

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/191600 A1

(43) Fecha de publicación internacional
4 de diciembre de 2014 (04.12.2014) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2014/070433
- (22) Fecha de presentación internacional:
27 de mayo de 2014 (27.05.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201330783 29 de mayo de 2013 (29.05.2013) ES
- (71) Solicitantes: **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ** [ES/ES]; Paseo de la Castellana, 261, Edificio Norte (Antigua Escuela de Enfermeras), 4ª Planta, E-28046 Madrid (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID** [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, C/ Einstein, 3, E-28049 Madrid (ES). **FUNDACIÓN HOSPITAL DE MADRID** [ES/ES]; C/ San Bernardo, 101, E-28015 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **IBÁÑEZ DE CÁCERES, Inmaculada**; Paseo de la Castellana, 261, Edificio Norte (Antigua Escuela de Enfermeras), Planta 4ª, E-28046 Madrid (ES). **BELDA INIESTA, Cristóbal**; C/ San Bernardo, 101, E-28015 Madrid (ES). **PERNÍA ARIAS, Olga**; Paseo de la Castellana, 261, Edificio Norte (Antigua Escuela de Enfermeras), Planta 4ª, E-28046 Madrid (ES). **PERONA**
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PREDICTING THE RESPONSE TO TREATMENT WITH RADIOTHERAPY COMBINED WITH CHEMOTHERAPY BASED ON CISPLATIN

(54) Título : MÉTODO PARA PREDECIR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA COMBINADA CON QUIMIOTERAPIA BASADA EN CISPLATINO

(57) Abstract: The invention relates to a method for predicting the response to treatment with radiotherapy combined with chemotherapy based on cisplatin in patients suffering from cancer, preferably non-small cell lung cancer, where said method is based on the detection of the presence of methylation of the gene *IGFBP-3*. The invention also relates to an *in vitro* method for designing a personalised treatment for an individual suffering from said disease. The method of the invention can be quantitative or semi-quantitative. The invention also relates to a probe for the quantitative detection of the methylation of the gene *IGFBP-3*, to a kit comprising same, and to the use of said kit for predicting the response of an individual receiving the described treatment.

(57) Resumen: La invención se refiere a un método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico, donde dicho método se basa en la detección de la presencia de metilación del gen *IGFBP-3*. La presente invención también se refiere a un método in vitro para diseñar un tratamiento personalizado de un individuo con dicha enfermedad. El método de la invención puede ser cuantitativo o semicuantitativo. La presente invención también se refiere a una sonda para la detección cuantitativa de la metilación del gen *IGFBP-3*, a un kit que la comprende y al uso del kit para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento indicado.



WO 2014/191600 A1

Método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un método para predecir la respuesta al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con cáncer, preferiblemente cáncer de pulmón no microcítico, donde dicho método se basa en la detección de la presencia de metilación del gen *IGFBP-3*. El método de la invención puede ser cuantitativo o semicuantitativo. La presente invención también se refiere a una sonda para la detección cuantitativa de la metilación del gen *IGFBP-3*. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo del tratamiento del cáncer.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La terapia combinada de radioterapia y quimioterapia en un paciente con cáncer permite combinar los beneficios de ambas técnicas y ha conseguido mejorar la supervivencia en diversos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, sin embargo, la toxicidad se ve aumentada con dicho tratamiento (Moreno-Jiménez M *et al.* Rev Med Univ Navarra 51(4):13-33).

En quimioterapia, el cisplatino, también denominado *cis*-diaminodicloroplatino (II) (CDDP), es el tratamiento de elección para diversos tipos de cánceres, entre ellos, el cáncer de pulmón no microcítico. El cisplatino se puede administrar en terapia combinada con radioterapia ya que estudios multicéntricos han demostrado mejor respuesta global (Curran WJ, Jr. *et al.* 2011 Journal of the National Cancer Institute 103:1452-60).

Se ha descrito que los agentes quimioterápicos basados en platinos, entre los que se encuentra el cisplatino, metilan *de novo* el promotor de ciertos genes, alterando así su expresión. Entre dichos genes se encuentra el gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (*IGFBP-3*) (Ibáñez de Cáceres I. *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90).

30

La hipermetilación de la región 5' del promotor del gen *IGFBP-3*, es un proceso epigenético que acontece con elevada frecuencia en el cáncer humano (40%-60%) (Chang YS *et al.* 2002 Clin Cancer Res 8:3796-802; Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90; Torng PL *et al.* 2009 Mol Cancer 8:120). La metilación del gen *IGFBP-3* puede detectarse a través del uso de diferentes técnicas, como por ejemplo, secuenciación con bisulfito y el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para metilación (MSP) (Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-90; Tomii K *et al.* 2007 Int J Cancer 120:566-73; Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2006 Cancer Res 66:5021-8).

En la actualidad existe una necesidad clínica de conocer si un paciente va a responder o no a un tratamiento combinado de quimioterapia y radioterapia para poder adaptar el tratamiento a cada caso de manera individual, para evitar así los efectos secundarios asociados a la toxicidad de la terapia combinada y evitar el sobretratamiento en pacientes que no vayan a responder al mismo.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar un método de predicción de la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinado con quimioterapia basada en platinos.

En la presente invención se demuestra que la detección y/o cuantificación de la región promotora del gen *IGFBP-3*, en concreto de la región comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor (posiciones numeradas desde el ATG iniciador), es útil para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en platino, así como para diseñar un tratamiento individualizado del sujeto.

El método de la invención puede realizarse mediante la utilización de parejas de cebadores que detecten la presencia de metilación y/o parejas de cebadores que detecten la ausencia de metilación, lo que en la presente invención se denomina detección "semicuantitativa". Además, también puede

realizarse mediante el uso de una sonda, lo que permite una detección” cuantitativa”. Los estudios que demuestran la invención se llevaron a cabo tanto en líneas celulares como en muestras quirúrgicas de pacientes

- 5 Además, los inventores han demostrado que el uso de una sonda que detecta las posiciones -532 y -526 del promotor del gen *IGFBP-3*, permite la cuantificación del grado de metilación de dicho gen. El uso de la sonda descrita en la invención permite predecir si un sujeto que padecer cáncer va a responder a un tratamiento combinado de quimioterapia basada en platinos y
10 de radioterapia con mayor sensibilidad y eficacia.

Por lo aquí descrito, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia
15 basada en cisplatino, que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*.

En la presente invención, preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama. Más
20 preferiblemente el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

El término “cáncer de pulmón no microcítico”, “cáncer no microcítico pulmonar”, “carcinoma no microcítico de pulmón” (CNMP), “carcinoma de pulmón no microcítico” (CPNM), o cáncer pulmonar de células no pequeñas (en inglés
25 “non-small cell lung cancer”, NSCLC) se refiere a un tipo de cáncer o tumor de pulmón que comprende, según clasificación histológica, el subtipo carcinoma escamoso o epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso, carcinoma sarcomatoide, y carcinoma de células grandes.

- 30 Se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se emplean para curar o aliviar una enfermedad.

En la presente invención se entiende como “tratamiento con radioterapia

combinada con quimioterapia basada en cisplatino” a aquel tratamiento secuencial que comprende primeramente un tratamiento de quimioterapia basada en cisplatino y posteriormente un tratamiento de radioterapia según los criterios particulares de cada caso y conocidos por el experto en la materia.

5

La presente invención la quimioterapia también podría estar basada en otros fármacos derivados del platino, como por ejemplo, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino y picoplatino.

10 Se entiende por “metilación del promotor” la presencia de grupos metilo en las posiciones 5' de las citosinas de la isla CpG previas y contiguas a una guanina (es decir, de un dinucleótido CG) del promotor de un gen.

