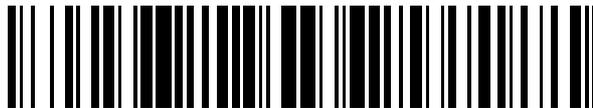


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 984**

21 Número de solicitud: 201130247

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

24.02.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.01.2013

Fecha de la concesión:

11.11.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.11.2013

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES;
UNIVERSIDAD DE GRANADA y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA CHAVES, María Angel;
AGUILERA GÓMEZ, Margarita;
CALLEJA HERNÁNDEZ, Miguel Ángel;
MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
ESTEBAN RODRÍGUEZ, Mariano;
CARRASCO PARDO, Esther;
JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Gema y
ARÁNEGA JIMÉNEZ, Antonia**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **Método de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU)**

57 Resumen:

Método in vitro de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU). La invención describe un Método in vitro de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) sólo o en combinación con otros principios activos como el IFN alpha de pacientes con cáncer de colon y mama.

ES 2 393 984 B1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU).

5

La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere a un método *in vitro* de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU), en particular en pacientes con cáncer de colon y mama, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y cuantitativo) específico, estableciendo distintos grupos de pacientes.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15

La proteína celular inducida por Interferón PKR, es una quinasa que tiene un papel fundamental en la actividad antitumoral y antiviral que desempeña el Interferón tipo I.

20

El activador de PKR mejor caracterizado es el ARN de doble cadena que se produce durante la infección de diversos virus, pero también se activa por distintos tipos de estrés celular como polioles como la heparina, y otros compuestos como el etanol, el arsénico, ceramida, ect.., Su mecanismo de acción fundamental es producir la parada en la síntesis de proteínas de la célula y activar el factor de transcripción NFkB que permite que la célula siga viviendo si el problema que causó su activación se resuelve. Si el estrés celular continua, PKR finalmente provoca la muerte de la célula de forma controlada por apoptosis. PKR, por tanto, puede actuar como supresor de tumores y recientemente se ha demostrado que es fundamental para la actividad supresora de tumores de la conocida proteína p53. Uno de los mecanismos principales a través del cual, el 5-FU ejerce su actividad antitumoral es a través de inducción de apoptosis. La proteína implicada en este fenómeno es el supresor de tumores p53. Pero se sabe que más del 50% de los tumores tiene

25

30

mutaciones en p53, y que células tumorales con p53 inactivo pueden morir por apoptosis en respuesta al quimioterapéutico 5-FU. Por tanto se desconoce cómo 5FU induce la muerte de las células tumorales en ausencia de p53. Nosotros hemos descubierto que es precisamente a través de la activación de la proteína PKR como se lleva a cabo este proceso. PKR se activa en respuesta a 5-FU aun en ausencia de p53, induciendo la parada en la síntesis de proteínas celulares y finalmente induciendo muerte celular por apoptosis.

Por tanto, p53 junto con PKR son marcadores celulares claves en el efecto de muerte de células tumorales por apoptosis que provoca la terapia basada en el uso del 5-FU.

Son varios los compuestos que han sido combinados con 5-FU para aumentar su eficacia, como el oxaliplatino y el irinotecan. Además numerosos ensayos clínicos están demostrando que el uso combinado de drogas con citoquinas naturales, están aumentando la eficacia antitumoral de los quimioterapéuticos usados en clínica. Concretamente, el IFN alpha ha demostrado mejorar la eficacia del 5-FU tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos clínicos con pacientes. Aunque el mecanismo de este aumento de eficacia aun no se conoce del todo, y por tanto no se sabe por qué hay pacientes que no responden a esta combinación, nosotros proponemos, que el aumento que el IFNalpha ejerce sobre PKR puede ser uno de los fenómenos implicados en dicha efectividad.

Por tanto, conocer si PKR y p53 están mutados en los tumores, puede ser de gran utilidad para el pronóstico de respuesta a terapias basadas en el uso de 5-FU y su combinación con otras drogas o citoquinas como el IFN.

Se conoce que hay un porcentaje muy considerable de pacientes que no responden a la quimioterapia basada en el uso del 5-FU. Dado el papel que desempeña p53 en la muerte inducida por 5-FU, numerosos trabajos han intentado demostrar que la ausencia de respuesta se debe a mutaciones en

dicho supresor de tumores. Desgraciadamente, la mayoría de los trabajos no han conseguido demostrar esa relación, concluyendo que deben de existir más marcadores celulares implicados en la respuesta a la quimioterapia. Las terapias alternativas comentadas anteriormente, como la combinación de IFNalpha y 5-FU, han sido útiles en algunos carcinomas, Sin embargo, dichas terapias tienen efectos secundarios agresivos como la aparición de fiebre, escalofríos, dolores y molestias generalizadas, dolor de cabeza (cefalea), poco apetito, disminución temporal de los niveles de glóbulos blancos y rojos y de plaquetas, lo que aumenta el riesgo de padecer una infección, anemia y/o hemorragias, etc.

Es necesario, por tanto, encontrar un método de de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo y sus combinaciones, que minimice la iatrogenia del empleo de terapias combinadas de fármacos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han identificado a PKR como un nuevo marcador de evaluación de respuesta al tratamiento del cáncer con 5-FU. Los resultados de los estudios en líneas celulares y muestras de pacientes con cáncer, muestran mutaciones en la secuencia genética de la proteína PKR, y alteraciones en la actividad de esta proteína, lo que puede ser utilizado como marcador de la respuesta a 5-FU.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína PKR (o del gen *pkc* que la codifica) para la obtención de datos útiles de la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos. El tratamiento con 5-FU puede ser sólo, o en combinación con otros fármacos, preferentemente con IFN alpha.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos

útiles de la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, de ahora en adelante método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- 5 b) determinar la actividad de la proteína PKR, en la muestra biológica aislada de (a), o la secuencia de la proteína PKR o del gen *pkr* que la codifica.

El tratamiento con 5-FU puede ser sólo, o en combinación con otros fármacos, preferentemente con IFN alpha. En una realización preferida de la invención, la actividad de la proteína PKR se determina mediante la detección de la cantidad de expresión del gen *pkr*.

En otra realización preferida, la actividad de la proteína PKR se determina mediante la secuencia del gen de PKR. En otra realización preferida, se detectan las mutaciones de la secuencia que codifica para PKR. Mutaciones en dicha secuencia pueden ser indicativas de una distinta actividad.

En otra realización preferida, la actividad de la proteína PKR se determina mediante la detección de la cantidad de proteína PKR, y más preferiblemente, mediante la cantidad de proteína PKR fosforilada.

Más preferiblemente, la muestra biológica del individuo del paso (a) son células tumorales.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, o con una secuencia de referencia.

Si la cantidad o actividad de la proteína PKR, o la expresión del gen *pkr* no es la suficiente, o el gen presenta determinados polimorfismos, entonces se puede determinar que el paciente no es respondedor al tratamiento con 5-FU.

Los pasos (b) y/o (c) del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la determinación de la actividad de PKR o la detección de los niveles de expresión de *pkr*, o de la identificación de varios polimorfismos en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

La determinación de la actividad de la proteína PKR, mediante por ejemplo, la detección de la cantidad de expresión del gen *pkr*, o de determinados polimorfismos en la secuencia del gen, permite discriminar entre individuos respondedores e individuos no respondedores, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p , test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente los individuos respondedores de forma diferencial en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada son células, y más preferiblemente células tumorales.

El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física. En una realización particular de la invención el individuo ha sido previamente diagnosticado de cáncer. Más preferiblemente, el individuo ha sido diagnosticado de cáncer de colon y/o cáncer de mama.

La proteína PKR, o “*RNA-dependent protein kinase*”, también denominada como “eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2” (EIF2AK2). También se denomina EIF2AK1, MGC126524, PKR, PRKR, OTTHUMP00000201320; P1/eIF-2A protein kinase; double stranded RNA activated protein kinase; eIF-2A protein kinase 2; interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase; interferon-inducible RNA-dependent protein kinase; interferon-inducible eIF2alpha kinase; p68 kinase; protein kinase RNA-activated; protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent. Está codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 2 (2p22-p21). Su secuencia aminoacídica se encuentra en la SEQ ID NO: 1, (de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 2 con número de acceso en el GenBank (NCBI) NM_002759.2). También se refiere a cualquiera de sus variantes (actualmente se conocen 3 variantes).

En el contexto de la presente invención, PKR se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína PKR.

La medida de la actividad de la proteína PKR puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Además, la presencia de polimorfismos o mutaciones se puede determinar por secuenciación del ADN.

Así, la cantidad o la concentración, del producto de expresión del gen *pkc* preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión del gen, basada en una señal que se obtiene directamente del transcrito de dicho gen, o de la proteína (PKR), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por el gen. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de expresión del gen, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con mismo o que pueda derivarse de éste. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dicho producto de expresión obtenido mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas

de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de expresión del gen *pkr* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de producto de expresión de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de producto de expresión del gen *pkr* que permite discriminar los individuos respondedores al tratamiento con 5-FU de los no respondedores. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Particularmente, la cantidad de referencia. Las secuencias de referencia son la SEQ ID NO: 1 para la proteína, y la SEQ ID NO; 2 para la secuencia nucleotídica.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína PKR. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, fosforilación glicosilación, sumoilación, metilación o acilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína PKR cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando

su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más
5 preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a la proteína PKR pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

10 La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

15

En esta memoria se entiende por 5-fluorouracilo (5-FU), ó 5-Fluoropirimidina-2,4-diona, un compuesto con número CAS 51-21-8, de fórmula (I)



20 Fórmula (I),

o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos.

Tal como aquí se utiliza, el término "derivado" incluye tanto a compuestos
25 farmacéuticamente aceptables, entre ellos, derivados del compuesto de fórmula (I), que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables, ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables.

Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos del compuesto de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado del compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el efecto del compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de la proteína PKR se realiza mediante un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la
5 detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a la proteína PKR. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse a la proteína directamente, o a través
10 de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

15

Se entiende por “perfil de expresión génica” el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por el gen *pkp*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el
20 nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción del gen *pkp*, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la
25 polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión
30 génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ utilizando sondas específicas marcadas con

cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción del gen *pkc*, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección cuantitativa de la expresión del gen *pkc* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas. Así, en otra realización preferida, la expresión del gen *pkc* se detecta mediante RTqPCR empleando los cebadores SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 10, indicados en la Tabla 2.

GEN	PRIMERS		TAMAÑO AMPLIFICADO
PKR Carboxi-terminal	F	SEQ ID NO: 3	712 bp
	R	SEQ ID NO: 4	
PKR Dominio regulador	F	SEQ ID NO: 5	194 bp
	R	SEQ ID NO: 6	
PKR Dominio kinasa	F	SEQ ID NO: 7	134 bp
	R	SEQ ID NO: 8	
PKR Dominio catalítico	F	SEQ ID NO: 9	179 bp
	R	SEQ ID NO: 10	

20 Tabla 2. Cebadores.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para analizar la actividad de PKR, o secuenciar el gen *pkc*.

