

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 117**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2007 E 07823247 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **26.08.2009 EP 2092081**

54 Título: **Métodos y usos que implican anomalías genéticas en el cromosoma 12**

30 Prioridad:

**13.11.2006 FI 20065717**  
**13.11.2006 US 858512 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.02.2013**

73 Titular/es:

**VALIPHARMA (100.0%)**  
**24 Greville Street**  
**LondonEC1N 8SS, GB**

72 Inventor/es:

**KROHN, KAI;**  
**HASSAN, WAEL;**  
**PELTOMÄKI, PÄIVI;**  
**HELLE, MARKKU;**  
**HAHTOLA, SONJA;**  
**KARENKO, LEENA y**  
**RANKI, ANNAMARI**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio**

**ES 2 395 117 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Métodos y usos que implican anomalías genéticas en el cromosoma 12.

**Campo de la invención**

5 [0001] La presente invención se refiere a los campos de la genética y la oncología y proporciona métodos para predecir e identificar tumores de origen epitelial. Específicamente, la presente invención se refiere a un novedoso método para predecir la iniciación del tumor, la progresión del tumor y/ o carcinomas, el método comprendiendo la detección de anomalías genéticas asociadas con tumores de origen epitelial. La presente invención además se refiere a un novedoso método de identificación de un individuo con potencial para desarrollar carcinoma, el método comprendiendo la detección de anomalías genéticas. La presente invención se refiere también a un método de predicción de la progresión de carcinomas y la transformación de los mismos en una variante agresiva, el método comprendiendo la detección de anomalías genéticas, que indican la probabilidad de desarrollar un carcinoma. La presente invención también se refiere a un uso de una región cromosómica específica o un gen o un fragmento del mismo, y / o marcadores genéticos para predecir la iniciación del tumor, progresión tumoral y/o carcinoma. La presente invención también se refiere a un uso de una región cromosómica específica o un gen o un fragmento del mismo en terapia, para el desarrollo de la terapia y para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores de origen epitelial.

**Antecedentes de la invención**

20 [0002] El cáncer es una enfermedad compleja en la que se han acumulado varias alteraciones genéticas y epigenéticas. Se necesita un número variable de cambios genéticos antes de la aparición de un tumor desarrollado somáticamente. Los datos disponibles indican que el desarrollo de tumores sólidos depende de la combinación de deleciones y amplificaciones de múltiples segmentos del cromosoma (Mertens et al. Cancer Res 57:2765-2780, 1997; Mitelman et al. Nature Genet, 15:417-474, 1997). Más del 90% de todas las neoplasias humanas deriva del epitelio. Así, las células epiteliales desempeñan un papel importante en las afecciones fisiológicas y fisiopatológicas. Los carcinomas son tumores malignos derivados de las células epiteliales. Los carcinomas más comunes incluyen las formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal.

30 [0003] El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más frecuente en todo el mundo con una estimación de un millón de nuevos casos anuales (Parkin et al. CA Cancer J Clin 55: 74-108, 2005). El riesgo promedio a lo largo de la vida en los países industrializados es aproximadamente 5%, y casi la mitad de los afectados morirán de su enfermedad (Burt, Gastroenterology 119: 837-853, 2000). El cáncer colorrectal se desarrolla por medio de una lesión precursora benigna, un pólipo, y puede evitarse mediante polipectomía. Se estima que un 30% de la población tiene pólipos en el colon, y la incidencia de los pólipos aumenta con la edad. Así, las colonoscopias de cribado en el promedio de individuos asintomáticos han revelado pólipos neoplásicos (adenomatosos) en el 12% de los individuos de 40-49 años de edad (Imperiale TF et al. NEJM 346: 1781-1785, 2002), y en el 58% entre los individuos de 50-59 años de edad (Mehran A et al. Surg Endosc 17: 1974-1977, 2003). Algunos trastornos hereditarios, que representan un 5-10% de la carga total del cáncer colorrectal, se asocian con un aumento del número de pólipos (poliposis adenomatosa familiar, FAP) o una elevada tendencia a la progresión maligna (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, HNPCC) (Lynch and de la Chapelle, N Engl J Med 348: 919-932, 2003).

40 [0004] La supervivencia está estrechamente relacionada con el estadio al momento del diagnóstico, incluso en pacientes que ya han desarrollado la enfermedad maligna: más del 90% de los pacientes con cáncer local están vivos después de 5 años, frente a menos del 10% de aquéllos con enfermedad metastásica (Burt, Gastroenterology 119: 837-853, 2000). Los carcinomas colorrectales son notoriamente resistentes tanto a la quimioterapia como a la radioterapia y la mayoría de los pacientes para quienes la cirugía por sí sola no es curativa están condenados a morir de su enfermedad (Globcan, International Agency for Research on Cancer. Disponible en <http://www-dep.iarc.fr/>, 2002). Por lo tanto, es vital poder identificar a los individuos con mayor riesgo tan pronto como sea posible para una eficiente prevención del cáncer o tratamiento curativo.