Se entiende por “hipermetilación” al aumento de la metilación de un promotor
15 con respecto a valores considerados normales por el experto en la materia. Se entiende por “hipometilación” a la disminución de la metilación de un promotor con respecto a valores considerados normales por el experto en la materia.

En la presente invención se entiende como “isla CpG” aquella región del
20 promotor de un gen que contiene al menos 500 pares de bases, una proporción de dinucleótidos CG (citosina-guanina) mayor del 50%.

En la presente invención se entiende por “promotor” o “región promotora”, a una secuencia de nucleótidos que controla la transcripción de un gen
25 determinado, en la presente invención se trata del gen *IGFBP-3*.

En la presente invención se define el gen *IGFBP-3* (o *IGFBP3*) como el gen que codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina. Dicho gen (*Entrez ID*: 3486) está localizado en la región cromosómica
30 7p12.3 y codifica para dos transcritos alternativos que comparten el mismo promotor, NM_000598.4 y NM_001013398.1. La isla CpG del gen *IGFBP-3* se encuentra localizada en posición -518/+744 respecto el primer exón y engloba 688 pares de bases por encima del sitio ATG, incluyendo el promotor descrito

del gen (SEQ ID NO: 1).

La detección y/o cuantificación en la presente invención se puede realizar por cualquier método conocido por el experto en la materia, como por ejemplo, pero sin limitarnos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR específica de metilación (MSP), MSP cuantitativa (QMSP o qMSP) o secuenciación. Previamente, el ADN puede haber sido sometido a una reacción con bisulfito previo a su detección y/o cuantificación.

10 El término "muestra biológica" incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. La muestra biológica comprende ácido desoxirribonucleico (ADN). Dicho ADN puede o no estar metilado y puede presentar distintos grados de metilación.

15

En la presente invención el término "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente.

En la presente invención se ha demostrado que la presencia de metilación en el promotor del gen *IGFBP-3* es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, mientras que la ausencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que la terapia a administrar es quimioterapia basada en cisplatino únicamente.

25 Por lo tanto, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece cáncer que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en el que la presencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.

30

El término "*in vitro*" se refiere a que el método de la invención se realiza fuera del cuerpo del sujeto.

Una realización preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en la región del promotor comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor ambas posiciones incluidas (SEQ ID NO: 2).

En la presente invención la localización de las posiciones -584 y -492 del promotor del gen *IGFBP-3* se realizan desde el codón ATG iniciador, conforme a la forma realizada por cualquier experto en la materia.

Otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o la cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en las posiciones -532 y-526 desde el codón ATG iniciador. Es decir, estas posiciones corresponden a las posiciones 157 y 163 de la SEQ ID NO:1 y a las posiciones 53 y 59 de la SEQ ID NO:2. Las posiciones -532 y-526 son citosinas comprendidas en dinucleótidos CG.

Otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa. Preferiblemente, la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 (cebador sentido, de secuencia 5'-ttttacgaggtatatacgaatgc-3') y SEQ ID NO: 4 (cebador antisentido, de secuencia 5'-tctcgaaataaaatctccctacg-3') (cebadores para la detección de metilación) y/o SEQ ID NO: 5 (cebador sentido, de secuencia 5'-agaaagttttatgaggtatatatga-3') y SEQ ID NO: 6 (cebador antisentido, de secuencia 5'-cactctcaaaataaaatctccct-3') (cebadores para la detección de ausencia de metilación). Preferiblemente la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

El término “cebador” (también denominado “oligo”), como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa. Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

10 Como se ha indicado anteriormente, el método de la invención puede ser realizado mediante también el uso de una sonda, de modo que sería un método cuantitativo, mientras que si no se utilizara una sonda y se utilizaran sólo los cebadores sería un método semicuantitativo.

15 Por lo tanto, otra realización aún más preferida del primer y del segundo aspecto de la invención se refiere al método donde además se emplea una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 (5'-ccgatatcgaaaaact-3'). Preferiblemente, la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, la sonda comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo, por ejemplo FAM™, o VIC®. En una realización aún más preferida, en el extremo amino terminal la sonda comprende el fluoróforo 6-FAM™ y en el carboxilo terminal un “minor groove binder” (MGB) sin fluorescencia (MGB-NFQ).

En la presente invención nos referiremos a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7 como a la “sonda de la invención”.

30 La sonda de la invención se puede producir por los métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, puede producirse a partir de síntesis química.

La sonda de la invención se une al ADN del promotor del gen *IGFBP-3* cuando éste está metilado.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

- a. aislamiento de ácido desoxirribonucleico en una muestra biológica aislada de un sujeto;
- 10 b. modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico;
- c. hibridación con cebadores específicos;
- d. amplificación de una secuencia comprendida entre los cebadores descritos en el paso (c);
- 15 e. detección de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- f. comparar la metilación del paso (d) con niveles estándar;
- g. encontrar diferencias significativas en la comparación del paso (f);
- h. asociar las diferencias significativas del paso (g) a una metilación o desmetilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- 20 i. asociar la presencia de metilación del paso (h) a una respuesta favorable al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino; o asociar la desmetilación del paso (h) a una respuesta a tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino desfavorable.

25

En la presente invención el aislamiento del ADN y la modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico se realiza por los métodos conocidos por el experto en la materia.

30

El término "niveles estándar" tal como se entiende en la presente invención se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a los niveles de metilación obtenidos de una muestra de referencia que presente un grado de metilación conocido.

En la presente invención "diferencia significativa" se refiere a que existen diferencia estadísticas entre los valores comparados, siendo la probabilidad estadística al menos mayor que 0,05 ($p > 0,05$) o mayor que 0.005 ($p > 0.005$) y obteniéndose ésta según el test estadístico aplicable a cada caso.

5

En la presente invención los términos "desmetilación", "ausencia de metilación" y "falta de metilación" se utilizan indistintamente.

En la presente invención se considera "favorable" a un aumento de la supervivencia del individuo tras el tratamiento. Se considera "desfavorable" a una disminución de la supervivencia del individuo tras el tratamiento.

Una realización preferida del método tercero de la invención, se refiere al método donde la muestra de referencia y las muestras de estudio han sido previamente normalizadas antes de la comparación.

15

Se entiende por "normalización" la utilización de una muestra control que sirva para eliminar variaciones experimentales entre las distintas muestras.

Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde los cebadores del paso (c) son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

20

Una realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde los cebadores del paso (c) son SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

25

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde además en el paso (c) se incluye una sonda y en el paso (e) se cuantifica la metilación. Preferiblemente la sonda comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7. Más preferiblemente, la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

30

Otra realización aún más preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

5

Una realización preferida del primer, del segundo y del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.

10

Otra realización preferida del primer, del segundo y del tercer aspecto de la invención se refiere al método donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina

15 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la sonda de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID
20 NO: 7.

Otra realización aún más preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere a la sonda que además comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo, por ejemplo FAMTM, o VIC[®]. En una
25 realización aún más preferida, en el extremo amino terminal la sonda comprende el fluoróforo 6-FAMTM y en el carboxilo terminal un "minor groove binder" (MGB) sin fluorescencia (MGB-NFQ).

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la sonda
30 de la invención para la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.

Un sexto aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la sonda de la invención para determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento de radioterapia combinado con quimioterapia basada en cisplatino.

5 Una realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde el sujeto padece cáncer. Preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama. Más preferiblemente, el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

10

Otra realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.

15

Otra realización preferida del quinto y del sexto aspecto de la invención se refiere al uso donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

20 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende la sonda del cuarto aspecto de la invención.

