-3' (cebador inverso). Las PCRs se realizaron en un volumen de 15 µl que contenía 125 nM de cada cebador, MgCl₂ 2,5 mM, 50 µM de cada dNTP y 0,375 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) en el tampón proporcionado por el fabricante. Las condiciones para los ciclos de PCR fueron 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 15 segundos y 72°C durante 30 segundos en ciclador térmico 9600 (Applied Biosystems). Los productos de PCR amplificados se purificaron usando fosfatasa alcalina de gamba y exonucleasa I incubando a 37°C durante 45 minutos antes de la reacción SBE. Las reacciones SBE se realizaron en duplex para el genotipado de ambas variantes en volúmenes de 10 µl que contenían 1 µM del cebador de extensión (5'-GCC AAG GGT AGA GTT CAG T-3' para -3279G>T y 5'-GAC CCC AGC CCA CCT GTC-3' para -3156G>A), 250 µM de cada dNTP y 1,25 U de termosecuencia (Amersham Pharmacia Biotech). Las reacciones se hicieron en ciclos a 96°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 60°C durante 30 segundos durante 60
20 ciclos. La separación de los productos SBE se realizó en un sistema WAVE 3500HT DHPLC (Transgenomic Inc.) a 70°C después de desnaturalizar las muestras. La velocidad de flujo usada fue de 1,5 ml/min y el tiempo de carrera para cada muestra fue de 2,5 minutos. El gradiente usado para la elución de los productos SBE se creó mediante el software basado en la longitud de los productos extendidos y se ajustó desde el 24% al 34% del tampón B durante dos minutos (el tampón B contiene acetonitrilo al 25%). Los productos extendidos se eluyeron en el orden C<G<T<A que
25 depende de las diferencias de hidrofobicidad de las cuatro bases.

El genotipado de las variantes del exón 1 211G>A y 686C>A se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 774 bp que abarca ambas variantes. Los cebadores de PCR usados fueron: 5'-ATG CTG GGA AGA TAC TGT TG-3' (cebador directo) y 5'-TTT GGT GAA GGC AGT TGA TT-3' (cebador inverso). Las PCRs se
30 realizaron en un volumen de 15 µl que contenía 125 nM de cada cebador, MgCl₂ 2,5 mM, 100 µM de cada dNTP y 0,375 U de polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) en el tampón proporcionado por el fabricante. Las condiciones para los ciclos de PCR fueron 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 15 segundos y 72°C durante 45 segundos en ciclador térmico 9600 (Applied Biosystems). La purificación de la PCR se realizó como se ha descrito anteriormente y las reacciones de SBE se realizaron en volúmenes de 10 µl que contenían 1 µM del cebador de extensión (5'-GTC TTC AAG GTG TAA AAT GCT C-3' para 211G>A o 5'-GTG CGA CGT GGT TTA TTC CC-3' para 686C>A) usando las condiciones descritas antes. Para la separación en el sistema DHPLC, se usó una
35 velocidad de flujo de 1,5 ml/min y un tiempo de carrera de 3 minutos para cada muestra. El gradiente usado para la elución de los productos SBE se creó mediante el software WAVE basado en la longitud de los productos extendidos y se ajustó desde el 25,6% al 38,1% del tampón B durante 2,5 minutos.

40 *Análisis farmacocinético*

Se determinaron las concentraciones en plasma de irinotecano y sus metabolitos como se ha publicado previamente (Iyer *et al.*, 2001). Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para irinotecano, SN-38, y SN-38G usando métodos
45 estándar no compartimentales con WinNonlin 2.0 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA). Se determinó el área bajo la curva de concentración en plasma -tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta la última concentración medida de irinotecano y metabolitos mediante el método trapecoidal lineal. La tasa de glucuronidación se expresó como la razón del AUC de SN-38G sobre el AUC de SN-38.

50 *Análisis estadístico*

El estudio se diseñó originalmente para investigar de forma prospectiva la relación entre la variación genética en el promotor de UGT1A1 y la diarrea de grado 3-4. Los resultados de los ensayos clínicos usando el plan de 350 mg/m² cada 3 semanas sugieren un frecuencia de diarrea del 20 al 35% (ref). En base a datos previos publicados,
55 un modelo mendeliano de un gen único implicaba que el 16% de los pacientes tendrían un genotipo 7/7, el 48% tendría un genotipo 6/7, y el 36% tendría un genotipo 6/6. Un tamaño de muestra de 60 habría tenido poder de 0,8 a $\alpha = 0,05$ para detectar una tendencia lineal en la proporción de pacientes dentro de cada genotipo que experimentan diarrea de grado 3-4 definida por el 60% de pacientes 7/7, el 30% de pacientes 6/7, y el 10% de pacientes 6/6.

60 Sin embargo, debido a una frecuencia menor de la esperada de diarrea de grado 3-4 (ver más adelante) los análisis se enfocaron en su lugar sobre la frecuencia de neutropenia de grado 4 (ANC <500 µl⁻¹). Se usaron pruebas de tendencias no paramétricas para investigar cómo se relaciona el genotipo con los parámetros farmacocinéticos, niveles de bilirrubina pretratamiento y nadir de ANC. Se evaluó la relación entre el genotipo y la neutropenia de grado 4 mediante el
65 uso de la prueba exacta de Fisher y el cálculo de riesgos relativos. Se realizaron análisis de regresión univariante para identificar los factores de pronóstico potenciales para el nadir de ANC. Se realizaron en escala logarítmica para ANC para reducir la desviación en los residuos. También se consideraron las variables de pretratamiento conjuntamente a través de modelos de análisis de covarianza (ANCOVA) para identificar las medidas del pretratamiento que pueden

predecir ln(nadir de ANC). Se usó un modelo diferente de ANCOVA considerando simultáneamente las variables de pre- y postratamiento para explorar el mecanismo mediante el cual la variabilidad en el estado de UGT1A1 podría afectar el nadir de ANC.