5

Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad (de expresión del gen *pkc* y/o de cantidad de proteína PKR) detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia, o la secuencia del gen o de la proteína PKR, con las secuencias de referencia (SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2).

10

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los medios necesarios para obtener la secuencia que codifica la proteína PKR, y preferentemente cualquiera de los cebadores recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10 para llevar a cabo el método de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones.

15

Dicho kit puede comprender todos aquellos reactivos necesarios para analizar la actividad de la PKR por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. También puede comprender cualquier medio para obtener la secuencia que codifica la proteína PKR. Así, puede incluir sin limitación, cualquiera de los cebadores recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, comprende la pareja de cebadores que se selecciona de la lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5 y EQ ID NO: 6, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7 y EQ ID NO: 8 y la pareja de cebadores SEQ ID NO: 9 y EQ ID NO: 10, o cualquiera de sus combinaciones.

20

25

Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 3. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 4. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 5. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias

30

SEQ ID NO: 6. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 7. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 8. Otro aspecto de la invención se refiere al cebador de secuencias SEQ ID NO: 9. Otro aspecto de la invención se refiere al
5 al cebador de secuencias SEQ ID NO: 10.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios
10 para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la
15 invención para la obtención de datos útiles en la evaluación de la respuesta al tratamiento con 5-FU, y preferentemente en individuos diagnosticados de cáncer. Preferiblemente, el kit de la invención comprende cualquiera de los cebadores recogidos en las secuencias SEQ D NO: 3 a SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, comprende la pareja de cebadores que se selecciona de la
20 lista que comprende: SEQ ID NO: 3 y EQ ID NO: 4, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 5 y EQ ID NO: 6, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7 y EQ ID NO: 8 y la pareja de cebadores SEQ ID NO: 9 y EQ ID NO: 10, o cualquiera de sus combinaciones.

25 Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

30 Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o

no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig 1. Activación de PKR durante el tratamiento con 5-FU.

(A) Celulas SW480, T84, MCF-7 y T47D fueron tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 4, 8, 16 y 24 horas. (B) PKR^{+/+} y PKR^{-/-} MEFs y (C) células de cáncer de colon HCT-116 que expresan shRNA frente a PKR (shRNA-PKR) o *expressing* el control shRNA (shRNAc) fueron tratadas con 500 UI/ml of IFN α durante 16 horas o tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 4, 8, 16 y 24 horas. Las proteínas se extrajeron y se analizaron usando los siguientes anticuerpos: anti-phospho PKR, anti- whole PKR, anti-phospho eIF2 α , anti-whole eIF2 α and anti- β -actin.

20

Fig. 2. Implicación de PKR en el arresto del ciclo celular y en la apoptosis inducida por 5-FU.

(A) PKR^{+/+} y PKR^{-/-} MEFs fueron tratadas con 5 μ M de 5-FU durante 48 horas. El ciclo celular fue analizado por citometría de flujo después de teñir las células con PI. (B) PKR^{+/+} y PKR^{-/-} MEFs fueron tratadas con 5 μ M, 10 μ M y 100 μ M se 5-FU o con 100 μ g/ml de Irinotecan durante 48 horas. Posteriormente las células se analizaron con *Annexina V detection kit*. (C) Celulas tumorales de mama MCF-7 que expresan shRNA frente a PKR (shRNA-PKR) o el sistema control shRNA (shRNAc) y (D) células tumorales de colon y mama SW-480, T84, MCF-7y T47D, fueron tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 48 horas. Posteriormente las células se analizaron con *Annexina V detection kit*.

30

Fig. 3. Regulación de PKR por 5-FU en células HCT-116 p53^{+/+} y HCT-116 p53^{-/-} cells. (A) Células HCT-116 p53^{+/+}, y HCT-116 p53^{-/-} fueron tratadas con 500UI/ml de IFN α durante 16 horas y tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 4, 8, 16 y 24 horas. Las proteínas se extrajeron y se analizaron usando los siguientes anticuerpos: whole p53, PKR, anti phospho PKR, anti whole PKR, anti phospho eIF2 α , anti whole eIF2 α and anti b-actin. (B) Células HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-} fueron tratadas con 10 μ M, de 5-FU o 500UI/ml de IFN α durante 16 horas. la expresión del mRNA de PKR se analizó por real-time RT-PCR (means \pm SEM, n=3). (C) Células HCT-116 p53^{+/+}, HCT-116 p53^{-/-} que expresan shRNA frente a PKR o el sistema control shRNA fueron tratadas con 10 μ M de 5-FU durante 48 horas. Posteriormente las células se analizaron con Annexina V detection kit.

Fig. 4. Efecto citotóxico del 5-FU y la terapia combinada 5-FU/IFN α (A) MEFs PKR^{-/-} y PKR^{+/+}, (B) líneas celulares humanas de cáncer de colon T84 y SW-480, y (C) líneas celulares humanas de cancer de mama, T47D y MCF-7 se trataron con cantidades crecientes de 5-FU solo (triángulos) o en combinación con 50 UI/ml de IFN α (cuadrados) durante 6 días. La curva de supervivencia celular se representa como porcentaje referido a las células sin tratar.

Fig. 5. Apoptosis inducida en MEFs y líneas celulares humanas de cancer de colon y mama durante el tratamiento combinado de 5-FU/IFN α . (A) 5 \times 10⁵ células humanas de cancer de colon y mama, (B) 5 \times 10⁵ de células MEFs PKR^{+/+} o PKR^{-/-} y (C) 5 \times 10⁵ células humanas de cáncer de colon HCT-116 p53^{+/+} o HCT-116 p53^{-/-} que expresan shRNA frente a PKR o el control shRNA, fueron tratadas con 500 UI/ml de IFN α , tratadas con 5 μ M de 5-FU o tratadas con la combinación de IFN α más 5-FU durante 48 horas. Posteriormente las células se analizaron con Annexina V detection kit.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la invención.

5 PKR juega un papel importante en la inhibición de la traducción, el arresto del ciclo celular y la apoptosis inducida por 5-FU.

La activación de la proteína PKR durante el tratamiento con 5-FU se demostró en varias líneas celulares tumorales de cáncer de mama y colon a través de la
10 detección de la proteína PKR fosforilada y de la fosforilación de su sustrato principal eIF2 α (Fig1A). Con el fin de analizar el impacto de la activación de PKR por el tratamiento con 5-FU, se analizaron células MEFs derivadas de ratones del tipo silvestre (PKR^{+/+}) y del knockout (PKR^{-/-}) para varias funciones biológicas. Como se muestra en la Fig. 1B, en las células PKR^{+/+} tratadas con
15 5-FU eIF2 α fue fosforilado, mientras que en las células PKR^{-/-} tratadas no se detectó fosforilación. De manera similar, en las células HCT-116 de cáncer de colon humano, el tratamiento con 5-FU no incrementó la fosforilación de eIF2 α cuando PKR fue interferido con shRNA específico. Las células que expresaron un shRNA control no relacionado, mostraron también un incremento de la
20 fosforilación de eIF2 α tras 16 y 24 horas post-tratamiento (Fig 1C). Estos resultados sugieren que 5-FU podría inducir la inhibición de la síntesis de proteínas a través de la fosforilación de eIF2 α , y este efecto es mediado por PKR. Puesto que la fosforilación de eIF2 α se correlaciona con el arresto del ciclo celular, se caracterizó el efecto de 5-FU en el ciclo celular de las células
25 MEFs PKR^{+/+} y PKR^{-/-} a las 48 horas post-tratamiento. Como se muestra en la Fig. 2A, en las células MEFs de tipo silvestre, el 5-FU produjo la acumulación tanto de la fase S como de la fase G2/M (18,2% y 24,8% respectivamente) tal y como está descrito que ocurre. Sin embargo, el tratamiento con 5-FU de las células MEFs PKR^{-/-} no produjo la acumulación ni en la fase S ni en la fase
30 G2/M (3,9% y 10,6% respectivamente. Estos resultados se correlacionan bien con el descenso significativo de la apoptosis en las células carentes de PKR o con PKR interferida (Fig. 2B,C y D) tal y como se explica a continuación.

Con el fin de analizar la implicación de la activación de PKR en la apoptosis inducida por 5-FU, las células MEFs PKR^{+/+} y PKR^{-/-} fueron tratadas con cantidades crecientes de 5-FU. Como se muestra en la Fig 2B, en las células
 5 PKR^{+/+}, 10 μ M de 5-FU fueron capaces de inducir considerablemente los niveles de apoptosis que fueron ligeramente aumentados con la elevada dosis de 100 μ M de 5-FU. Sin embargo no se produjo apoptosis en las células PKR^{-/-} tratadas. El tratamiento con Irinotecam fue usado como control positivo de la inducción de apoptosis en ambas líneas celulares. Las líneas celulares de
 10 cáncer de colon HCT-116 y de mama MCF-7 que expresaron shRNA para PKR también mostraron niveles reducidos de apoptosis tras el tratamiento de 5-FU en comparación con las células que expresaron el shRNA control (Fig. 2C y D).

Hemos identificados dos líneas celulares, una de mama y otra de colon (T47D
 15 y T84) que curiosamente no expresan niveles detectables de proteína PKR (Fig 1A). Este hallazgo es de gran importancia, ya que aunque son líneas establecidas en el laboratorio, inicialmente provienen directamente de biopsias de pacientes. Por tanto estos datos sugieren la importancia y la necesidad de analizar el estado de PKR en los pacientes de cáncer de colon y mama que
 20 vayan a recibir quimioterapia basada en el uso del 5-FU.

En global, los resultados mostrados en la Fig. 2 demuestran que PKR es una diana molecular del 5-FU.

25 **La activación de PKR por 5-FU ocurre de forma independiente de p53**

Se ha descrito previamente que la inducción de la apoptosis en respuesta a 5-FU fue mediada por p53. Por otra parte, se ha sugerido recientemente que una de las funciones de p53 es modular PKR. Con el fin de determinar si la
 30 activación de PKR y la inducción de apoptosis en respuesta a 5-FU dependen de p53, se analizaron las líneas celulares HCT116 p53^{+/+} y HCT116 p53^{-/-}. Como se muestra en la Figura 3A, PKR y eIF2 α fueron fosforiladas durante el

tratamiento con 5-FU en ambas líneas. Además, el nivel total de PKR también se aumentó en ausencia de la proteína p53. Con el fin de determinar si la regulación de PKR es a nivel transcripcional, se midió el mRNA de PKR por PCR en tiempo real en células HCT116 p53^{+/+} y p53^{-/-}. (Figura 3B). Como se ha demostrado previamente, p53 está involucrada en la apoptosis inducida por 5-FU como se observa en células HCT116 p53^{+/+} y en p53^{-/-}. Sin embargo, al disminuir los niveles de PKR por interferencia se produjo una reducción significativa en la apoptosis inducida por 5-FU en las dos líneas celulares (Figura 3C). Estos resultados sugieren la importancia de la activación de PKR en la inducción de apoptosis por 5-FU, incluso en ausencia de p53.