Una realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere al kit que además comprende cebadores. Más preferiblemente los cebadores son las
25 parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

El kit además puede comprender al menos una ADN polimerasa, una retrotranscriptasa, una ARN polimerasa o un fluoróforo. Además el kit puede
30 comprender una mezcla de deoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs), una mezcla de nucleótidos tri-fosfato (NTPs), deoxiribonucleasa (DNasa), inhibidores de la ribonucleasa (RNasa), Dithiothreitol (DTT), pirofosfatasa inorgánica (PPi) y los tampones necesarios para las enzimas proporcionadas en el kit.

En la presente invención la sonda o los cebadores pueden estar situados en un soporte sólido, por ejemplo, pero sin limitarse, cristal, plástico, tubos, placas multipocillo, membranas, o cualquier otro soporte conocido.

5

Un octavo aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit del séptimo aspecto de la invención para determinar y/o cuantificar de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.

10 Un noveno aspecto de la invención se refiere al uso *in vitro* del kit del séptimo aspecto de la invención para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.

Una realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiera al uso donde el sujeto padece cáncer. Preferiblemente el cáncer es 15 cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama. Más preferiblemente el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

20 Otra realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiere al uso donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.

25 Otra realización preferida del octavo y del noveno aspecto de la invención se refiera al uso donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

Los términos “secuencia de nucleótidos”, “secuencia nucleotídica”, 30 “polinucleótido”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se usan aquí de manera intercambiable y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos. Dichos nucleótidos pueden estar, o no, 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 figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 Fig. 1 muestra el estado de metilación de cada posición CpG analizada en la isla CpG que engloba el promotor del gen *IGFBP-3* y su frecuencia de metilación en ADN tumoral o no neoplásico. Se indica codón de inicio de la transcripción (ATG) y caja TATA (TATA). A, ADN tumoral; B, ADN de tejido control no neoplásico. Las flechas muestran la ubicación de los cebadores y de la sonda de la invención que detecta sólo presencia de ADN metilado. Círculos negros: frecuencia de metilación alta, >30%; círculos grises: frecuencia de metilación media, 15-30%; círculos blancos: frecuencia de metilación baja, 0-15%.

20 Fig. 2 representa las curvas cuantitativas estándar para los genes *IGFBP-3* (A) y β -actina (B) a partir de cuatro diluciones seriadas de ADN modificado por bisulfito (3ng- 0,003ng). El producto amplificado se detecta de modo cuantitativo a través del uso de la sonda de la invención, que genera una señal de fluorescencia, que permite cuantificar los niveles del producto metilado amplificado por PCR para una región del promotor de gen *IGFBP-3* y nos permiten la amplificación y por tanto la cuantificación de los niveles de ADN metilado que contiene la muestra que analicemos para el gen *IGFBP-3*, hasta una sensibilidad de 1 alelo metilado en un fondo de 10.000 alelos no metilados (sensibilidad 1:10.000). Los datos para cada muestra se normalizan con los obtenidos de la interpolación en la curva de β -actina. "aprox", aproximado; "cel" célula; CT, número de ciclo de corte del umbral ("cycle threshold").

30

Fig. 3 curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado. Se

muestra la linealidad esperada entre las curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado las curvas estándar para el gen de referencia β - actina, y la interpolación de los ADN control positivo (SW780 y HT29) (A) y control negativo (SKOV3 y PANC1) (B). A, interpolación de las líneas celulares 5 controles positivas (SW780 y HT29) en las curvas respectivas para el gen *IGFBP-3* metilado y para β -actina como control endógeno no metilado, mientras que en (B) se observa como las líneas control negativas (SKOV3 de cáncer de mama y PANC1 de cáncer de páncreas), sólo interpolan en la curva para β -actina como control endógeno no metilado. Estos resultados confirman 10 la especificidad de la metodología de la invención.

Fig. 4 comparación de la sensibilidad y la especificidad de la detección cuantitativa de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* mediante la sonda de la invención mediante QMSP frente a la tradicional MSP en una cohorte de 15 muestras de pacientes con CPNM conservadas en parafina. Se muestra un ejemplo de un gel de la técnica MSP completo con controles positivos (IVD), negativos (C-) y agua, en el que se confirma que los pacientes 2, 4 y 23 están metilados, y que la metilación en los pacientes 15 y 27 no se detecta por esta técnica, mientras que por QMSP fuimos capaces de detectar presencia de 20 metilación en estos pacientes.

Fig. 5 muestra los niveles de metilación de *IGFBP-3* en una segunda cohorte de 40 pacientes y diez muestras no neoplásicas, y las curvas Kaplan Meier de supervivencia global representada en días en pacientes con *IGFBP-3* no 25 metilada sometidos a un tratamiento con quimioterapia o con quimioterapia-radioterapia. (A), Niveles de metilación de *IGFBP-3* en una segunda cohorte de 40 pacientes y diez muestras no neoplásicas, a través de los ratios *IGFBP-3/ACTB* NSCLC-M: muestras de cáncer de pulmón no microcítico consideradas metiladas para *IGFBP-3*; NSCLC-U: muestras de cáncer de pulmón no 30 microcítico consideradas no metiladas para *IGFBP-3*. (B) Curvas de Kaplan Meier comparando el estado de metilación de *IGFBP-3* no metilado con supervivencia acumulada en días en 40 pacientes con CPNM sometidos a un tratamiento con quimioterapia o con el tratamiento combinado de quimioterapia-

radioterapia. Censurados son los pacientes cuya supervivencia no se han podido seguir más allá del tiempo indicado para la censura. "Radioterapia +" significa tratamiento con radioterapia; "Radioterapia -", significa que no hay tratamiento con radioterapia.

5

EJEMPLOS

Ensayo cuantitativo de metilación:

Para valorar el estado de metilación del gen *IGFBP-3* en cada muestra, se procedió en primer lugar a la modificación de la secuencia del ADN genómico a través del uso combinado de bisulfito sódico e hidroquinona. El ADN modificado se amplificó a través de una PCR a tiempo real basada en fluorescencia según protocolo descrito previamente (Harden SV *et al.* 2003 Clin Cancer Res 8:1370-5).

Los oligos que se utilizaron en la presente invención fueron descritos anteriormente (Ibáñez de Cáceres I *et al.* 2010 Oncogene 29:1681-1690). La utilización de estos oligos (también denominados "cebadores" en la presente invención) permite identificar la presencia de metilación en la zona promotora del gen *IGFBP-3* utilizando la técnica de PCR específica de metilación (MSP), que es una técnica semicuantitativa. Los cebadores son la pareja SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que detecta metilación; y la pareja SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 que detecta ausencia de metilación.

La utilización de la sonda de la invención (SEQ ID NO: 7) permitió la cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*, mediante la técnica MSP cuantitativa (QMSP).

Se realizaron numerosos ensayos en un panel de 26 líneas celulares de cáncer humano, modificando el ADN, eliminando la presencia de citosinas no metiladas, y su sustitución por uracilos seguido de su amplificación y secuenciación del área de ADN comprendido entre ambos oligos, con la finalidad de identificar las posiciones de los nucleótidos CpG que más frecuentemente y de manera inalterada y constante se muestran metiladas

cuando el gen está inactivado. De esta manera se pudo identificar la región específica de metilación para ADN modificado comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor del gen *IGFBP-3* y seleccionar el marcaje adecuado en los extremos 5' y 3', para producir una sonda que hiciera efectiva la técnica. El producto amplificado por esta técnica (denominada "QMSP-*IGFBP-3*"), se detecta de modo cuantitativo a través del uso de la sonda específica de la presente invención (SEQ ID NO: 7), marcada con el fluorocromo FAM™, en su extremo 5' y con un "Minor Groove Binder" (MGB) sin fluorescencia (NFQ) en el extremo 3' (6FAM5'-CCGATATCGAAAAAACT-3'MGB-NFQ). Tras su unión, esta sonda generó una señal de fluorescencia, que permitió cuantificar los niveles del producto metilado amplificado por PCR. La cuantificación del grado de metilación del gen *IGFBP-3* depende exclusivamente de la especificidad de la sonda de la invención y no de la técnica QMSP en sí misma. La técnica QMSP descrita en la presente invención para detectar la metilación del gen *IGFBP-3* se denominó "QMSP-*IGFBP-3*".