Ejemplo 2

Papel de -3156G>A de UGT1A1 en la toxicidad de irinotecano

Características de los pacientes

Se enrolaron sesenta y seis pacientes en el estudio (Tabla 2). Erróneamente no se sacó sangre para la extracción de ADN en un paciente y la información del genotipo está disponible en 65 pacientes. Sesenta y tres pacientes fueron evaluables para toxicidad ya que 3 pacientes (uno 6/6, uno 6/7, uno 7/8) faltaron a las pruebas de sangre programadas y/o la citas con el médico. Sesenta pacientes son evaluables para la respuesta tumoral, ya que 6 de ellos fueron eliminados del estudio antes de la evaluación radiológica de la respuesta tumoral. Todos los pacientes recibieron antes tratamientos de quimioterapia. Treinta y cinco de ellos recibieron antes radioterapia adicional.

Frecuencias alélicas y genotípicas

Las frecuencias alélicas de la indel TA fueron: TA₆ = 0,68, TA₇ = 0,29, TA₈ = 0,02, TA₅ = 0,01. Los alelos TA₅ y TA₈ se dieron exclusivamente en pacientes negros (uno con genotipo 5/6, dos pacientes con 6/8, y un paciente con 7/8). Los alelos -3279T y -3156A tenían una frecuencia de 0,55 y 0,26, respectivamente.

La tabla 3 muestra las frecuencias de los haplotipos del promotor que comprenden -3279, -3156, e indel TA, basados en publicaciones previas sobre su desequilibrio de ligamiento (Innocenti *et al.*, 2002). La frecuencia de los pares de haplotipos se muestra en la tabla 4. No se detectaron variables del exón 1 (211G>A y 686C>A) en esta población de pacientes.

Prevalencia de toxicidad, riesgo relativo, prueba genética

La toxicidad de diarrea y neutropenia se refiere a hechos observados durante el ciclo 1 del tratamiento. La frecuencia de neutropenia de grado 4 fue del 9,5%. La neutropenia de grado 4 fue mucho más común en pacientes con genotipo 7/7 (3/6, 50%) comparada con genotipo 6/7 (3/24, 12,5%) y genotipo 6/6 (0/30, 0%) ($p = 0,001$, prueba exacta de Fisher). El análisis de tendencia no paramétrico reveló que el polimorfismo de la indel TA se correlaciona significativamente con ln(nadir de ANC) ($7/7 < 6/7 < 6/6$, $z = -2,35$, $p = 0,02$) (Fig. 1).

Puesto que la variante -3156G>A distingue entre dos haplotipos diferentes en los individuos TA₇, se analizó el riesgo relativo de neutropenia de grado 4 para el genotipo -3156 AA (frente a AG y GG combinados) y genotipo 7/7 (frente a 5/6, 6/6, 6/7 y 6/8 combinados). Se encontró un riesgo relativo mayor en pacientes con el genotipo -3156 AA (14,0, IC 95% 2,1-36,7) comparados con pacientes con el genotipo 7/7 (9,3, IC 95% 1,7-40,7, $n = 63$). Además, se evaluó el poder predictivo de una prueba genética en pacientes que recibían irinotecano tanto para la variante de la indel TA como para -3156 (Tabla 5). Se evaluó el poder predictivo de los genotipos 7/7 ó -3156 AA para neutropenia de grado 4. Además, se evaluó el poder predictivo de los genotipos 6/6 ó -3156 GG en relación a la ausencia de neutropenia de grado 4 (es decir, grado 0-3). En esta comparación, se consideró a los pacientes 6/8 como de genotipo 6/6 ó 6/7 para evaluar si los pacientes con un alelo TA₈ podrían ser un factor de confusión para los resultados de la prueba genética.

Aunque que este estudio se concibió originalmente para examinar la relación entre el genotipo de UGT1A1 y la gravedad de la diarrea, la frecuencia de diarrea de grado 3 en los pacientes fue solo del 5% ($n = 3$), sin casos de diarrea de grado 4. Ninguno de los tres pacientes con diarrea de grado 3 era 6/6 (2 genotipos 6/7 y uno 7/7). Respecto a los sucesos de diarrea en pacientes con el alelo TA₈ (dos 6/8 y uno 7/8), sólo se describió un suceso de grado 1 en un paciente 6/8. La baja frecuencia de la diarrea grave no permitió ningún análisis estadístico formal.