PKR está involucrado en el efecto citotóxico del 5-FU así como en la eficacia de la terapia combinada 5-FU/IFN α

Teniendo en cuenta el papel de PKR en la respuesta celular a 5-FU, nos planteamos la hipótesis de que el aumento del nivel de PKR producido por el IFN podría ser uno de los mecanismos por los que esta citoquina mejorara la actividad antitumoral del fármaco quimioterapéutico 5-FU. Para probar esta hipótesis, la supervivencia celular se determinó en células PKR^{+/+} y PKR^{-/-} MEFs tratados con cantidades crecientes de 5-FU, ya sea solos o en combinación con 50 UI / ml de IFN α . Nuestros resultados mostraron que el efecto citotóxico del 5-FU fue mayor en PKR^{+/+} MEFs en comparación con PKR^{-/-} MEFs (Figura 4). La concentración de 5-FU necesaria para producir 50% de muerte celular (los valores IC50) se muestran en la Tabla I. Por otra parte, el IFN solo mejoró el efecto citotóxico del 5-FU en las células PKR^{+/+} MEFs. Experimentos similares se llevaron a cabo en líneas celulares humanas de cáncer de colon y mama (Figura 4 B y C). El efecto citotóxico de 5-FU fue mayor en las líneas celulares que expresan la proteína PKR en comparación con las células en las que PKR no fue detectado. De hecho, el valor de IC50 de 5-FU fue de aproximadamente 2 veces mayor en células T84 que en las células SW-480. Por otra parte, el valor de IC50 de 5-FU en las células T47D fue cerca de 4 veces más alto que en las células MCF-7 (Tabla I). Además, células que

carecen de PKR como T84 y T47D, no se vieron afectadas por la adición de IFN α al tratamiento con 5-FU. Por el contrario, el IFN α aumentó el efecto citotóxico del 5-FU reduciendo la IC₅₀ del 5-FU en células SW-480 y MCF-7 (Figura 4 B y C, Tabla I).

5

Para confirmar que la activación de PKR está involucrada en el efecto sinérgico sobre la apoptosis ejercida por el tratamiento combinado, se analizó la apoptosis inducida por la combinación 5-FU/IFN. Dicha combinación indujo un considerable nivel de apoptosis en líneas celulares de colon y de mama que expresan la proteína PKR. En contraste, las células que carecen de PKR (T84 y T47D) no se vieron afectadas (Figura 5). Cuando se analizaron las líneas PKR ^{+/+} y PKR^{-/-} MEFs, y células p53 HCT116 ^{+/+} y HCT116 p53 ^{-/-} interferidas se vio como la apoptosis inducida por la combinación de 5-FU /IFN α se redujo significativamente en PKR^{-/-} MEFs en comparación con PKR ^{+/+} MEFs. La interferencia de PKR en células p53 HCT116 ^{+/+} y HCT116 p53 ^{-/-} también provocó una reducción significativa en los niveles de apoptosis en comparación con las células que expresan el ARNhc control (Figura 5C). Estos resultados demuestran el papel principal de PKR en el efecto citotóxico del 5-FU. Además este efecto se ve aumentado por el IFN, en parte, a través del aumento del nivel de PKR que esta citoquina produce.

10
15
20

Tabla 1. Valores de IC₅₀ del 5-FU derivados de las curvas representadas en la Fig 4.

Líneas celulares	IC ₅₀ (mM)	
	5-FU	5-FU+IFNa
MEFs PKR ^{+/+}	0,88 ± 0,06	0,61 ± 0,02
MEFs PKR ^{-/-}	1,74 ± 0,05	1,74 ± 0,22
SW-480	3,70 ± 0,09	1,90 ± 0,20
T84	7,48 ± 0,60	7,80 ± 0,10
MCF-7	0,71 ± 0,04	0,52 ± 0,08
T47D	2,80 ± 0,10	2,78 ± 0,23

En resumen, los resultados demuestran que PKR es una diana molecular del 5-FU, que juega un papel importante en su efecto citotóxico al menos, en parte, a través de la inhibición de la traducción y a través de la inducción de muerte por apoptosis de las células tumorales de una forma independiente de p53. Estos resultados indican la importancia clínica que el estado de PKR puede desempeñar en respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU. Por otra parte, la eficacia del efecto citotóxico del 5-FU inducida por el IFN, especialmente en tumores que expresan una forma mutada o que carecen de p53 (más del 50% de los tumores), pero con PKR funcional, podría tener una relevante aplicación clínica en pacientes.

Materiales y métodos

15

Cultivo celular y reactivos

Fibroblastos embrionarios de raton PKR^{+/+} and PKR^{-/-} , y células humanas de colon HCT116 p53^{+/+} and p53^{-/-} fueron suministradas por M Esteban (Centro nacional de Biotecnología, España) y B. Vogelstein (Johns Hopkins

20

Oncology Center, USA), respectivamente. Las líneas celulares humanas procedentes de cáncer de colon SW-480, T84, RKO, y las líneas celulares humanas procedentes de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231, T47D fueron obtenidas de la colección American Type Culture Collection (ATCC). Células
5 interferidas para PKR (shRNA-PKR) fueron preparadas como se indica a continuación. La mayoría de las células fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1% penicilina –estreptomina, y penicilinas, y 1% de solución de amino ácidos no esenciales. La línea celular MDA-MB-231 fue cultivada en medio DMEM/F12-. Todas la células fueron usadas en los
10 experimentos en crecimiento exponencial. 5-Fluorouracilo (Sigma-Aldrich, F6627-1G) se disolvió en DMSO y se guardó a -20 °C. IFN α 2b (Intron A) fue suministrado por Schering-Plough.

Ensayo de viabilidad celular

15

El efecto del 5-FU sobre la viabilidad celular fue evaluado con un ensayo colorimétrico basado en el uso de la sulforhodamina-B (SRB). 3×10^3 células por pocillo fueron tratadas con diferentes concentraciones de 5-FU en presencia o ausencia de IFN α (50 IU/ml durante seis días habiendo sustituido
20 el medio con los reactivos a los tres días. Finalmente las células se procesaron como se describe en Villalobos *et al.* usando el luminómetro Titertek Multiscan (Flow, Irvine, CA,6 USA) a 492 nm. El valor IC₅₀ fue calculado interpolando en la curva semilogaritmica generada a partir de la dosis-respuesta considerando las células sin tratar como el 100% de viabilidad. Todos los experimentos se
25 llevaron a cabo por triplicado y se repitieron al menos dos veces.

Análisis de apoptosis

Las células fueron incubadas durante 48 horas con 5-FU solo o en combinación con IFN (500IU/ml). El IFN α se añadió 16 horas antes del 5-FU. Después de 72 horas, las células se analizaron usando los kits TACSTM Annexin V-FITC (R&D System, TA4638), y Annexin V-APC (ebioscience, 88-8007-74) para las células interferidas. Las muestras se procesaron usando el citómetro FACScan (Becton Dickson, San José, CA, USA) del servicio de instrumentación de la Universidad de Granada.

10 **Análisis del ciclo celular**

Células en crecimiento exponencial tratadas durante 24 y 48 horas con 10 μ M de 5-FU fueron fijadas con 70% (vol/vol) de etanol frío durante 12 horas. Finalmente se resuspendieron en 250 μ l de una suspensión de Ioduro de Propidio (PI) (100 μ l/ml RNAsa, 40 μ l/ml PI in PBS) durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad. Las muestras se procesaron inmediatamente después usando el citómetro FACScan (Becton Dickson, San Jose, CA, USA) del servicio de instrumentación de la Universidad de Granada.

20 **Inmuno-ensayo (Western Blot)**

Las células tratadas durante los tiempos establecidos se lisan en tampón Laemmli y tras someterse a electroforesis SDS-PGE, son transferidas a membranas de nitrocelulosa (Biorad,162-0115), bloqueadas con PBS -5% leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios usados son: anti-PKR total suministrado por M Esteban (centro nacional de Biotecnología, España), anti-phospho- PKR (Thr 451) (Calbiochem, 527460), anti- phosphoIF2 α (Ser 51) (Invitrogen, 44-728,G), anti- phospho-p53 (Ser15) (Cell signaling, 92845), anti- β actin (Sigma, A2228). Los anticuerpos secundarios son: anti-rabbit IgG peroxidasa conjugado (Sigma, A0545) y anti-

mouse IgG peroxidasa conjugado (Sigma, A9044). Las bandas se visualizaron usando el reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

5 **Interferencia de PKR en líneas celulares de colon y mama a través del uso de shRNA**

Para interferir PKR, usamos vectores pGIPZ-lentivirales shRNAmir que contienen secuencias no silenciadoras (NS) o tres secuencias “hairpin” específicas frente a PKR (Open Biosystems, RHS4430). Los vectores pGIPZ
10 expresan GFP que permite identificar las células transfectadas y gen de resistencia a la puromicina que permite crear líneas estables. Las líneas celulares MCF-7, y HCT116 p53+/+ y p53-/- fueron transfectadas con dichos vectores usando el Amaxa Cell line nucleofector kit V (Lonza Cologne AG, VCA-1003) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para generar líneas
15 estables interferidas, las células se seleccionaron con puromicina (Invivogen, 58-58-2) a los dos días post-transfección a concentración de 1µg/ml para HCT116 y 3 µg/ml para las células MCF-7.

20 **Extracción de ARN y análisis de qRT-PCR a tiempo real.**

El ARN fue aislado directamente de las líneas celulares usando el RNeasy mini kit (Qiagen74106). La cadena de ADN complementario se generó usando el *reverse transcription system* (Promega A3500), siguiendo el protocolo de la casa comercial. La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en placas de
25 96 pocillos usando TaqMan Gene Expresión Assays (Applied Biosystems) y Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System que cuantifica los amplicones. Las sondas taqman usadas fueron: PKR (Hs00169345_ml) y GAPDH (Hs 99999905_ml) y la reacción se llevó a cabo según protocolo específico de Applied Biosystems.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1- El uso de la proteína PKR o del gen *pk*r que la codifica, para la obtención de datos útiles de la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos.
- 10 2- El uso de la proteína PKR o del gen *pk*r que la codifica, donde el tratamiento con 5-FU es un tratamiento combinado con IFN alpha.
- 3- Un método de obtención de datos útiles para determinar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo, o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados o análogos, que comprende:
- 15 a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 b) determinar la actividad de la proteína PKR, en la muestra biológica aislada de (a), o la secuencia de la proteína PKR o del gen *pk*r que la codifica.
- 20 4- El método según la reivindicación 3, donde la muestra biológica del individuo del paso (a) son células tumorales.
- 5- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la actividad de la proteína PKR se determina mediante la detección de la cantidad de expresión del gen *pk*r.
- 25
- 6- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la actividad de la proteína PKR se determina mediante la detección de la cantidad de proteína PKR.
- 30
- 7- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde la detección de la cantidad de expresión del gen *pk*r se realiza mediante PCR.