Por lo tanto, la técnica QMSP-*IGFBP-3* de la presente invención, se basa en la amplificación con fluorescencia de ADN modificado que permite cuantificar la metilación del promotor de *IGFBP-3* en muestras de ADN modificadas por bisulfito. Los niveles relativos de ADN con el promotor del gen *IGFBP-3* metilado ("niveles relativos de metilación") en cada muestra, se determinaron como un ratio entre los valores obtenidos de la amplificación de la región seleccionada del promotor del gen *IGFBP-3* y los obtenidos de la amplificación del gen β -actina como referencia endógena. El ratio se multiplicó por 1000 para facilitar su tabulación (gen de interés/gen referencia x 1000), obteniéndose un cociente de metilación (MQ) que representa el nivel relativo de metilación de la muestra de estudio, tal como se ha descrito para la valoración en otros genes (Eads CA *et al.* 2000 *Nucleic Acid Res* 28:E32; Eads CA *et al.* 1999 *Cancer Res* 59:2302-6).

En nuestro análisis de metilación, las amplificaciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos en el sistema *StepOnePlus™* de detección de amplicones

de la casa *Applied Biosystems* con un volumen final de 25 μ l en cada pocillo, conteniendo:

600 nM de cada cebador para la amplificación de ADN modificado y metilado para el gen *IGFBP-3*; 200 nM de sonda específica; 2X *TaqMan Universal Master Mix II*, esta reacción contiene AmpliTaq Gold® ADN Polimerasa, Uracil-N glycosilasa (UNG), dNTPs con dUTP y ROX™ como referente junto con un buffer optimizado, todo ello de la casa *Applied Biosystems*; y ADN modificado, donde se utilizan 3 μ l de ADN tratado para cada reacción de QMSP. Las condiciones de la reacción de la QMSP fueron las siguientes: 1 ciclo de 2 minutos a 50°C; 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y de 1 minuto a 60°C, en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de la MSP habían sido descritas anteriormente (Ibáñez de Cáceres I, *et al.* 2012 Oncogene 29:1681-1690).

Cada placa contenía las muestras tumorales, múltiples blancos con agua (NTCs) y controles positivos y negativos. El ADN de las líneas de cáncer humano SW780 (vejiga), HT29 (Colon) and 41MR (ovario), se usó como control positivo, ya que estas líneas presentan metilación en el promotor del gen *IGFBP-3*. Diluciones seriadas de un "pool" de estos ADNs modificados, en un rango desde 30 ng/ μ l a 0,003ng/ μ l, sirvió como control para las curvas estándar de β -actina e *IGFBP-3* en cada palca utilizada para cada ensayo.

En cada ensayo se determinó la sensibilidad y especificidad para un rango de valores de "threshold" en ambas curvas estándar, seleccionándose un "threshold" ideal que diferenciaría los casos verdaderos positivos (independientemente de los niveles de metilación que presentase cada muestra) de los verdaderos negativos. Todos los casos verdaderos negativos en la tecnología que presentamos se validaron como negativos por las técnicas de secuenciación por bisulfito (BS) y/o PCR de metilación específica (MSP), lo que correspondería con una especificidad del 100%.

Considerándose positiva una muestra para metilación cuando el valor de MQ es mayor de 1. Este valor se obtiene para promotor del gen *IGFBP-3* metilado

en cada muestra, determinado como un ratio entre los valores obtenidos de la amplificación de la región seleccionada del promotor del gen *IGFBP-3* y los obtenidos de la amplificación del gen B-actina como referencia endógena. El ratio se multiplica por 1000 para facilitar su tabulación (gen de interés/gen referencia x 1000), obteniéndose un cociente de metilación (MQ) que representa el nivel relativo de metilación de la muestra de estudio, tal como se ha descrito para la valoración en otros genes como MGMT, APC, MLH1, p16 (Durr ML, *et al.* PLoS One 2010 May 26;5(5):e10828).

10 **Resultados**

El diseño de los cebadores y sonda de la presente invención son específicos para la región del promotor de gen *IGFBP-3* comprendida entre las posiciones -584 y -492, incluyendo ambas posiciones, y permiten la amplificación y por tanto la cuantificación de los niveles de ADN metilado que contiene la muestra que analicemos para el gen *IGFBP-3*, hasta una sensibilidad de 1 alelo metilado en un fondo de 10.000 alelos no metilados (sensibilidad 1:10.000) (figura 1). Las curvas estándar para la identificación del gen *IGFBP-3* metilado cumplen la linearidad y el paralelismo esperados con las curvas estándar para el gen de referencia β -actina. Mostramos como ejemplo ambas curvas obtenidas en el mismo proceso experimental, en la figura 2.

Se testó la nueva metodología en las líneas de cáncer humano que nos sirvieron como control ya que fueron las utilizadas para la identificación de la sonda, y cuyo estado de metilación para el gen *IGFBP-3* fue testado tanto por la técnica de secuenciación por bisulfito como por la técnica de PCR de metilación específica (MSP). En la figura 3 se puede observar en el panel izquierdo, la clara interpolación de las líneas celulares controles positivas (SW780 y HT29) en las curvas respectivas para el gen *IGFBP-3* metilado y para β -actina como control endógeno no metilado, mientras que el panel derecho se observa como las líneas control negativas (SKOV3 de cáncer de mama y PANC1 de cáncer de páncreas), sólo interpolan en la curva para B-actina como control endógeno no metilado. Estos resultados confirman la especificidad de la metodología que presentamos en esta invención (Figura 3).

Posteriormente se comparó la sensibilidad y la especificidad de esta nueva tecnología QMSP-IGFBP-3 frente a la tradicional MSP en dos series de muestras de pacientes con CPNM conservadas en parafina. En la primera

5 cohorte de pacientes se comprobó la especificidad de la técnica que presentamos (QMSP-IGFBP-3), comparándola con la tradicional MSP (descrita en Ibáñez de Cáceres I. *et al.* 2010 *Oncogene* 29:1681-1690). En 28 de 32

10 pacientes con CPNM extirpados en el Hospital Universitario La Paz, encontramos el mismo estado de metilación del gen *IGFBP-3* utilizando ambas técnicas, y los restantes 4 pacientes fueron rescatados, ya que con la técnica tradicional MSP no se encontró presencia de metilación, siendo en su momento

15 identificadas como muestras no metiladas, mientras que la utilización de la sonda de la invención permitió identificar la presencia de un grado moderado de metilación en estas 4 muestras de pacientes, ya que la sensibilidad se incrementa en un orden de magnitud (tabla 1, con asterisco). Esta técnica

20 además incorpora valores de grado de metilación, ya que es una valoración cuantitativa, lo que permite estudios de correlaciones con variable continua, aumentando su valor estadístico. En la Figura 4, mostramos a modo de ejemplo un gel de la técnica MSP completo con controles positivos (IVD),

negativos (C-) y agua, en el que se confirma que los pacientes 2, 4 y 23 están metilados, y que la metilación en los pacientes 15 y 27 no se detecta por esta técnica, mientras que por QMSP con la sonda de la invención fuimos capaces de detectar presencia de metilación en estos pacientes.

25 Tabla 1. Se muestra en tejido de pacientes los resultados obtenidos para la MSP y para la qMSP de la presente invención.