Bilirrubina total: correlación con el genotipo de indel TA y toxicidad

Se obtuvieron los niveles totales de bilirrubina pretratamiento en todos los pacientes ($0,5 \pm 0,22$ mg/dl, media $\pm$ DE, $n = 66$). Como se muestra en la Fig. 5, los niveles totales de bilirrubina estaban significativamente correlacionados con el polimorfismo de la indel TA (análisis de tendencia no paramétrico, $7/7 > 6/7 > 6/6$, $z = 2,88$, $p < 0,01$). Los niveles totales de bilirrubina fueron significativamente mayores en pacientes 7/7 comparados con pacientes 6/6 y 6/7 combinados ($0,80 \pm 0,29$ mg/dl y $0,48 \pm 0,19$ mg/dl, respectivamente, $p = 0,0003$). Respecto a la distribución de los genotipos -3156 dentro de cada grupo de genotipo de indel TA, en el grupo del genotipo 6/7, los tres pacientes con genotipo GG tenían niveles de bilirrubina bajos de 0,3-0,4 mg/dl. De forma similar, los dos pacientes con genotipos 6/8 y GG tenían niveles bajos de bilirrubina de 0,2-0,3 mg/dl. El paciente con genotipo GA en el grupo 7/7 tiene un nivel de bilirrubina de 0,6 mg/dl, que está en el rango bajo para este grupo genotípico. El paciente 7/8 no tiene los niveles de bilirrubina total marcadamente elevados como se esperaría si el alelo TA₈ produjera un descenso en la glucuronidación.

Además, las variantes -3156 y de indel TA se correlacionaron con la bilirrubina total mediante análisis de regresión múltiple. El genotipo AA mostró una correlación ligeramente mejor ($r^2 = 0,28$, $p < 0,0001$) comparado con el genotipo 7/7, bien cuando los alelos TA_8 se consideraron como TA_6 ($r^2 = 0,23$, $p < 0,002$) ó TA_7 ($r^2 = 0,20$, $p < 0,0009$). La otra variante común -3279G>T no tenía asociación significativa con la bilirrubina total (datos no mostrados).

También se analizó si la bilirrubina pretratamiento se correlacionaría con la neutropenia. Se observaron niveles de bilirrubina significativamente mayores en pacientes con neutropenia de grado 4 ($0,83 \pm 0,21$ mg/dl) comparados con aquellos sin neutropenia de grado 4 ($0,47 \pm 0,20$ mg/dl) ($p = 0,0001$) (Fig. 3). No se describieron casos de neutropenia de grado 4 en pacientes con niveles de bilirrubina menores de 0,6 mg/dl. De 7 pacientes con bilirrubina total mayor de 0,7 mg/dl, 4 de ellos tuvieron neutropenia de grado 4.

Correlación entre el genotipo de indel TA y parámetros FC

La tabla 6 describe los parámetros farmacocinéticos del irinotecano y sus metabolitos estratificados por los genotipos 6/6, 6/7 y 7/7. El AUC de SN-38 aumenta al aumentar el número de alelos TA_7 (análisis de tendencia no paramétrico, $7/7 > 6/7 > 6/6$, $z = 2,13$, $p = 0,03$). Por el contrario, las tasas de glucuronidación (razones del AUC de SN-38G/SN-38) se reducían al aumentar el número de alelos TA_7 , (análisis de tendencia no paramétrico, $6/6 > 6/7 > 7/7$, $z = 2,16$, $p = 0,03$). No se encontró tendencia significativa para los AUCs del irinotecano y SN-38G ($p < 0,05$).

Análisis de regresión

Se buscó comprender el impacto tanto de la variabilidad farmacocinética como de las variables de pretratamiento (incluyendo el genotipo) en la variabilidad en la neutropenia. En lugar del genotipo de la indel TA, se usó la variante -2156 porque 1) el genotipo -3156 se correlacionaba mejor con el riesgo de neutropenia de grado 4 y 2) -3156 reflejaba mejor el estado UGT1A1 de los pacientes, en base a datos sobre la correlación con la bilirrubina total. Los análisis de regresión univariante del nadir de ANC seleccionaron el AUC de SN-38, la bilirrubina total y el genotipo -3156 como las tres variables independientes mejores (Tabla 7). El género mostró una correlación no significativa con el nadir de ANC pero se incluyó en el modelado adicional debido a posibles diferencias en la glucuronidación por género. Otras variables no mostraron ninguna correlación.

Análisis multivariante

Se consideraron varios modelos de ANCOVA multivariante predictivos para identificar las medidas de pretratamiento que predicen $\ln(\text{nadir de ANC})$. Se seleccionó el modelo final ($r^2 = 0,41$) mediante eliminación regresiva a partir de la tabla 7 y se presenta en la tabla 8. Se encontró que el nivel de bilirrubina pretratamiento era muy significativo y estaba relacionado negativamente con $\ln(\text{nadir de ANC})$. Se encontró que el género y el genotipo -3156 eran marginalmente significativos después de ajustar para el nivel total de bilirrubina. Se encontró que $\ln(\text{nadir de ANC})$ tenía un valor menor en mujeres, y que disminuía al aumentar el número de alelos (TA)₇ ($6/6 > 6/7 > 7/7$). No se encontró que otros factores, tales como la etnia, número de tratamientos anteriores, estado general, y $\ln(\text{ANC de pretratamiento})$, fueron factores de diagnóstico para $\ln(\text{nadir de ANC})$ después de ajustar para el genotipo -3156, género y bilirrubina total.

Después de determinar el modelo predictivo usando variables de pretratamiento, se añadieron al modelo las medidas postratamiento del AUC de irinotecano, AUC de SN-38, AUC de SN-38G, y razón de glucuronidación como variables independientes con la intención de determinar el posible mecanismo de cómo la variabilidad en el estado de UGT1A1 afecta a $\ln(\text{nadir de ANC})$. El modelo final seleccionado mediante eliminación regresiva ($r^2 = 0,5141$) que predice mejor el $\ln(\text{nadir de ANC})$ incluye genotipo y AUC de SN-38 ($p < 0,001$) (tabla 9).