- 8- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la detección de mutaciones y polimorfismos de la proteína PKR se determina mediante secuenciación de ADN.
- 5
- 9- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6, donde la detección de la actividad de PKR se determina mediante un inmunoensayo.
- 10
- 10-El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, que además comprende:
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia o con una secuencia de referencia.
- 15
- 11- Un kit o dispositivo que comprende cualquiera de los cebadores recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10 para analizar la actividad de PKR, o secuenciar el gen *pkr*.
- 20
- 12- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende cualquiera de los cebadores recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10 para analizar la cantidad de productos de expresión del gen *pkr*.
- 25
- 13- Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 3.
- 14-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 4.
- 15-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 5.
- 30
- 16-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 6.
- 17-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 7.

18-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 8.

19-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 9.

5 20-Cebador de secuencia nucleotídica SEQ ID NO: 10.

21- El uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, para la obtención de datos útiles de la respuesta al tratamiento con 5-Fluorouracilo.

A

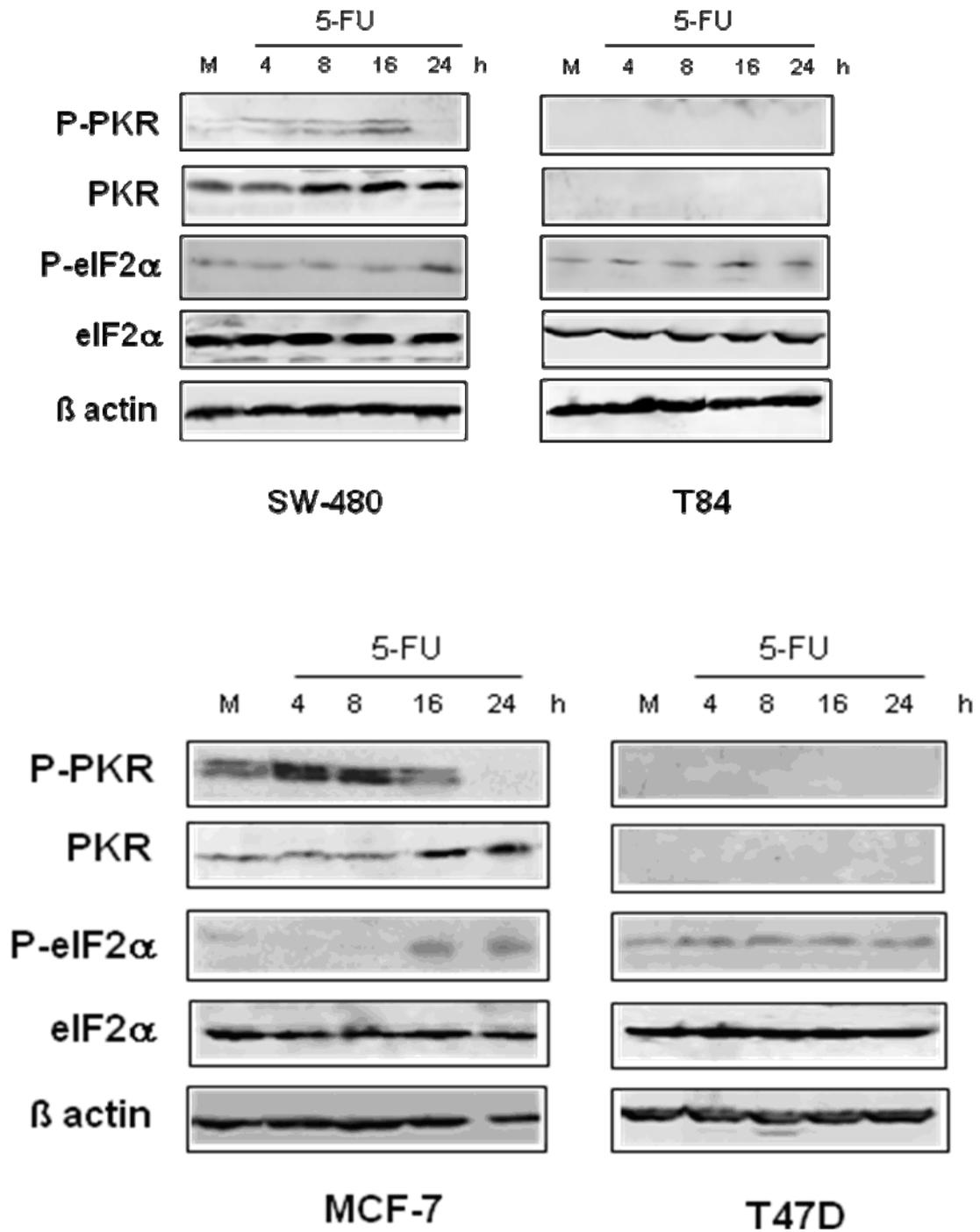
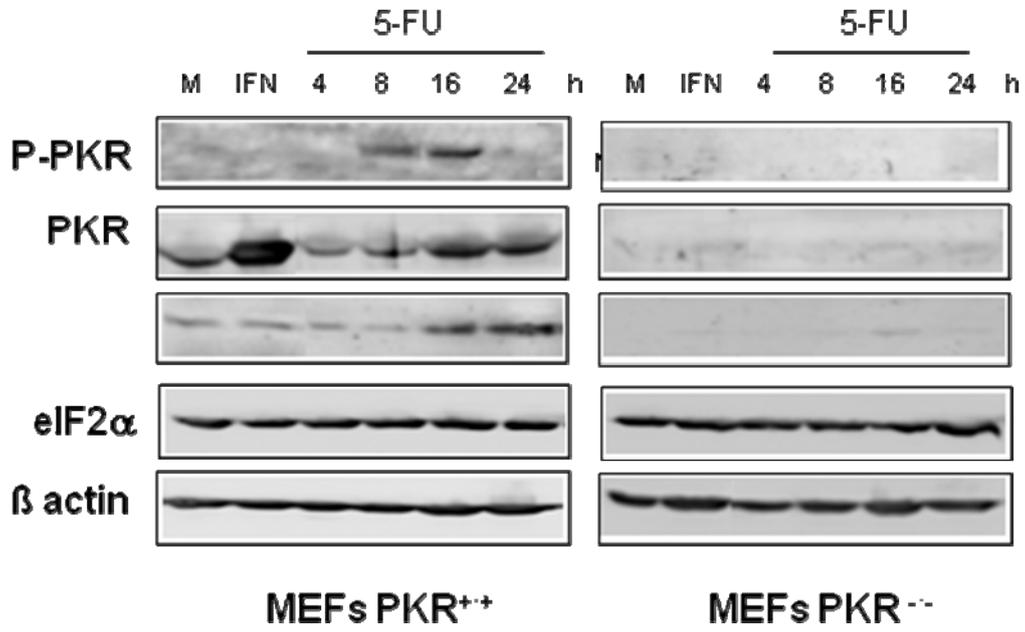