Muestra	Anatomía Patológica	TNM	Estadio	MSP	qMSP(RQ nivel relativo de metilación)
1	Célula grande	T2N1	2B	M	M (0,55)
2	Epidermoide	T2N0	1B	M	M (0,15)
3	Epidermoide	T2N1	2B	U	* M (12,95)
4	Epidermoide	T3N0M0	2B	M	M (10,84)
5	Epidermoide	T2N0M0	1B	M	M (3,9)
6	Adenocarcinoma	T1N0M0	1A	U	U

	a				
7	Epidermoide	T1N0M0	1A	U	U
8	Epidermoide	T2N0	1B	M	M (0,22)
9	Célula grande	T1N0M0	1A	M	M (0,046)
10	Adenocarcinoma	Desconocido	Desconocido	M	M (11,3)
11	Adenocarcinoma	T2N0M0	1B	M	M (0,30)
12	Adenocarcinoma	T1N0M0	1B	M	M (0,2)
13	Epidermoide	T2N0M0	1B	U	U
14	Epidermoide	T2N0	1B	M	M (54,9)
15	Adenocarcinoma	T2N0	1B	U	* M (0,14)
16	Epidermoide	T2N0M0	1B	U	U
17	Adenocarcinoma	T2N0M0	1B	U	U
18	Adenocarcinoma	T3N0	2B	U	U
19	Epidermoide	T2N1	2B	U	* M (2,6)
20	Epidermoide	T2N0	1B	U	U
21	Epidermoide	T3N0	2B	U	U
22	Epidermoide	T2N2	3A	U	U
23	Epidermoide	T2N0	1B	M	M (4,9)
24	Epidermoide	Desconocido	Desconocido	U	U
25	Epidermoide	T3N0	2A	M	M (91,6)
26	Epidermoide	T2N1	2B	U	U
27	Epidermoide	T2N1	2B	U	* M (0,7)
28	Adenocarcinoma	T2N1	2B	U	U
29	Célula grande	T2N0	1B	U	U
30	Epidermoide	T2N1	2B	U	U
31	Adenocarcinoma	T2N1	2B	U	U
32	Epidermoide	T1N0	1A	U	U

TNM, clasificación del cáncer de pulmón. "RQ", cuantificación relativa; U, no metilado; M, metilado.

Así mismo hemos comprobado en una segunda serie confirmativa de 40 piezas tumorales embebidas en parafina de pacientes con CPNM extirpados en el Hospital del Mar de Barcelona, la sensibilidad de la técnica para identificar presencia y grado de metilación y comprobar en primer lugar si el rango de

valores es similar al obtenido en la primera cohorte. La totalidad de los pacientes interpolaron en la curva del control endógeno no metilado β -actina, lo que garantiza la presencia de ADN modificado objeto de estudio mientras que 21 pacientes de los 40 interpolaron también en la curva para el gen *IGFBP-3* metilado, resultando en la obtención de valores relativos de la presencia de DNA metilado para el gen *IGFBP-3* de diferente grado de metilación (reflejado en el valor entre paréntesis y denominado "nivel relativo de metilación"), con valores aproximados de cociente de metilación (MQ) comprendidos entre 0,01 y 100 (Figura 5A). Los valores obtenidos de MQ concuerdan en grado con los obtenidos en la cohorte inicial del H U La Paz (Figura 4 y tabla 1). En segundo lugar se ha demostrado que la ausencia de metilación del promotor del gen *IGFBP-3* es indicativa de que el tratamiento a administrar es quimioterapia con cisplatino, en vez de la terapia combinada con quimio-radioterapia (Figura 5B), por lo que los pacientes con ausencia de metilación no deberían recibir radioterapia, ya que la supervivencia global en los pacientes con *IGFBP-3* no metilado que reciben sólo quimioterapia es superior a los que reciben tratamiento combinado con quimioterapia y radioterapia.

La técnica es por tanto, capaz de identificar la presencia de ADN metilado en un amplio rango (Figura 5A). Estos resultados satisfacen una necesidad existente y no resuelta hasta la fecha en la práctica clínica, que es identificar qué pacientes son los que presenta alta probabilidad de respuesta a un tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en derivados del platino, como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, sartraplatino, etc .

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para predecir la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*.
5
2. Método *in vitro* para diseñar un tratamiento individualizado para un sujeto que padece cáncer que comprende detectar y/o cuantificar en una muestra biológica de dicho sujeto la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en el que la presencia de metilación en dicho promotor es indicativa de que el tratamiento a administrar es radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.
10
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se realiza en la región del promotor comprendida entre las posiciones -584 y -492 del promotor ambas inclusive.
15
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la detección y/o la cuantificación de la metilación del promotor de gen *IGFBP-3* se realiza en las posiciones -532 y -526 del promotor.
20
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa.
25
6. Método la reivindicación 5 donde la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
30

7. Método según la reivindicación 6 donde la reacción en cadena de la polimerasa comprende el empleo de las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 5 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 donde además se emplea una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
9. Método según la reivindicación 8 donde la sonda consiste en la secuencia
10 de nucleótidos SEQ ID NO: 7.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9 donde la sonda comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo terminal un fluoróforo.
- 15 11. Método *in vitro* para la predicción de la respuesta de un sujeto que padece cáncer al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- 20 a. aislamiento de ácido desoxirribonucleico en una muestra biológica aislada de un sujeto;
- b. modificación del ácido desoxirribonucleico aislado mediante bisulfito sódico;
- c. hibridación con cebadores específicos;
- d. amplificación de una secuencia comprendida entre los cebadores
25 descritos en el paso (c);
- e. detección de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- f. comparar la metilación del paso (d) con niveles estándar;
- g. encontrar diferencias significativas en la comparación del paso (f);
- h. asociar las diferencias significativas del paso (g) a una metilación o
30 desmetilación del promotor del gen *IGFBP-3*;
- i. asociar la presencia de metilación del paso (h) a una respuesta favorable al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino; o asociar la desmetilación del

paso (h) a una respuesta a tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino desfavorable.

5 12. Método según la reivindicación 11, donde los cebadores del paso (c) son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

13. Método según la reivindicación 12, donde los cebadores del paso (c) son SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

10

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 donde además en el paso (c) se incluye una sonda y en el paso (e) se cuantifica la metilación.

15. Método según la reivindicación 14 donde la sonda comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

15

16. Método según la reivindicación 15 donde la sonda consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 7.

20 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el sujeto padece cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama.

25 18. Método según la reivindicación 17, donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

25

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma, suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.

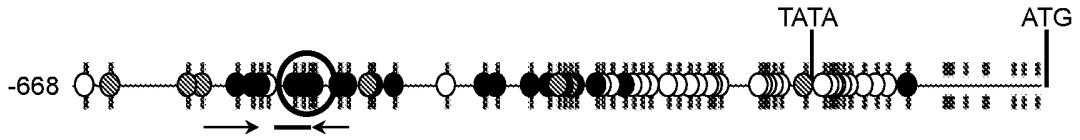
30

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 donde la muestra biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

21. Sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos SEQ
ID NO: 7.
22. Sonda de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos SEQ
5 ID NO: 7.
23. Sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22 que además
comprende en su extremo amino terminal y/o en su extremo carboxilo
terminal un fluoróforo.
10
24. Uso *in vitro* de una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23
para la detección y/o cuantificación de la metilación del promotor del gen
IGFBP-3 en una muestra biológica de un sujeto.
- 15 25. Uso *in vitro* de una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24
para determinar la respuesta de un sujeto al tratamiento de radioterapia
combinado con quimioterapia basada en cisplatino.
26. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25 donde el sujeto
20 padece cáncer.
27. Uso según la reivindicación 26 donde el cáncer es cáncer de pulmón,
cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, gliomas y cáncer de mama
- 25 28. Uso según la reivindicación 27 donde el cáncer de pulmón es cáncer de
pulmón no microcítico.
29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28 donde la muestra
biológica se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, plasma,
30 suero, linfa, lavado broncoalveolar, saliva, orina o fluido ascítico.
30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29 donde la muestra
biológica es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina.