Muerte por toxicidad y respuesta

Se describió una muerte por toxicidad, ya que el paciente murió de sepsis relacionada con neutropenia. Ingresó en el hospital en el día 7 del ciclo 1 con fiebre y sin que se detectaran de neutrófilos (recuento de células blancas de $100 \mu l^{-1}$). Se le trató de forma empírica con ceftazadima, tobramicina, y fluconazol, aunque nunca se identificó fuente infecciosa. A pesar del apoyo con factor estimulante de colonias de granulocitos, el paciente permaneció neutropénico, se volvió séptico, y murió en el día 11. Tenía genotipo 7/7 y el mayor nivel pretratamiento de bilirrubina total observado en estos pacientes (1,2 mg/dl).

Respecto a las tasas de respuesta en este ensayo, se observaron 3 respuestas objetivas. Dos pacientes alcanzaron una respuesta parcial (uno con cáncer colorrectal y el otro de cabeza y cuello) y tenían un genotipo 6/7. Un paciente de cáncer colorrectal alcanzó una respuesta completa y tenía genotipo 6/6.

Tablas

TABLA 1

Variantes UGT1A1 tipadas en este estudio

Las posiciones indicadas son de la primera base del sitio de inicio de *UGT1A1* en la secuencia de referencia del grupo *UGT1A1* (AF297093).

Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Exón
-3156G>A	-	Promotor
-3279G>T	-	Promotor
indel TA	-	Promotor
211G>A	G71R	1
668C>A	P229Q	1

TABLA 2

Características de los pacientes

	No. de pacientes
Pacientes	
Participantes	66
Evaluables para toxicidad	63
Evaluables para respuesta	60
Sexo	
Masculino	39
Femenino	27
Edad, mediana (rango)	60 (34-85)
Etnia	
Blancos	50
Negros	10
Hispanos	4
De las islas del Pacífico	1
Asiáticos	1
Estado clínico	
100%	18
90%	31
80%	10
70%	17
Tipo de tumor	
Colorrectal	10
Gastroesofágico	14
Cabeza y cuello	5
Hígado	2
Pulmón	19
Páncreas	3
Primario desconocido	4
Otros	9
Radioterapia previa	35

ES 2 308 208 T3

TABLA 3

Frecuencias de haplotipos en el promotor de UGT1A1

-3279G>T	-3156G>A	indel TA	Frecuencia
T	G	6	0,55
G	G	6	0,13
G	A	7	0,25
G	G	7	0,03
G	G	8	0,02
G	G	5	0,01

TABLA 4

Frecuencia de pares de haplotipos

Los haplotipos reflejan el cambio de las variantes de -3279, -3156, y de la indel TA, de modo que la primera base se refiere a las variantes -3279, la segunda la variante de -3156 y el número se refiere al número de repeticiones TA.

Pares de haplotipos	Frecuencia
TG6/TG6	0,28
TG6/GA7	0,28
TG6/GG6	0,18
GA7/GA7	0,08
GG6/TA7	0,06
TG6/GG7	0,05
TG6/GG8	0,02
GG6/GG8	0,02
GG5/TG6	0,02
GA7/GG8	0,02

TABLA 5

Pruebas genéticas para los genotipos de indel TA y -3156

Los datos se muestran con el IC del 95% entre paréntesis. El paciente con genotipo 5/6 se consideró que tenía un genotipo 6/6.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
7/7, grado 4	0,50 (0,19-0,81)	0,95 (0,85-0,98)	0,50 (0,19-0,81)	0,95 (0,85-0,98)
-3156 AA, grado 4	0,50 (0,19-0,81)	0,96 (0,88-0,99)	0,60 (0,23-0,92)	0,95 (0,86-0,98)
6/6, grado 0-3, 6/8=6/6	0,57 (0,44-0,69)	1,00 (0,61-1,00)	1,00 (0,89-1,00)	0,20 (0,10-0,37)
6/6, grado 0-3, 6/8=6/7	0,54 (0,41-0,66)	1,00 (0,61-1,00)	1,00 (0,89-1,00)	0,20 (0,09-0,35)
-3156 GG, grado 0-3	0,63 (0,49-0,74)	1,00 (0,61-1,00)	1,00 (0,90-1,00)	0,20 (0,11-0,41)

VPP, valor predictivo positivo

VPN, valor predictivo negativo

ES 2 308 208 T3

TABLA 6

Parámetros farmacocinéticos y por genotipos 6/6, 6/7, y 7/7 de indel TA

Los datos se expresan como media (desviación estándar).