Fig. 1

B



C

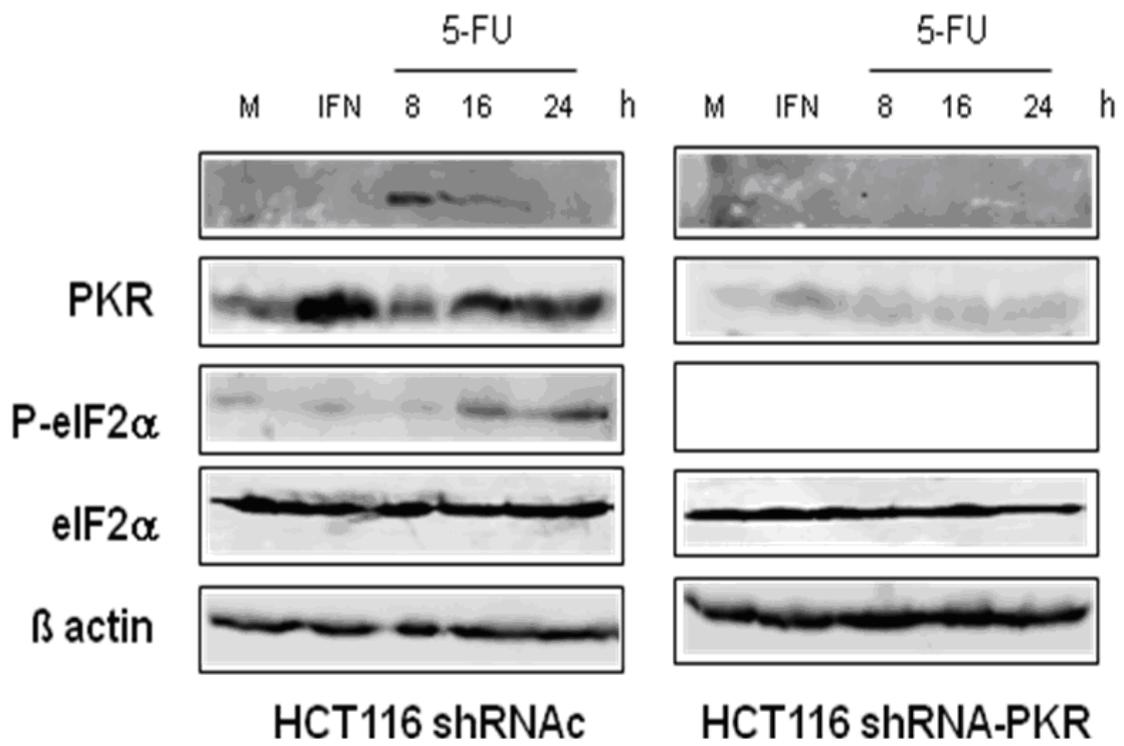


Fig. 1

A

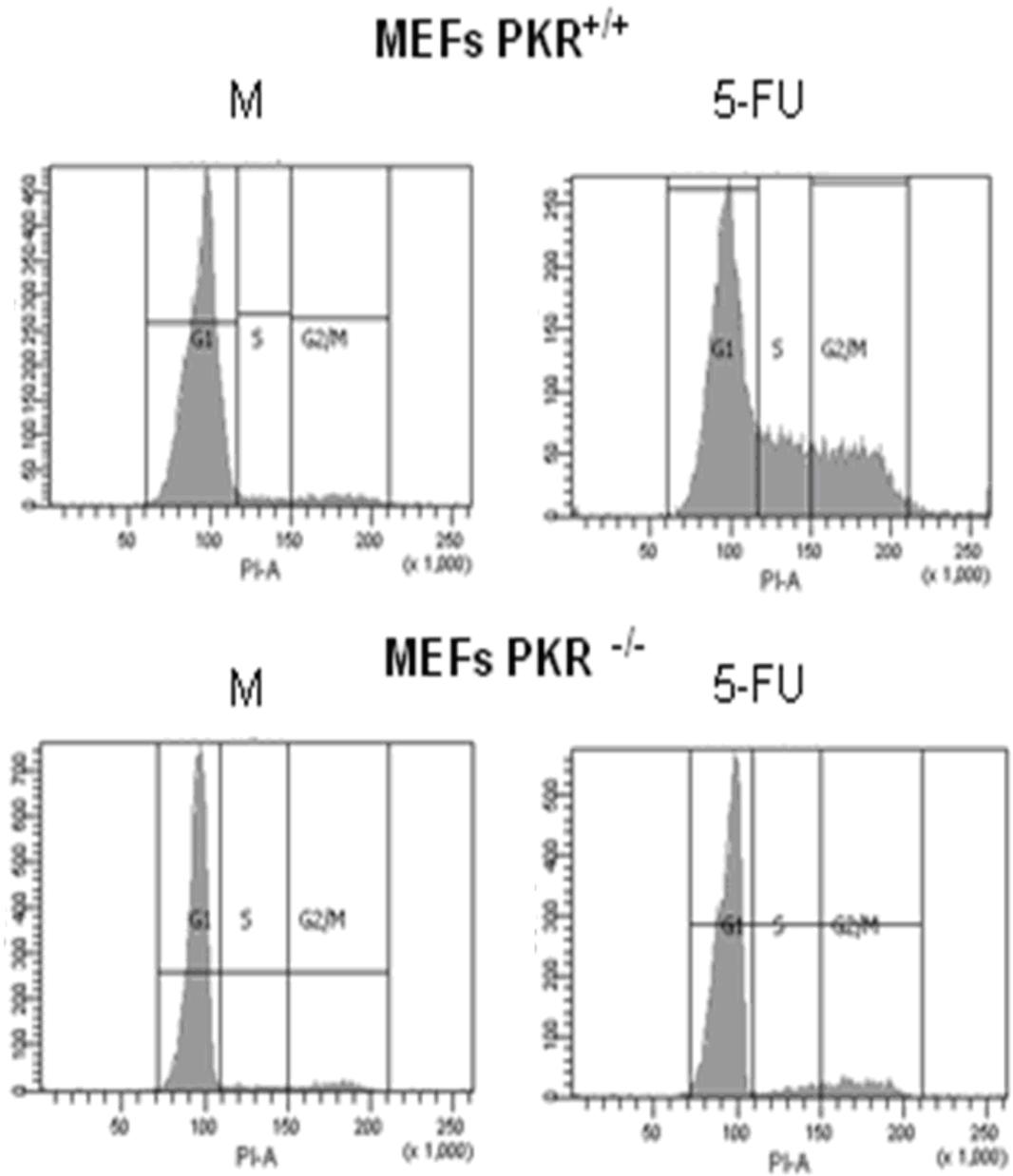


Fig. 2

B

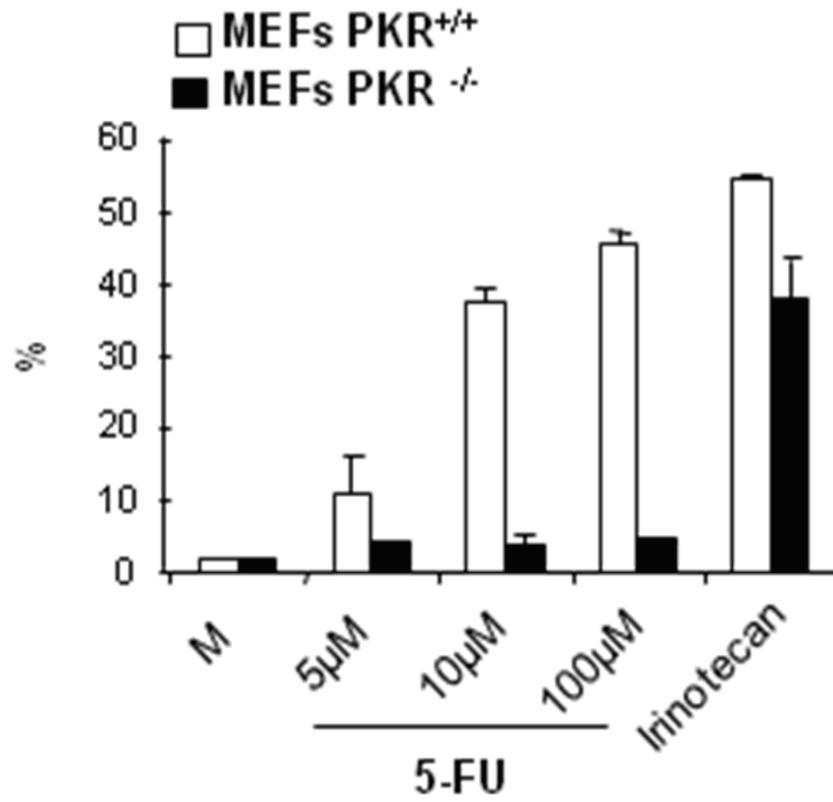


Fig. 2

C

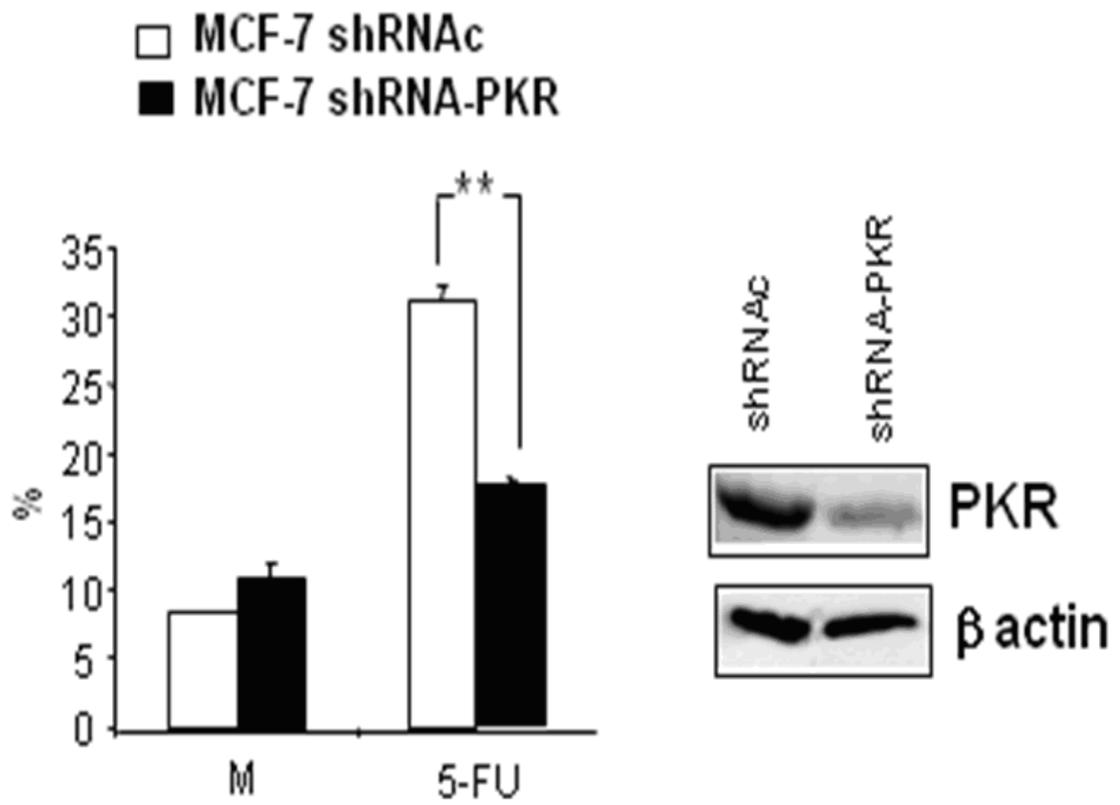


Fig. 2

D

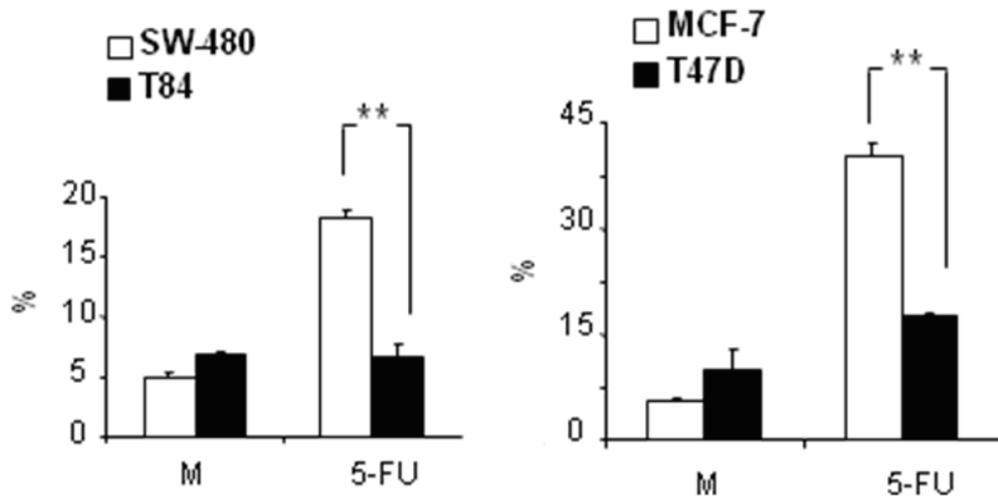
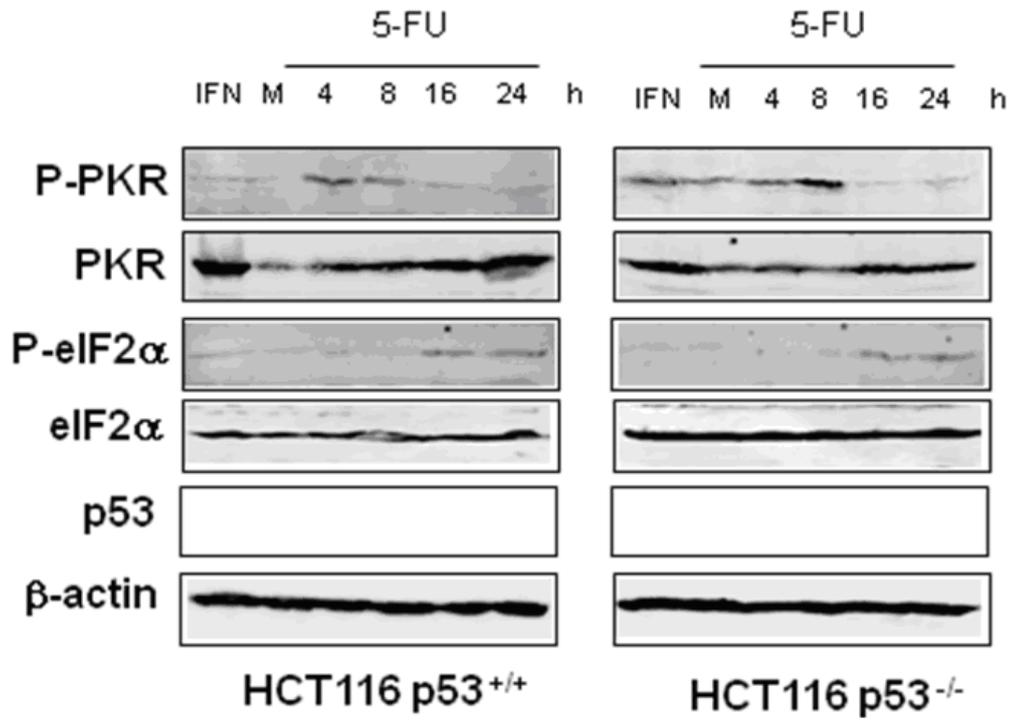