31. Kit que comprende una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23
- 5 32. Kit según la reivindicación 31 que además comprende cebadores.
33. Kit según la reivindicación 32, donde los cebadores son las parejas de cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
- 10 34. Uso *in vitro* del kit según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33 para determinar y/o cuantificar de la metilación del promotor del gen *IGFBP-3* en una muestra biológica de un sujeto.
- 15 35. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 34 para predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento con radioterapia combinada con quimioterapia basada en cisplatino.
36. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 o 35 donde el sujeto 20 padece cáncer.
37. Uso según la reivindicación 36 donde el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, glioma o cáncer de mama
- 25 38. Uso según la reivindicación 37 donde el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón no microcítico.

Figura 1 A



5 Figura 1 B

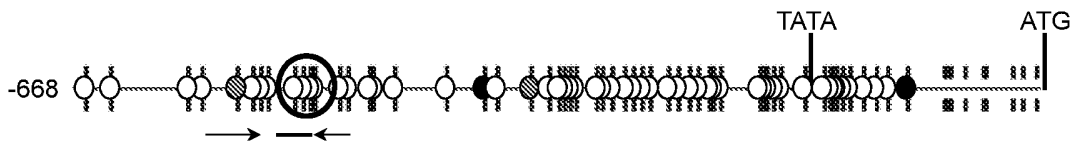


Figura 2 A

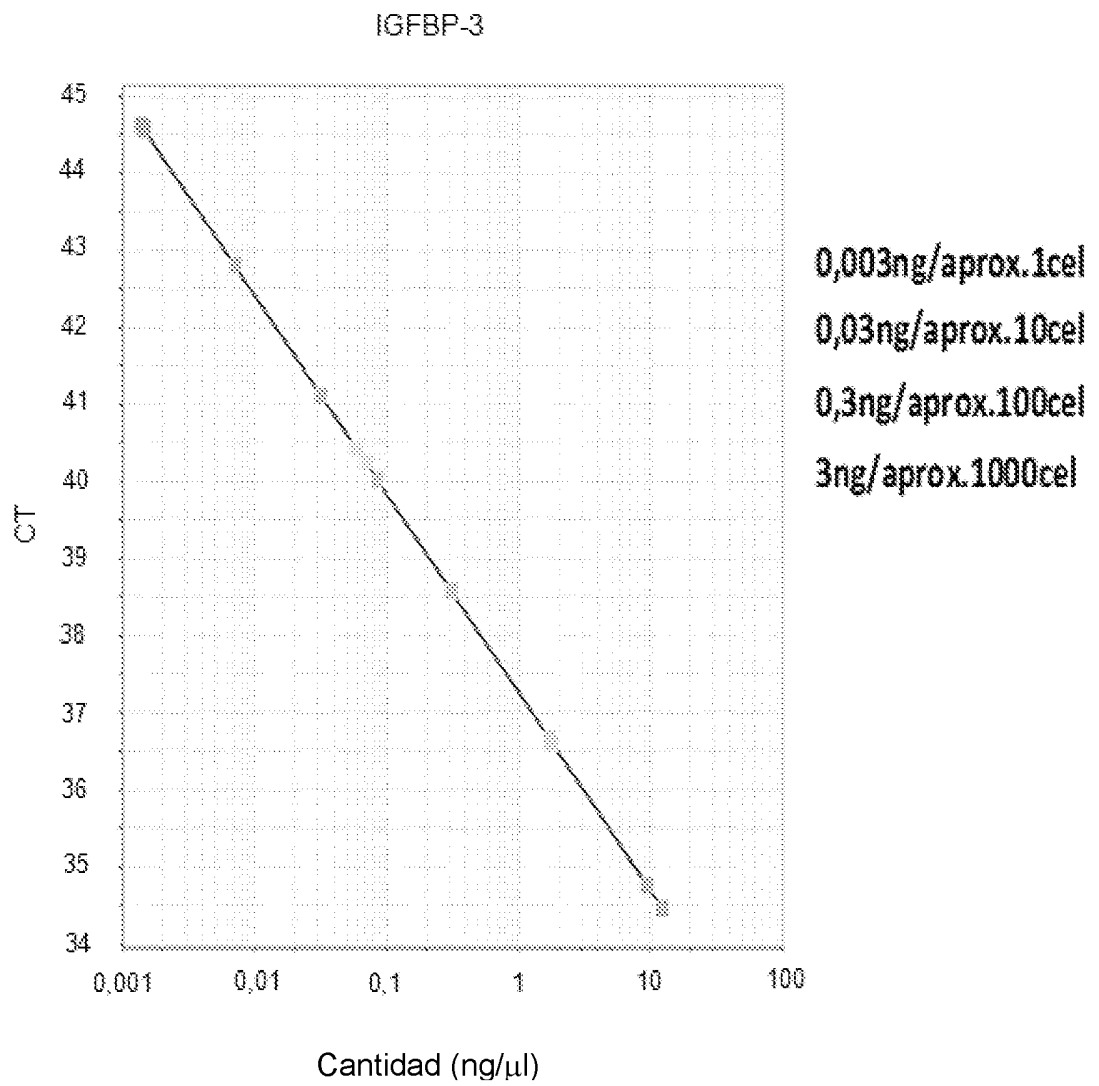
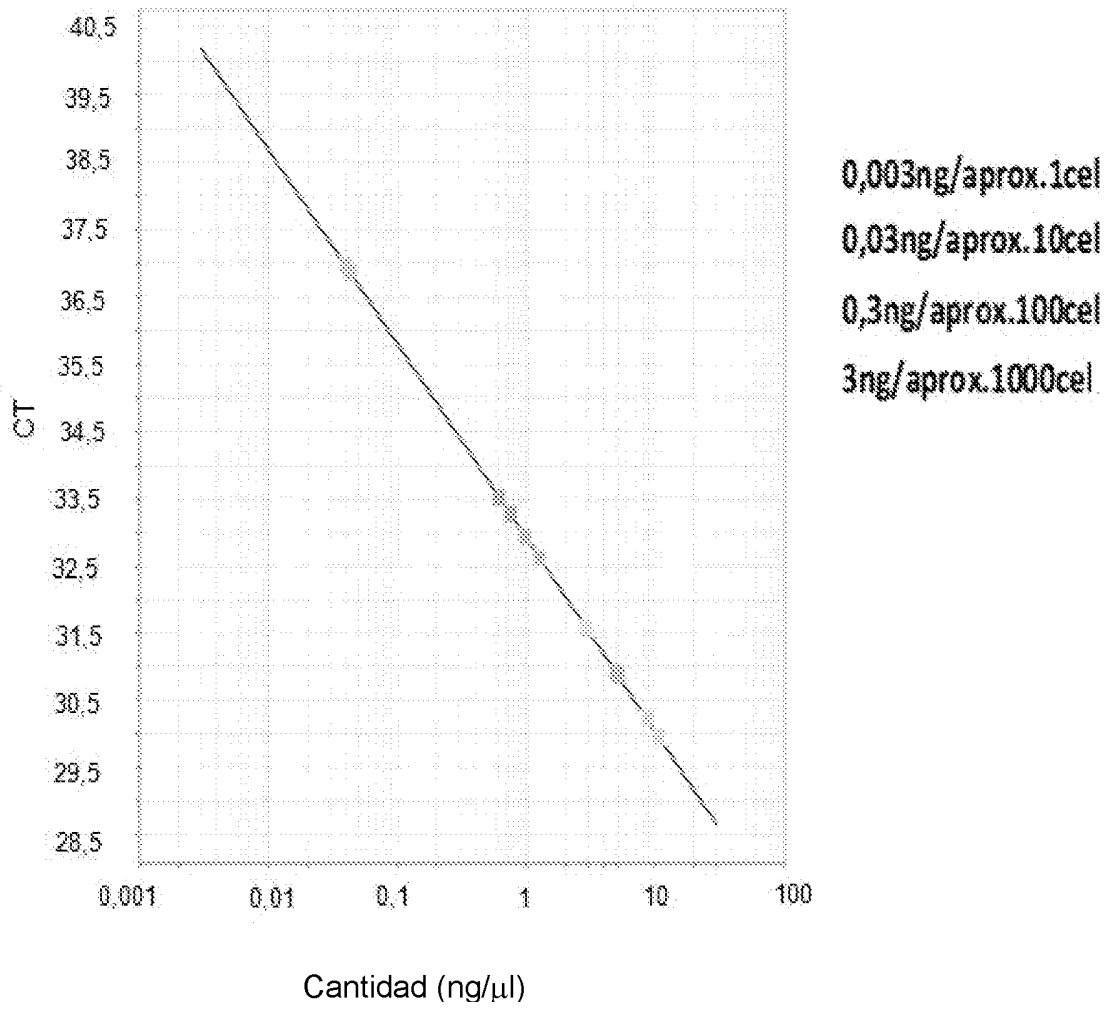