Genotipo de indel TA	No. de pacientes	AUC de irinotecano (ng*h/ml)	AUC de SN-38 ^a (ng*h/ml)	AUC de SN-38G (ng*h/ml)	Tasa de glucuronidación ^b (AUC SN-38G/AUC SN-38)
6/6	30	24412,8 (7691,6)	335,9 (167,7)	1954,2 (1361,1)	6,52 (3,98)
6/7	25	26085,5 (10814,2)	458,4 (379,8)	1887,9 (1682,5)	5,55 (4,79)
7/7	6	25432,9 (6694,9)	542,0 (195,3)	1819,1 (1249,8)	3,59 (2,81)

^a6/6<6/7<7/7, z=2,13, p=0,03, análisis de tendencia no paramétrico

^b6/6>6/7>7/7, z=-2,16, p=0,03, análisis de tendencia no paramétrico

TABLA 7

Análisis univariante de ln(nadir de ANC)

Variable independiente	r ²	p
AUC de SN-38	0,3523	<0,0001
Bilirrubina pretratamiento total	0,2979	<0,0001
Genotipo -3156	0,2413	0,0003
AUC irinotecano	0,1273	0,0041
Tasa de glucuronidación	0,1171	0,0060
Género	0,0445	0,0971
AUC de SN-38G	0,0411	0,1109
Edad ≥70	0,0242	0,2231
Etnia blanca	0,0128	0,3764
Ln(ANC pretratamiento)	0,0000	0,9749
Estado clínico	0,0016	0,9923

TABLA 8

ANCOVA para el modelo predictivo final de ln(nadir de ANC) usando variables de pretratamiento

El modelo en conjunto muestra un valor de r² de 0,4048 (p<0,0001).

	Coefficiente	DE	valor de p
Corte	8,1885	0,2797	<0,001
Genotipo			
AA vs. GG+GA	-0,9401	0,3986	0,022
Género			
Hombres vs. Mujeres	0,4323	0,2001	0,035
Bilirrubina total	-1,8452	0,4816	<0,001

DE, desviación estándar

ES 2 308 208 T3

TABLA 9

ANCOVA para el modelo predictivo final de $\ln(\text{nadir de ANC})$ usando variables de pretratamiento y postratamiento

El modelo en conjunto muestra un valor de r^2 de 0,5128 ($p < 0,0001$).

	Coefficiente	DE	valor de p
Corte	8,3111	0,1517	<0,001
Genotipo			
AA vs. GG+GA	-1,3798	0,3234	<0,001
AUC de SN-38	-0,0019	0,0003	<0,001

DE, desviación estándar

Referencias

Las siguientes referencias se incorporan específicamente aquí por referencia

Rougier et al., *Lancet.*, 351(9117): 1677-1681, 1998.

Cunningham et al., *Lancet.*, 352(9138): 1413-1418, 1998.

Saltz et al., *N. Engl. J. Med.*, 343(13): 905-914, 2000.

Rothenberg et al., *J. Clin. Oncol.*, 19(18): 3801-3807, 2001.

Rothenberg et al., *J. Clin. Oncol.*, 11(11): 2194-21204, 1993.

Fuchs et al., *J. Clin. Oncol.*, 21(5): 807-814, 1993.

Vanhoefer et al., *J. Clin. Oncol.*, 19(5): 1501-18, 2001.

Ratain et al., *J. Clin. Oncol.*, 20(1): 7-8, 2002.

Beutler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(14): 8170-8174, 1998.

Te et al., *Transplantation*, 69 :1882, 2000.

Devaney et al., *Anal. Chem.*, 73: 620-624, 2001.

Ando et al., *Cancer Res.*, 60(24): 6921-6926, 2000.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para evaluar el riesgo de toxicidad de irinotecano en un paciente que comprende:

determinar la secuencia de nucleótidos en la posición -3156 en

(a) un gen UGT1A1 del paciente; ó

(b) ambos genes UGT1A1 del paciente.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además analizar una tasa de glucuronidación asociada con una secuencia en la posición -3156 en uno o ambos genes UGT1A1.

3. El método de la reivindicación 1(a), que comprende además determinar la secuencia de nucleótidos en la posición -3156 de ambos genes UGT1A1 en el paciente.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además clasificar el nivel de la actividad UGT1A1 en el paciente, por lo que la identificación de un residuo de guanina indica que el paciente no tiene un nivel bajo de actividad.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde determinar la secuencia de nucleótidos en la posición -3156 de un gen o genes UGT1A1 se realiza mediante

(a) un ensayo de hibridación;

(b) un ensayo de secuenciación o microsecuenciación; ó

(c) un ensayo de amplificación específica de alelo.

6. Uso de irinotecano para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer en un paciente que tiene un nucleótido de guanina en la posición -3156 en uno o ambos genes UGT1A1.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde al paciente se le va a administrar un segundo agente que reduce la excreción de una especie activa de irinotecano a través de la bilis.

8. Uso de irinotecano y un segundo agente que reduce la excreción de una especie activa de irinotecano a través de la bilis para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer en un paciente que tiene un residuo de guanina en la posición -3156 en uno o ambos genes UGT1A1, en donde el irinotecano se administra en combinación con dicho segundo agente.

9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la dosis de irinotecano se optimiza.