Fig. 2

A



B

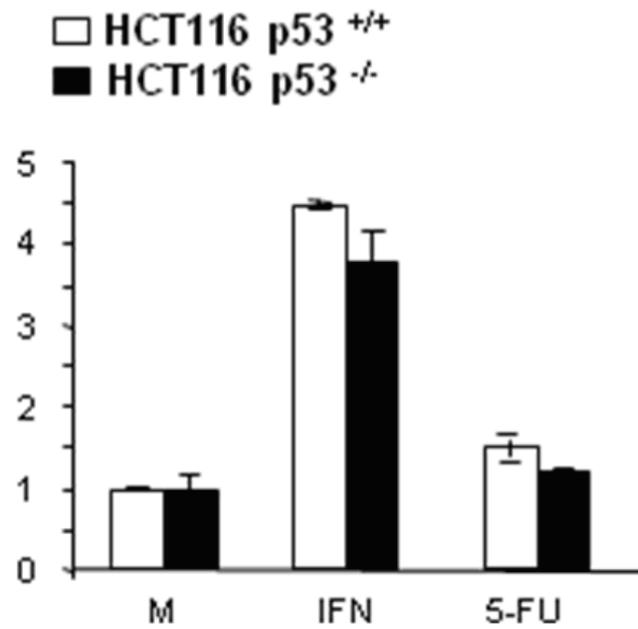


Fig. 3

C

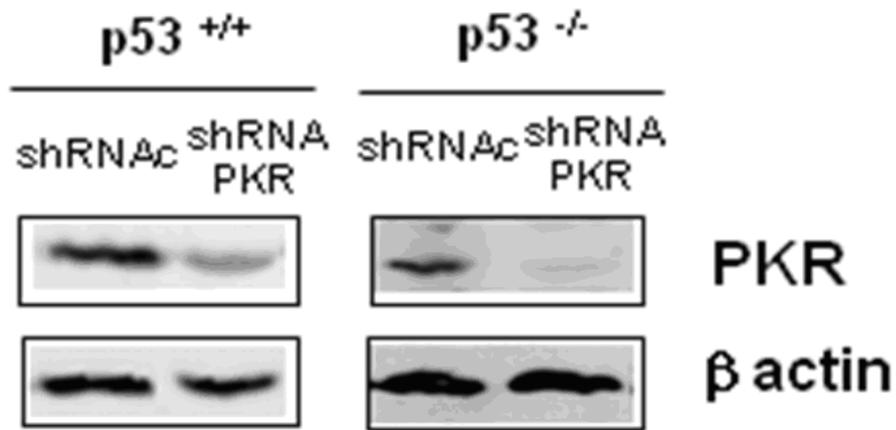
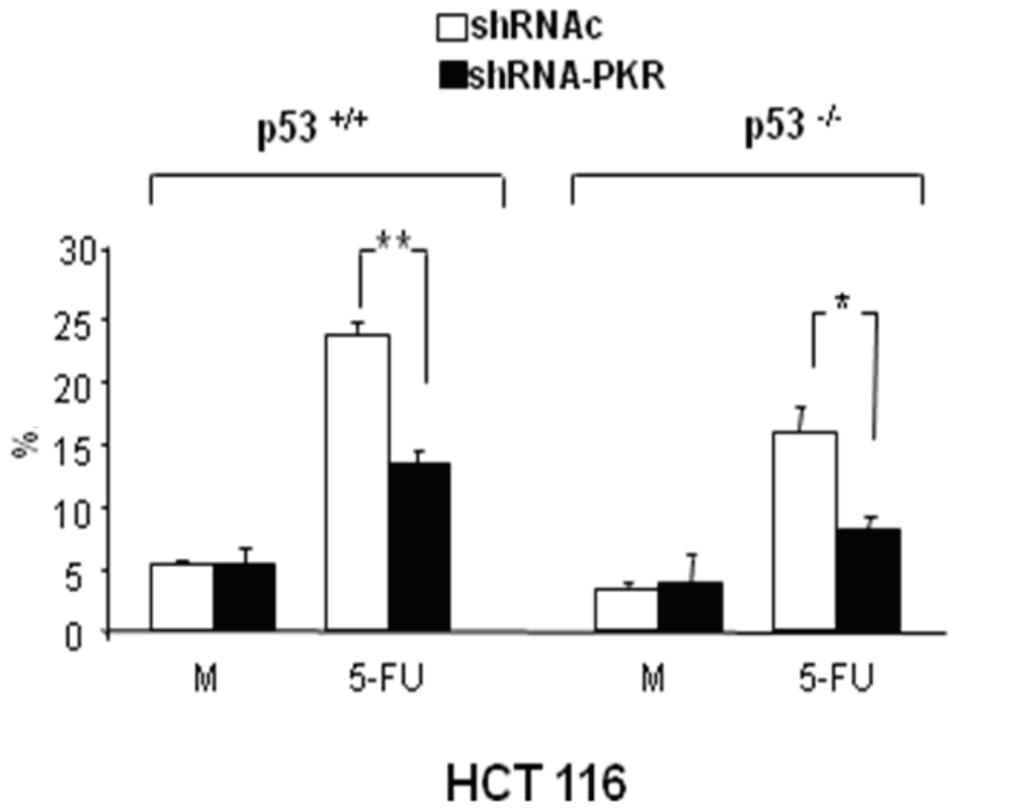
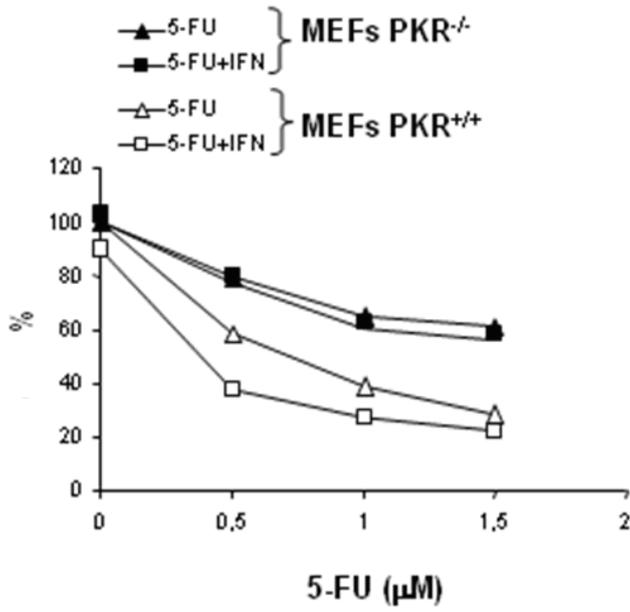