Figura 2 B

β - actina



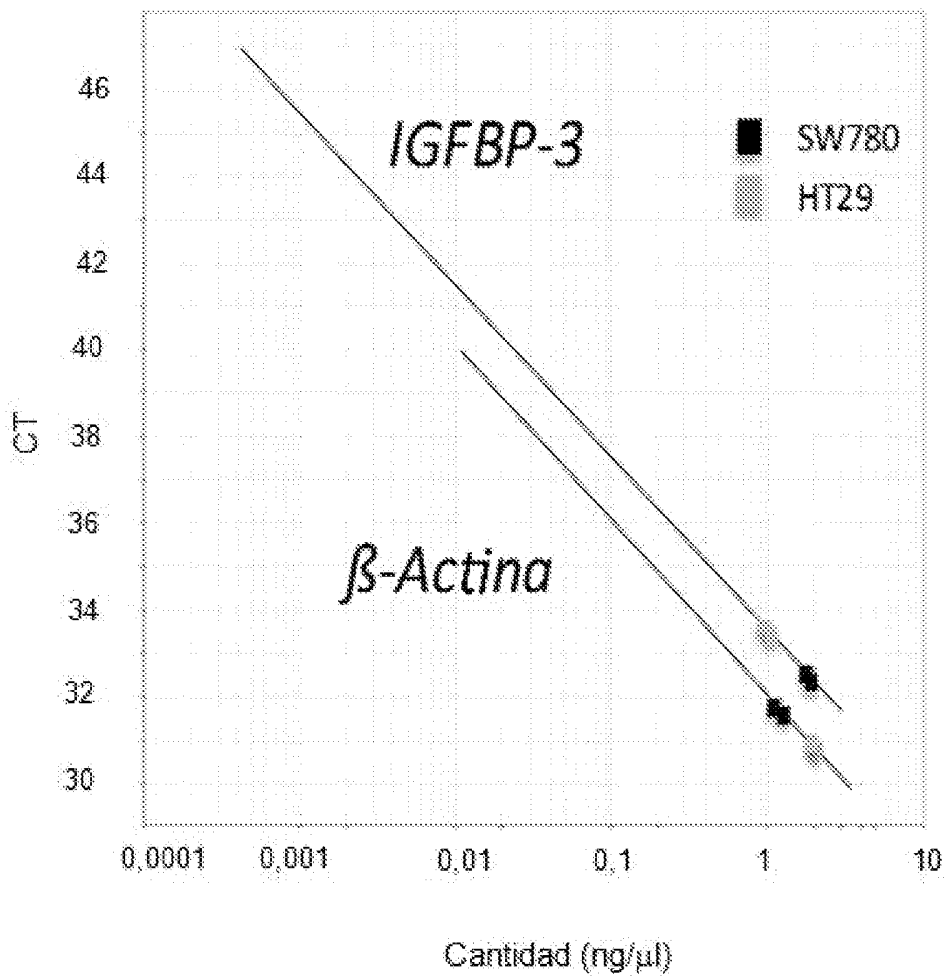
5

10

15

20

Figura 3 A

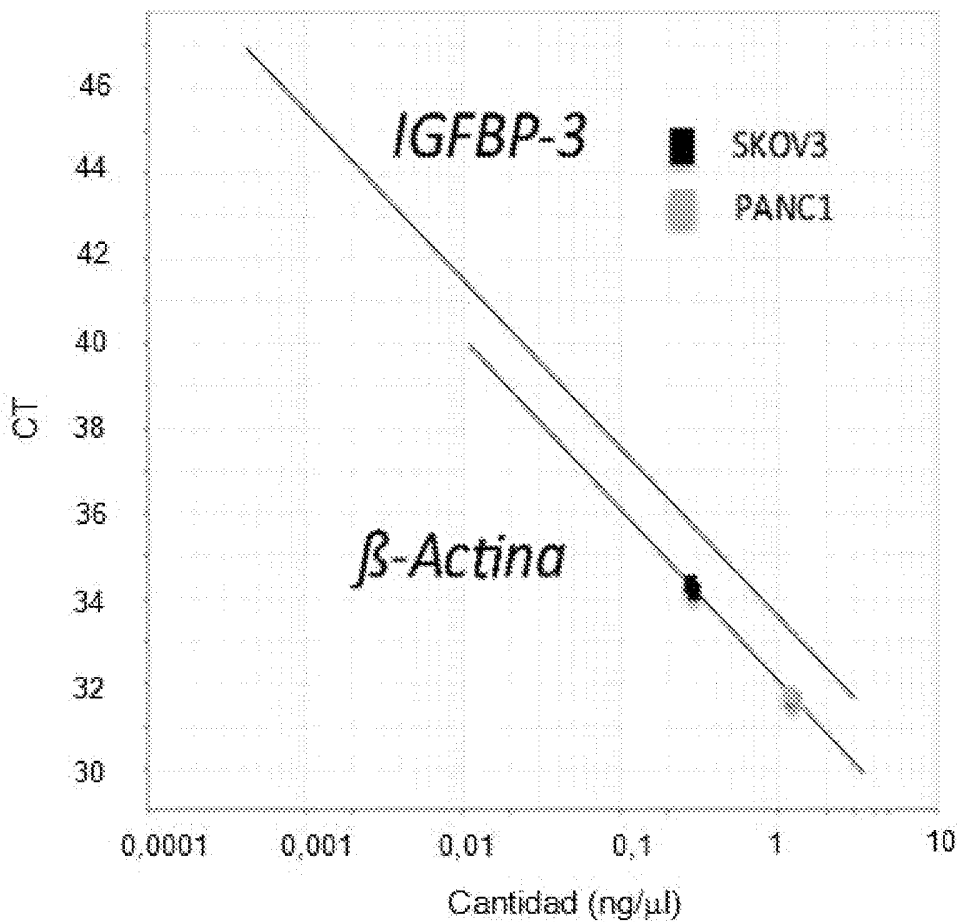


5

10

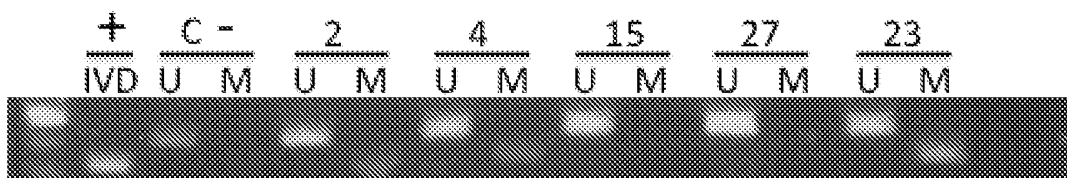
15

Figura 3 B



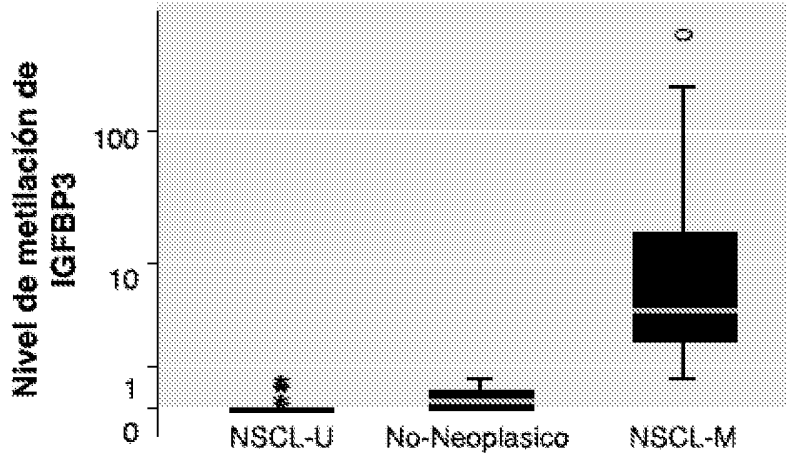
5

Figura 4

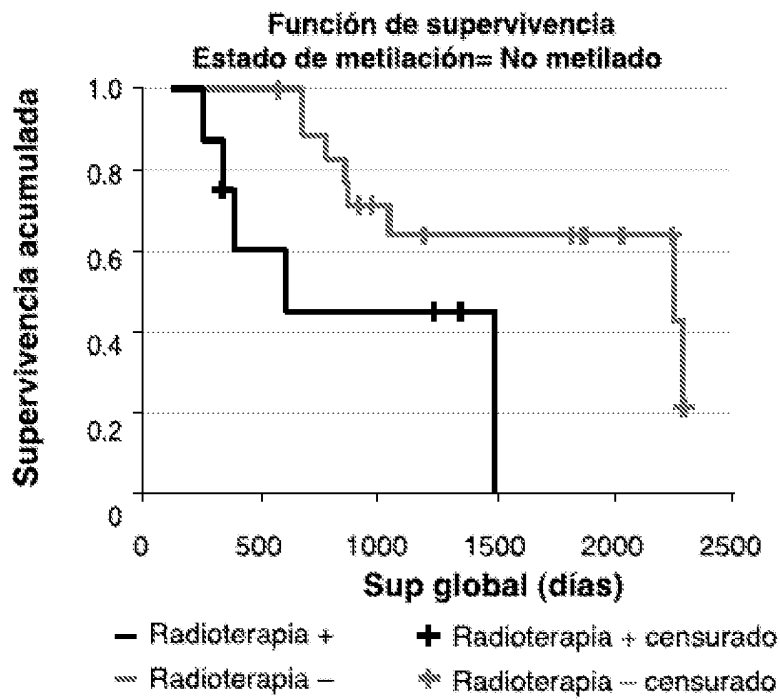


10

Figura 5 A



5 Figura 5 B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2014/070433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IBANEZ DE CACERES, I. et al., 'IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer', ONCOGENE, 2010, Vol. 29, No. 11, Pages 1681-1690, ISSN: 0950-9232(print), ISSN: 1476-5594(electronic), doi: 10.1038/onc.2009.454, Results, Discussion.	1-38
X	CUBBAGE, M.L. et al. 'Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1990, Vol. 265, No. 21, Pages 12642-12649, ISSN: 0021-9258, Results, Figures 2 and 3.	21-38

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
05/09/2014

Date of mailing of the international search report
(12/09/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070433

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHANG, Y.S. et al., 'Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2002, Vol. 8, No. 12, Pages 3669-3675, ISSN: 1078-0432 (print), the whole document.	1-38
A	CHANG, Y.S. et al., 'Clinical significance of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in stage I non-small cell lung cancer', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2002, Vol. 8, No. 12, Pages 3796-3802, ISSN: 1078-0432 (Print), the whole document.	1-38
A	TOMII, K. et al., 'Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers', INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, 2007, Vol. 120, No. 3, Pages 566-573, ISSN: 0020-7136, the whole document.	1-38
A	CURRAN, W.J. et al., 'Sequential vs Concurrent Chemoradiation for Stage III Non-small Cell Lung Cancer: Randomized Phase III Trial RTOG9410', JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2011, Vol. 103, No. 19, Pages 1452-1460, ISSN: 0027-8874(print), ISSN: 1460-2105(electronic), doi: 10.1093/jnci/djr325, the whole document.	1-38
A	BRADLEY, J.D. et al., 'Primary Analysis of the Phase II Component of a Phase I/II Dose Intensification Study Using Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy and Concurrent Chemotherapy for Patients With Inoperable Non-Small-Cell Lung Cancer: RTOG 0117', JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2010, Vol. 28, No.14, Pages 2475-2480, ISSN: 1527-7755 (Electronic), doi: 10.1200/JCO.2009.27.1205, the whole document.	1-38