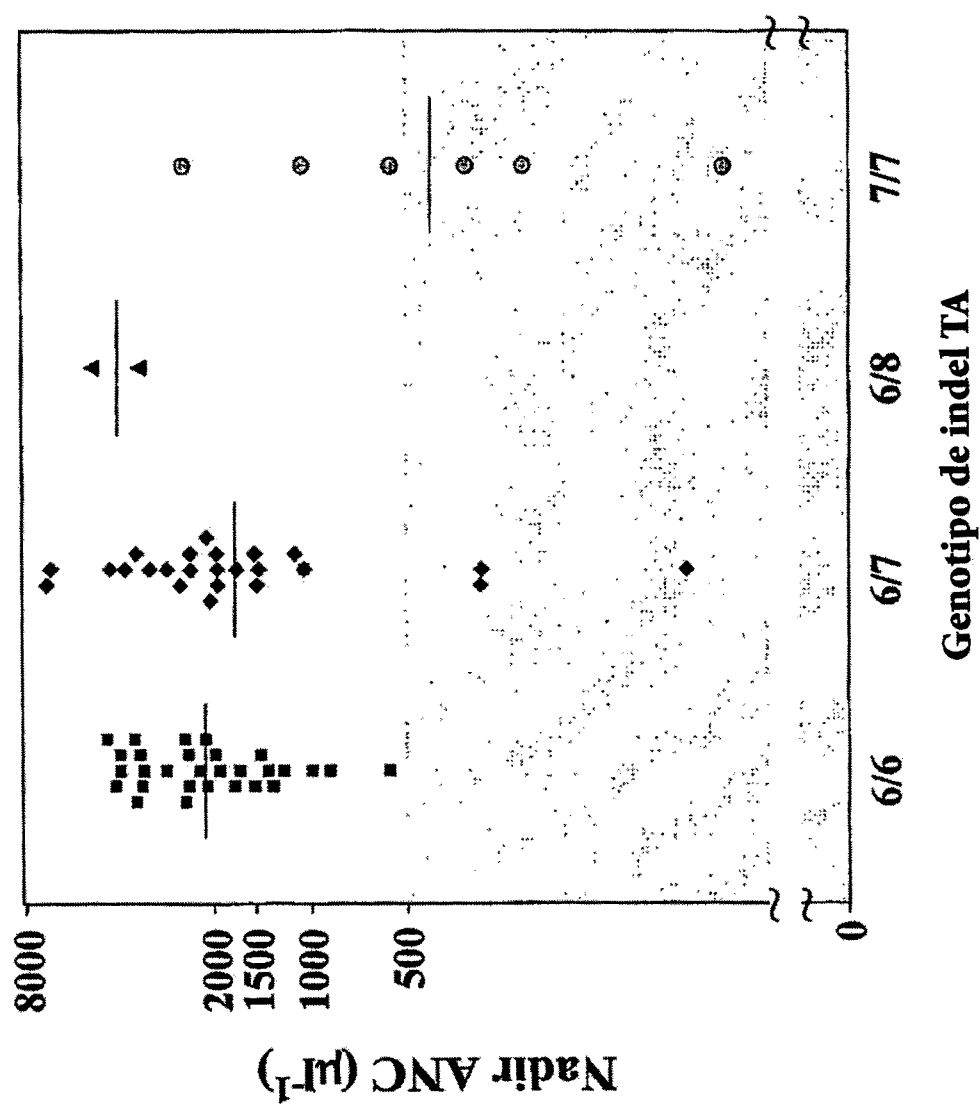


FIG. 1

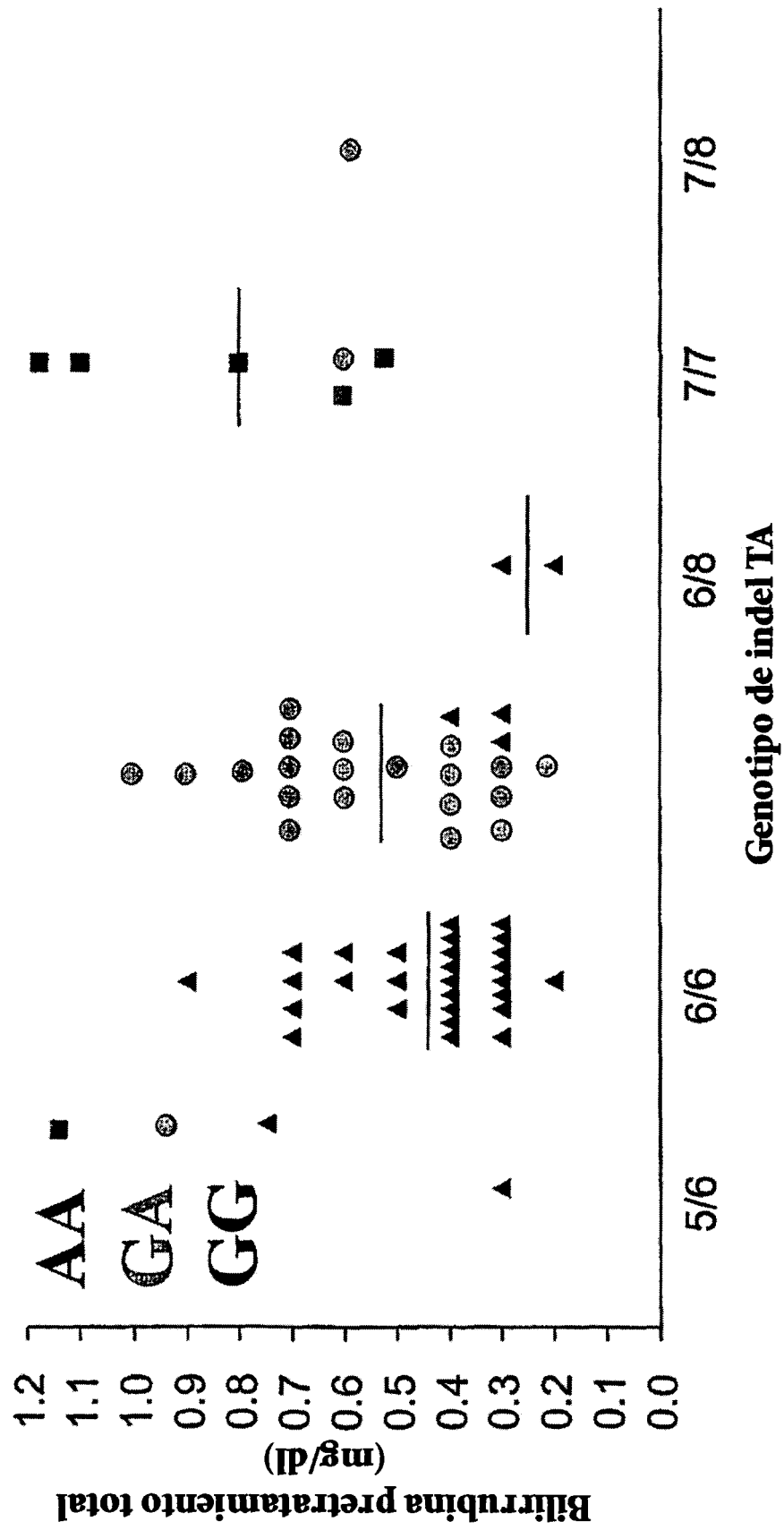


FIG. 2

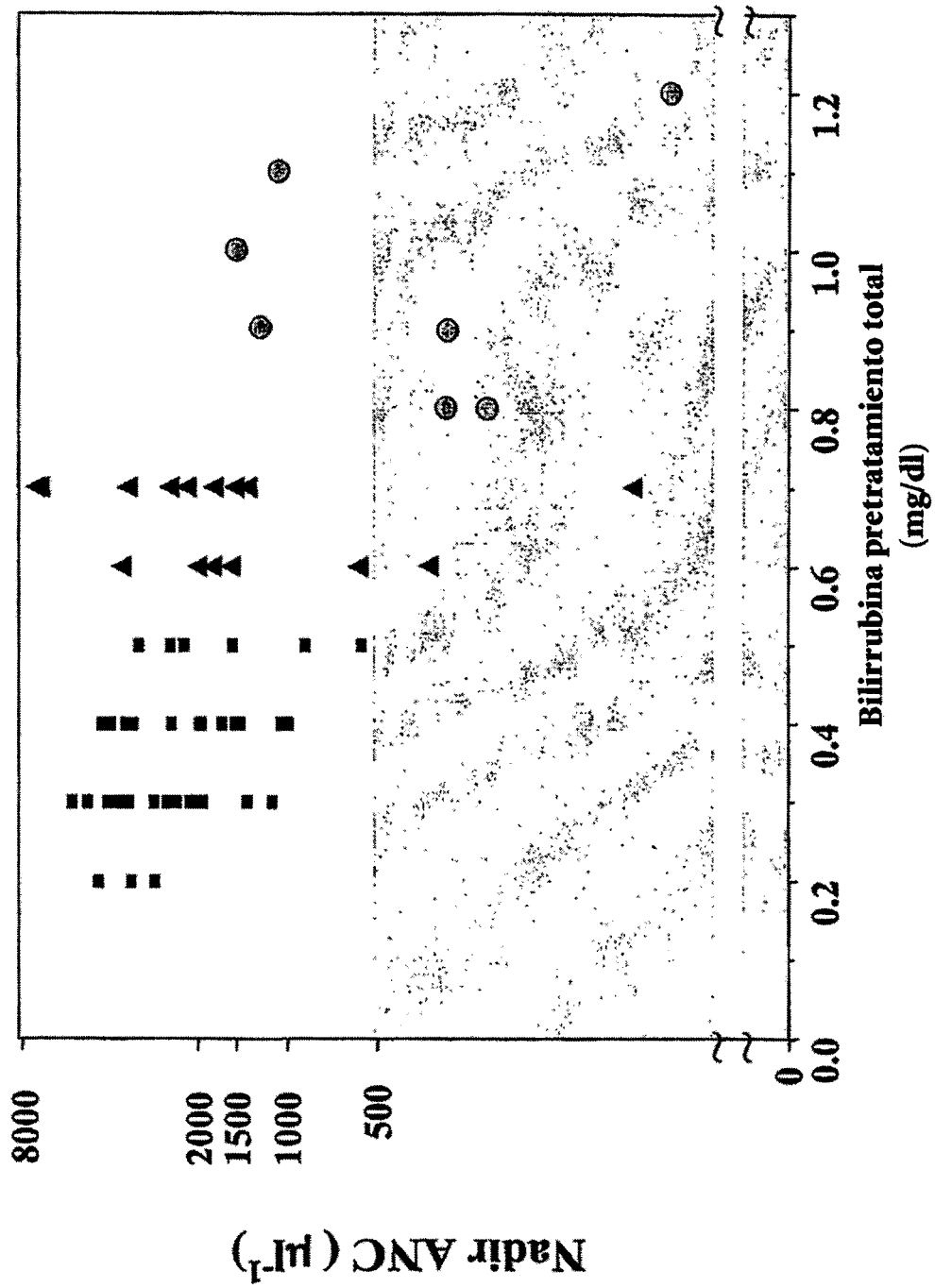


FIG. 3

-3565	TCCTTCACCTCCTCCTTATTCTCTTTTGTGACACTGGATTCTTTGCTTTGATATAATTGTGGGSCANTACACTAGTAAAG
-3486	NR4 