Fig. 3

A



B

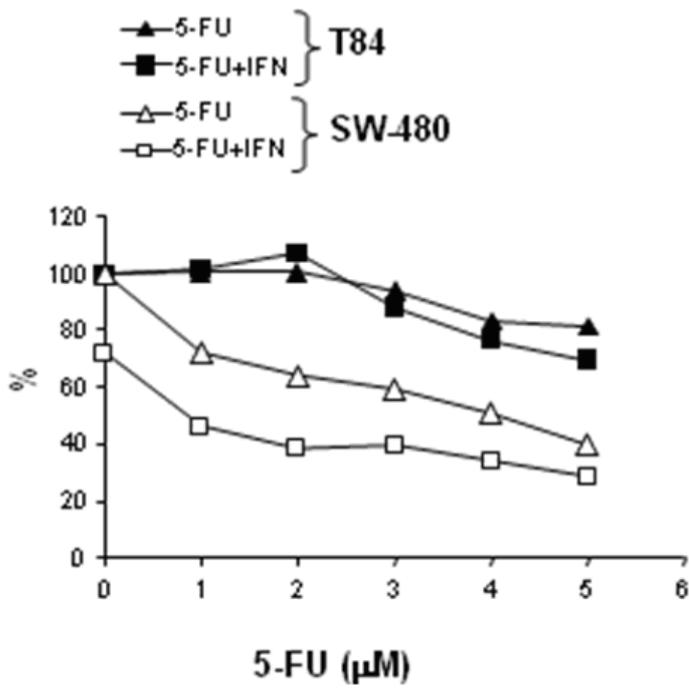


Fig. 4

C

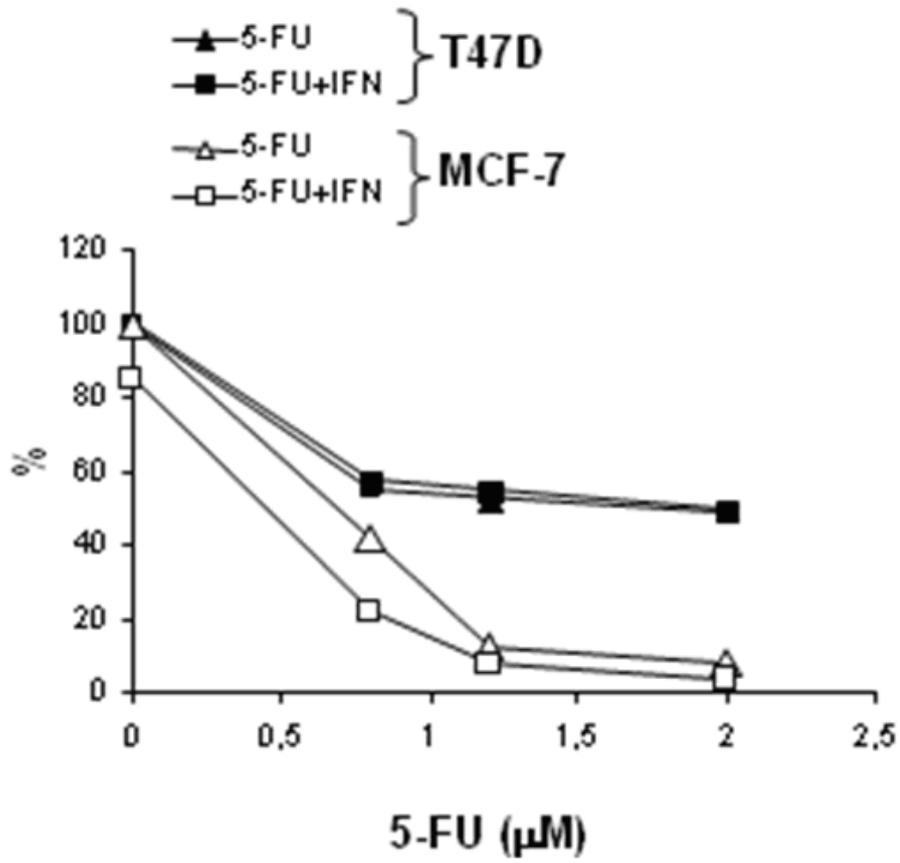


Fig. 4

A

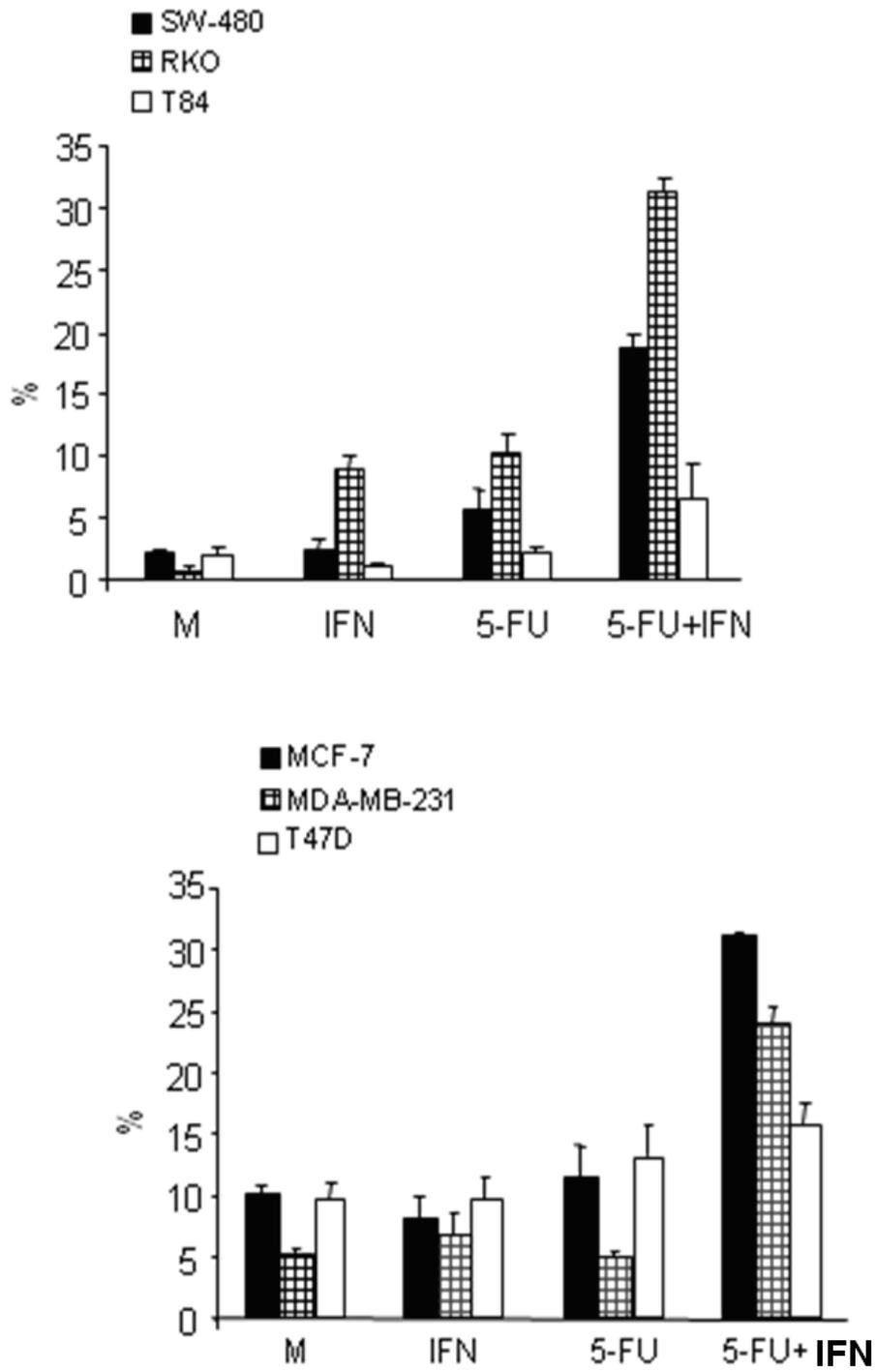
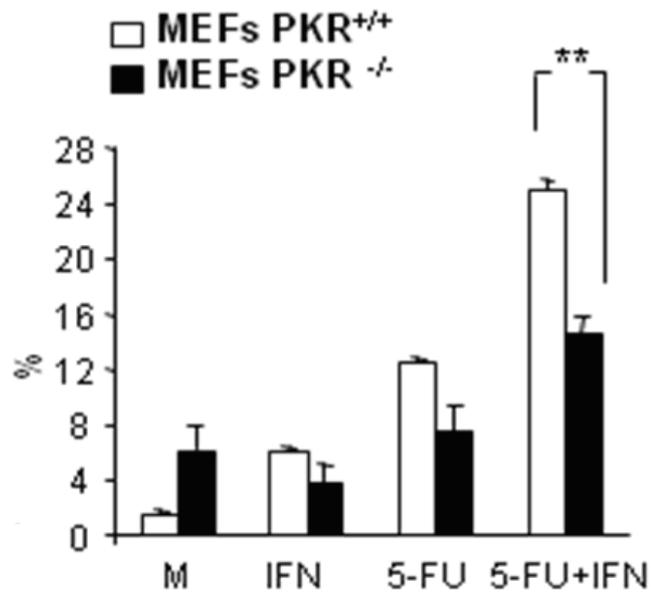


Fig. 5

B



C

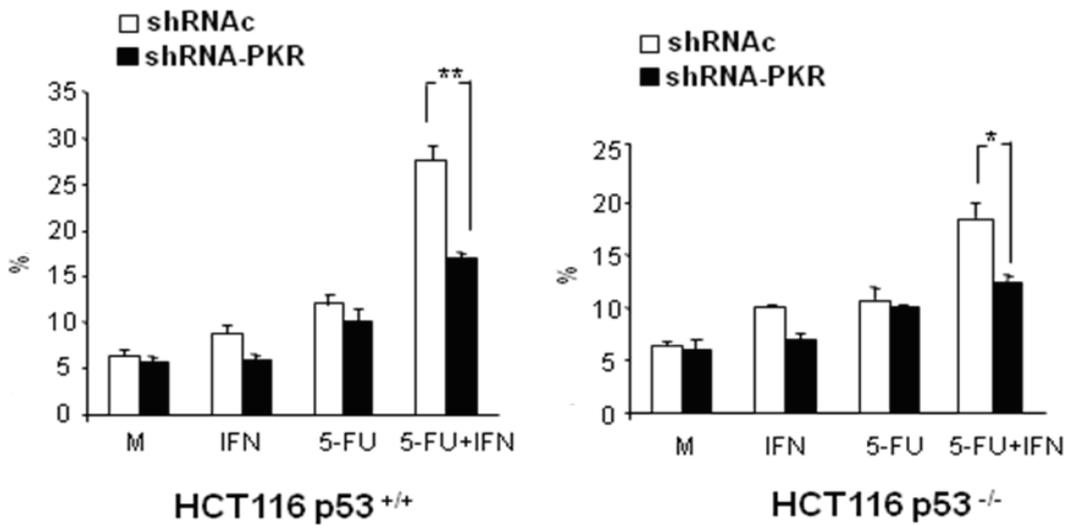


Fig. 5

ES 2 393 984 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Servicio Andaluz de Salud
<110> Universidad de Granada
<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

<120> Método de obtención de datos útiles para evaluar la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU).

<130> P-04309

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 551
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gly Asp Leu Ser Ala Gly Phe Phe Met Glu Glu Leu Asn Thr
1 5 10 15

Tyr Arg Gln Lys Gln Gly Val Val Leu Lys Tyr Gln Glu Leu Pro Asn
20 25 30

Ser Gly Pro Pro His Asp Arg Arg Phe Thr Phe Gln Val Ile Ile Asp
35 40 45

Gly Arg Glu Phe Pro Glu Gly Glu Gly Arg Ser Lys Lys Glu Ala Lys
50 55 60

Asn Ala Ala Ala Lys Leu Ala Val Glu Ile Leu Asn Lys Glu Lys Lys
65 70 75 80

Ala Val Ser Pro Leu Leu Leu Thr Thr Thr Asn Ser Ser Glu Gly Leu
85 90 95

Ser Met Gly Asn Tyr Ile Gly Leu Ile Asn Arg Ile Ala Gln Lys Lys
100 105 110

Arg Leu Thr Val Asn Tyr Glu Gln Cys Ala Ser Gly Val His Gly Pro
115 120 125

Glu Gly Phe His Tyr Lys Cys Lys Met Gly Gln Lys Glu Tyr Ser Ile
130 135 140

Gly Thr Gly Ser Thr Lys Gln Glu Ala Lys Gln Leu Ala Ala Lys Leu
145 150 155 160

ES 2 393 984 B1

Ala Tyr Leu Gln Ile Leu Ser Glu Glu Thr Ser Val Lys Ser Asp Tyr
165 170 175

Leu Ser Ser Gly Ser Phe Ala Thr Thr Cys Glu Ser Gln Ser Asn Ser
180 185 190

Leu Val Thr Ser Thr Leu Ala Ser Glu Ser Ser Ser Glu Gly Asp Phe
195 200 205

Ser Ala Asp Thr Ser Glu Ile Asn Ser Asn Ser Asp Ser Leu Asn Ser
210 215 220

Ser Ser Leu Leu Met Asn Gly Leu Arg Asn Asn Gln Arg Lys Ala Lys
225 230 235 240

Arg Ser Leu Ala Pro Arg Phe Asp Leu Pro Asp Met Lys Glu Thr Lys
245 250 255

Tyr Thr Val Asp Lys Arg Phe Gly Met Asp Phe Lys Glu Ile Glu Leu
260 265 270

Ile Gly Ser Gly Gly Phe Gly Gln Val Phe Lys Ala Lys His Arg Ile
275 280 285

Asp Gly Lys Thr Tyr Val Ile Lys Arg Val Lys Tyr Asn Asn Glu Lys
290 295 300

Ala Glu Arg Glu Val Lys Ala Leu Ala Lys Leu Asp His Val Asn Ile
305 310 315 320

Val His Tyr Asn Gly Cys Trp Asp Gly Phe Asp Tyr Asp Pro Glu Thr
325 330 335

Ser Asp Asp Ser Leu Glu Ser Ser Asp Tyr Asp Pro Glu Asn Ser Lys
340 345 350

Asn Ser Ser Arg Ser Lys Thr Lys Cys Leu Phe Ile Gln Met Glu Phe
355 360 365

Cys Asp Lys Gly Thr Leu Glu Gln Trp Ile Glu Lys Arg Arg Gly Glu
370 375 380

Lys Leu Asp Lys Val Leu Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Ile Thr Lys
385 390 395 400