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070433

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	IBANEZ DE CACERES, I. et al., 'IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer', ONCOGENE, 2010, Vol. 29, No. 11, Páginas 1681-1690, ISSN: 0950-9232(print), ISSN: 1476-5594(electronic), doi: 10.1038/onc.2009.454, Resultados, Discusión.	1-38
X	CUBBAGE, M.L. et al. 'Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity', JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1990, Vol. 265, No. 21, Páginas 12642-12649, ISSN: 0021-9258, Resultados, Figuras 2 y 3.	21-38

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

05/09/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.

12 de septiembre de 2014 (12/09/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado

J. Vizán Arroyo

Nº de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070433

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	<p>CHANG, Y.S. et al., 'Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer', <i>CLINICAL CANCER RESEARCH</i>, 2002, Vol. 8, No. 12, Páginas 3669-3675, ISSN: 1078-0432 (print), todo el documento.</p>	1-38
A	<p>CHANG, Y.S. et al., 'Clinical significance of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in stage I non-small cell lung cancer', <i>CLINICAL CANCER RESEARCH</i>, 2002, Vol. 8, No. 12, Páginas 3796-3802, ISSN: 1078-0432 (Print), todo el documento.</p>	1-38
A	<p>TOMII, K. et al., 'Aberrant promoter methylation of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in human cancers', <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER</i>, 2007, Vol. 120, No. 3, Páginas 566-573, ISSN: 0020-7136, todo el documento.</p>	1-38
A	<p>CURRAN, W.J. et al., 'Sequential vs Concurrent Chemoradiation for Stage III Non-small Cell Lung Cancer: Randomized Phase III Trial RTOG9410', <i>JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE</i>, 2011, Vol. 103, No. 19, Páginas 1452-1460, ISSN: 0027-8874(print), ISSN: 1460-2105(electronic), doi: 10.1093/jnci/djr325, todo el documento.</p>	1-38
A	<p>BRADLEY, J.D. et al., 'Primary Analysis of the Phase II Component of a Phase I/II Dose Intensification Study Using Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy and Concurrent Chemotherapy for Patients With Inoperable Non-Small-Cell Lung Cancer: RTOG 0117', <i>JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY</i>, 2010, Vol. 28, No.14, Páginas 2475-2480, ISSN: 1527-7755 (Electronic), doi: 10.1200/JCO.2009.27.1205, todo el documento.</p>	1-38