GTCACTCAATTCCTCAGGGGAAATGATTAAACCAAGAACAATCTTAAGGTTTCATAAAGGTTATTAGGTGTAATGAGGAT gtNR1
-3407	GTGTTA CTCACCAGAACAAACTTCTGAGTTTATATAACCTCTAGTTACATAACCTGAAACCCGGACTTGGCCTTGGT NR3
-3328	AAGCAGCAATGAACAGTCATAGTAACTGGCCAAAGGTAGAGTTTCACTTTGACAAAGCAATTTGAGAACATCAAGG
-3249	AAGTTTGGGGAACAGCAAGGATCCAGAAATGGCTAGAGGTTAGAGGCAGAGGGAGGGGCAAGCAGAGAGGGTGGAGA
-3170	GGAGGAATGAGCTTGGACAGGTGGGCTGGGGTCTATCCAGAGTTTTCAGAGCAAGGCAGAGGACTCTGTAATTTTCT
Variates -3440C>A -3401T>C -3279G>T -3177C>G -3175A>G -3156G>A	

FIG. 4

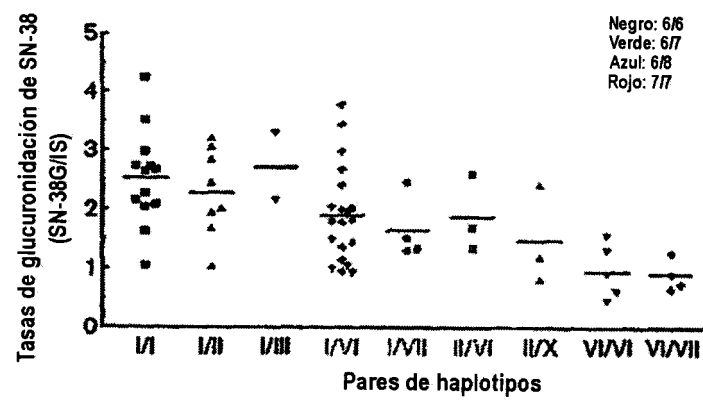


FIG. 5

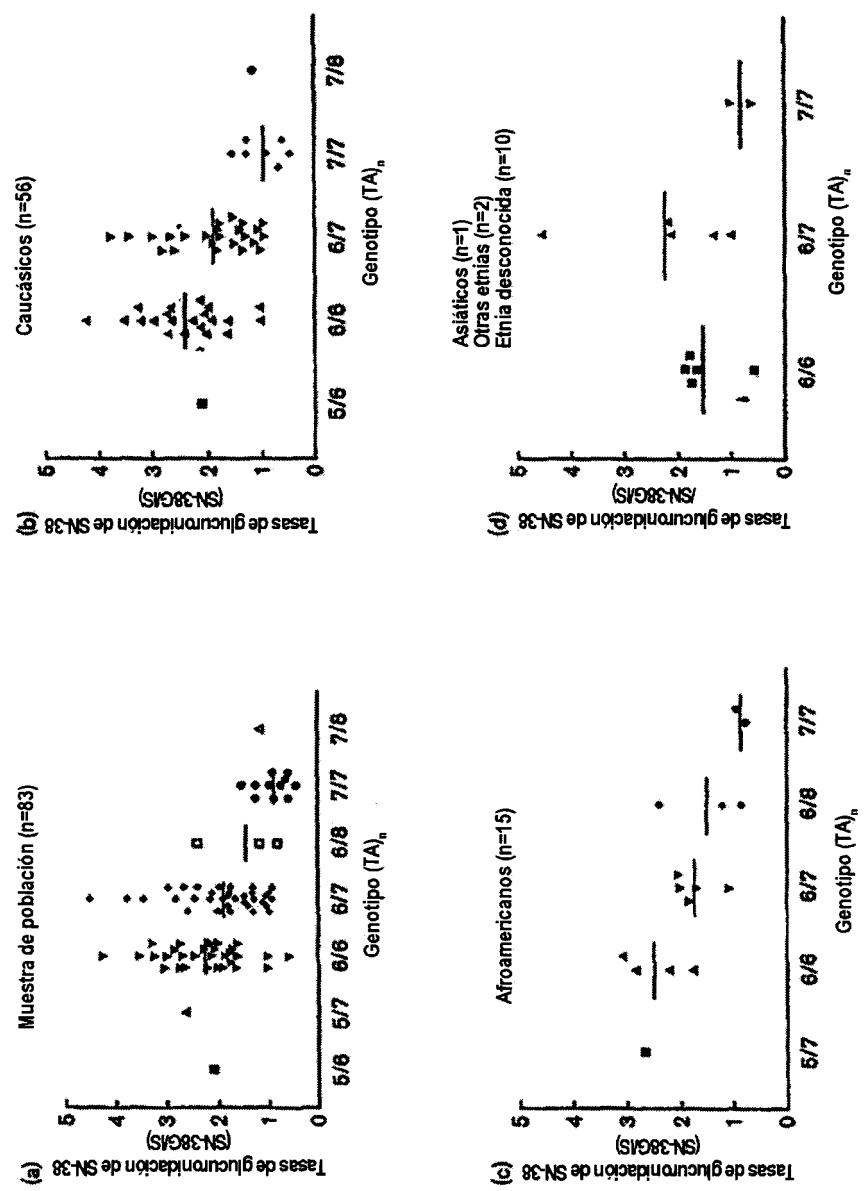


FIG. 6