ES 2 393 984 B1

agaatcaaca tccacacttc cgtgattatc tgcgtgcatt ttggacaaaag cttccaacca	540
ggatacggga agaagaaatg gctgggtgatc tttcagcagg tttcttcatg gaggaactta	600
atacataccg tcagaagcag ggagtagtac ttaaatatca agaactgcct aattcaggac	660
ctccacatga taggaggttt acatttcaag ttataataga tggaagagaa tttccagaag	720
gtgaaggtag atcaaagaag gaagcaaaaa atgccgcagc caaattagct gttgagatac	780
ttaataagga aaagaaggca gttagtcctt tattattgac aacaacgaat tcttcagaag	840
gattatccat ggggaattac ataggcctta tcaatagaat tgcccagaag aaaagactaa	900
ctgtaaatta tgaacagtgt gcatcggggg tgcattggcc agaaggattt cattataaat	960
gcaaaatggg acagaaagaa tatagtattg gtacaggttc tactaaacag gaagcaaaac	1020
aattggccgc taaacttgca tatcttcaga tattatcaga agaaacctca gtgaaatctg	1080
actacctgtc ctctggttct tttgctacta cgtgtgagtc ccaaagcaac tctttagtga	1140
ccagcacact cgcttctgaa tcatcatctg aagggtgactt ctcagcagat acatcagaga	1200
taaattctaa cagtgacagt ttaaacagtt cttcgttgct tatgaatggt ctcagaaata	1260
atcaaaggaa ggcaaaaaga tctttggcac ccagatttga ccttcctgac atgaaagaaa	1320
caaagtatac tgtggacaag aggtttggca tggattttaa agaaatagaa ttaattggct	1380
caggtggatt tggccaagtt ttcaaagcaa aacacagaat tgacggaaaag acttacgtta	1440
ttaaactgtg taaatataat aacgagaagg cggagcgtga agtaaaagca ttggcaaaac	1500
ttgatcatgt aaatattggt cactacaatg gctgttggga tggatttgat tatgatcctg	1560
agaccagtga tgattctctt gagagcagtg attatgatcc tgagaacagc aaaaatagtt	1620
caaggtcaaa gactaagtgc cttttcatcc aaatggaatt ctgtgataaa gggaccttgg	1680
aacaatggat tgaaaaaaga agaggcgaga aactagacaa agttttggct ttggaactct	1740
ttgaacaaat acaaaaaggg gtggattata tacattcaaa aaaattaatt catagagatc	1800
ttaagccaag taatatattc ttagtagata caaaacaagt aaagattgga gactttggac	1860
ttgtaacatc tctgaaaaat gatggaaagc gaacaaggag taagggaaact ttgcgataca	1920
tgagcccaga acagatttct tcgcaagact atggaaagga agtggacctc tacgctttgg	1980
ggctaattct tgctgaactt cttcatgtat gtgacactgc ttttgaaca tcaaagtttt	2040
tcacagacct acgggatggc atcatctcag atatatttga taaaaaagaa aaaactcttc	2100
tacagaaatt actctcaaag aaacctgagg atcgacctaa cacatctgaa atactaagga	2160
ccttgactgt gtggaagaaa agcccagaga aaaatgaacg acacacatgt tagagccctt	2220
ctgaaaaagt atcctgcttc tgatatgcag ttttccttaa attatctaaa atctgctagg	2280

ES 2 393 984 B1

```

gaatatcaat agatatttac cttttatntt aatgnttctt ttaattnttt actatnttta      2340
ctaactnttc tgcagaaaca gaaaggnttt cttctntttg cttcaaaaac attctttacat      2400
tttactnttt cctggctcat ctctttatnc tntttntttt tntaaagaca gagtctcgcct      2460
ctgntgcccc ggctggagtg caatgacaca gtcttggctc actgcaactt ctgcctcttg      2520
ggntcaagtg attctcctgc ctcagcctcc tgagtagctg gattacaggc atgtgccacc      2580
caccacaacta atntttgtgt tnttaataaa gacaggnttt caccatgntg gccaggnttg      2640
tctcaaaactc ctgacctcaa gtaatccacc tgcctcggcc tcccaaaagtg ctgggattac      2700
agggatgagc caccgcgccc agcctcatct ctttgttcta aagatggaaa aaccaccccc      2760
aaatnttctt tntatactat taatgaatca atcaattcat atctatntt taaatnttcta      2820
ccgctnttag gccaaaaaaa tgtaagatcg ttctctgcct cacatagctt acaagccagc      2880
tggagaaata tggactcat taaaaaaa aaaaaaagtg atgtacaacc                      2930

```

```

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
<223> cebador PKR Carboxi-terminal (F)

```

```

<400> 3
gaaggcggag cgtgaagtaa aagc                                             24

```

```

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador PKR Carboxi-terminal (R)

```

```

<400> 4
ctccacaca gtcaaggctc ttag                                             24

```

```

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador PKR Dominio regulador (F)

```

```

<400> 5
gacctcaca tgataggagg                                             20

```

```

<210> 6
<211> 21

```

ES 2 393 984 B1

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PKR Dominio regulador (R)

 <400> 6
 ccatggataa tccttctgaa g 21

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PKR Dominio kinasa (F)

 <400> 7
 gaaggcggag cgtgaagtaa aagc 24

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PKR Dominio kinasa (R)

 <400> 8
 ggatcataat cactgctctc 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PKR Dominio catalítico (F)

 <400> 9
 cttcttcatg tatgtgacac 20

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador PKR Dominio catalítico (R)

 <400> 10
 cttccacaca gtcaagggtcc ttag 24



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201130247

22 Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2011

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/48** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KWON H-Ch. et al. Expression of Double-stranded RNA-activated Protein kinase (PKR) and its Prognostic Significance in Lymph Node Negative Rectal Cancer. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2005. Vol. 35(9), páginas 545-550, todo el documento, principalmente página 548, columna 2 – página 549, columna 1.	1,3-21
Y		2
Y	ZHOU Y. et al. Expression of p68 protein kinase and its prognostic significance during IFN- α therapy in patients with carcinoid tumours. European Journal of Cancer. 1998. Vol. 34(13), páginas 2046-2052, todo el documento, principalmente página 2046, resumen; página 2050, columna 1 – página 2051, columna 2.	2
A	ES 2279266 T3 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 16.08.2007, página 3, líneas 8-28; reivindicaciones 1-4.	1-21
A	WO 2010060999 A1 (VERENIGING VU—WINDESHEIM [NL/NL]) 03.06.2010, resumen, página 2, línea 1 – página 6, línea 5; página 35, tabla 2B.	1-21

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
21.06.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2, 11-21	SI
	Reivindicaciones 1, 3-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-21	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KWON H-Ch. et al. Japanese Journal of Clinical Oncology. 2005. Vol. 35(9), páginas 545-550.	2005
D02	ZHOU Y. et al. European Journal of Cancer. 1998. Vol. 34(13), páginas 2046-2052.	1998
D03	ES 2279266 T3	16.08.2007
D04	WO 2010060999 A1	03.06.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga el uso de la proteína PKR, o gen que la codifica, para evaluar la respuesta en pacientes con cáncer al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU), solo o en combinación con interferón-*alpha* (reivindicaciones 1-2). Se refiere también a un método de obtención de datos útiles para este fin, determinando la actividad de la proteína PKR o la expresión del gen *pkR* en una muestra biológica, preferentemente de células tumorales, y comparándola con un valor de referencia (reivindicaciones 3-10); y a un kit, para llevar a cabo el método reivindicado, que incluye una serie de cebadores recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10 (reivindicaciones 11-21).

El documento D01 divulga un estudio sobre la relación de la expresión de la proteína quinasa PKR con el pronóstico de cáncer colorectal, realizado en pacientes operados de adenocarcinoma de recto y tratados con 5-fluorouracilo. El seguimiento de la evolución del paciente se basa en la valoración de la expresión de PKR, en muestras procedentes de los tumores extirpados, donde una mayor actividad de PKR indica un pronóstico más favorable, asociado a una menor recurrencia de la enfermedad (ver todo el documento, principalmente página 548, columna 2 - página 549, columna 1).

El documento D02 divulga un estudio sobre la relación de la expresión de la proteína PKR y su relación con el pronóstico de pacientes con cáncer de páncreas durante el tratamiento con interferón-*alpha*. Una mayor expresión de PKR, en una muestra de un paciente con adenocarcinoma, durante un proceso de tratamiento con IFN-*alpha*, es indicativo de una mejor respuesta al tratamiento (ver todo el documento, principalmente página 2046, resumen; página 2050, columna 1 - página 2051, columna 2).

El documento D03 divulga un método para determinar la respuesta de un paciente que padece cáncer colorectal a un tratamiento con 5-FU, basándose en la determinación del cociente de la expresión, en una muestra clínica, del mRNA de la timidina fosforilasa respecto de la expresión del mRNA de la dihidropirimidina deshidrogenasa y comparación posterior del resultado con un valor de corte predeterminado (ver página 3, líneas 8-28; reivindicaciones 1-4).

El documento D04 divulga un método para pronosticar la respuesta de un paciente a un tratamiento con fármacos relacionados con el factor de necrosis tumoral o sus antagonistas, basándose en la expresión de un interferón de tipo I, mediante la determinación de la expresión de un gen relacionado con la vía de síntesis de esta molécula, entre los que se encuentra el gen que codifica la proteína PKR (ver resumen, página 2, línea 1 - página 6, línea 5; página 35, tabla 2B).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986).**1.1. REIVINDICACIONES 1-21.**

El objeto técnico de la presente invención es el uso de la proteína PKR, o gen que la codifica, en un método para evaluar la respuesta en pacientes con cáncer al tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU), solo o en combinación con INF-*alpha*, y un kit para llevar a cabo dicho método que incluye una serie de cebadores, recogidos en las secuencias SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10.

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa que una mayor expresión de PKR, en muestras de tumores de pacientes con cáncer colorectal y tratados con 5-FU, indica una mejor respuesta al tratamiento, con un pronóstico más favorable, asociado a una menor recurrencia de la enfermedad.

En consecuencia, según lo expuesto en el documento D01, las reivindicaciones 1, 3-10 no cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 2, 11-21 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)**2.1. REIVINDICACIONES 2, 11-21.**

Como se ha indicado en el apartado anterior de esta opinión, relativo a la novedad, el documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica. La diferencia entre D01 y el objeto técnico de la presente invención, radica por una parte, en la respuesta al tratamiento combinado de 5-FU con INF-*alpha* y por otra, en el kit reivindicado.

El documento D02 anticipa que una mayor expresión de PKR, en una muestra de un paciente con adenocarcinoma, durante un proceso de tratamiento con IFN-*alpha*, indica una respuesta favorable al tratamiento. Se considera que, si una mayor expresión de PKR en muestras de pacientes con cáncer, es indicativa de un mejor pronóstico, bien sea en casos de tratamiento con 5-FU o con INF-*alpha*, sería obvio para un experto en la materia el que una mayor expresión de PKR fuese indicativa de una respuesta favorable al tratamiento combinado de 5-FU e INF-*alpha*.

Respecto al kit reivindicado, aunque los cebadores correspondientes a las SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO: 10 no se han encontrado en el estado de la técnica, se considera, que disponiendo de la secuencia del gen *pkc* sería obvio para un experto en la materia el obtener cualquier secuencia de nucleótidos, relacionada con este gen, para su uso como cebador para llevar a cabo el método de invención.

En consecuencia, las reivindicaciones 2, 11-21 carecen de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D03 y D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.