50 [0005] El desarrollo del cáncer colorrectal a través de precursores benignos, junto con la acumulación de cambios genéticos es uno de los ejemplos más conocidos de la carcinogénesis de múltiples pasos (Chung DC, Gastroenterology 119: 854-865, 2000, and below). Esta naturaleza evolutiva de múltiples pasos del cáncer colorrectal ofrece excelentes oportunidades para la detección precoz y prevención del cáncer. El cáncer colorrectal surge como resultado de la acumulación gradual de mutaciones a nivel de nucleótido y / o a nivel cromosómico bruto. La gran mayoría de los de los cánceres colorrectales muestran uno de los dos fenotipos principales de inestabilidad genómica, inestabilidad en microsátélites (MSI) o inestabilidad cromosómica (CIN) (Abdel-Rahman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 2538-2543, 2001). La literatura actual incluye una multitud de biomarcadores de uso potencial en la evaluación del riesgo de cáncer colorrectal o detección precoz de este tipo de cáncer, sin embargo, en su mayoría falta la validación clínica (Umar and Srivastava, Dis Markers 20: 87-96, 2004).

- 5 [0006] En la actualidad, la histología sirve como predictor principal, con multiplicidad de adenomas, displasia de alto grado, con características vellosas y de gran tamaño (más de 1 cm), del mayor riesgo de cáncer (Winawer et al Gastroenterology 130: 1872-1885, 2006). Por lo tanto, los predictores de patología avanzada podrían ser útiles, tanto para adenomas como para cáncer, para poder asignar una categoría de riesgo apropiada para cada paciente. Los biomarcadores que podrían servir como factores predictivos de una tendencia al progreso del cáncer serían muy bienvenidos.
- 10 [0007] El cáncer de pulmón es la causa principal de muertes relacionadas con cáncer en todo el mundo, con aproximadamente 1,2 millones de muertes anualmente (Ferlay et al 2001, GLOBOCAN2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0 IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press). Más del 95 por ciento de los cánceres de pulmón están relacionados con fumar y, por tanto, los aductos de ADN tienen un papel clave en la carcinogénesis.
- 15 [0008] Los pacientes que sufren de cáncer de pulmón suelen tener mal pronóstico, las tasas de supervivencia a cinco años oscilan desde aproximadamente 50% al 10% (Hasleton PS, Respiratory system 1.0 in Cancer Handbook. <http://www.cancerhandbook.net>, London: Nature Publishing Group, 2001). Sin embargo, cuando el cáncer de pulmón se detecta en una etapa temprana y la cirugía es posible, las tasas de supervivencia a cinco años las tasas de supervivencia pueden alcanzar el 85%. Así, serían valiosos factores predictivos de la iniciación y / o progresión del tumor, a fin de permitir la prevención o terapia eficaz del cáncer.
- 20 [0009] Las neoplasias malignas del pulmón se puede dividir según las características histológicas en cánceres de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cánceres de pulmón de células no pequeñas (CPNM), este último constituido principalmente por carcinoma epidermoide y adenocarcinoma. Estudios recientes han demostrado diferentes antecedentes genéticos entre estos tipos de cáncer (Kaminski et al. Chest 125 (5 Suppl): 111 S-5S, 2004, Fong et al. Thorax 58: 892-900, 2003). Sin embargo, se supone que son necesarias más 20 anomalías genéticas o epigenéticas antes de un cáncer de pulmón clínicamente evidente. Normalmente, en los carcinomas de pulmón, pueden observarse múltiples aberraciones cromosómicas que indican una inestabilidad genómica. Nuevos marcadores tumorales podrían explicar la patogénesis del cáncer y por lo tanto, mejorar el efecto de las terapias y la supervivencia en el cáncer de pulmón.
- 25 [0010] Los diagnósticos adolecen de marcadores individuales o un panel de marcadores para la detección general de cáncer. Por ejemplo, el antígeno específico de la próstata (PSA) es secretado por las células de la glándula prostática y niveles elevados de PSA se utilizan como marcador de tumores de próstata.
- 30 [0011] Otros marcadores para tumores epiteliales están disponibles, pero su uso se ve obstaculizado por su falta de especificidad: Estos marcadores suelen estar también elevados en otras condiciones de malignidad, como en las lesiones inflamatorias. Estos marcadores, que han sido utilizados en clínica, pero que no cumplen el requisito de especificidad y / o sensibilidad son, por ejemplo, los siguientes: antígeno derivado de tumor colon-específico (STT), antígeno carcinoembrionario (CEA), alfa-fetoproteína (AFP), beta-glicoproteína 1 específica del embarazo (SP1), lactógeno placentario humano (HPL), beta gonadotropina coriónica humana (Beta-HCG), transferrina (TF) y ferritina (FE).
- 35 [0012] Es de máxima importancia desarrollar nuevos métodos, que permitan la identificación temprana de los pacientes con un mayor riesgo para desarrollar un carcinoma agresivo para posibilitar una prevención eficaz del cáncer. También es necesario un método clínicamente útil que podría servir como predictor de una tendencia al progreso del carcinoma. Asimismo, son muy necesarios medios adicionales para el desarrollo de nuevas directrices para la iniciación y el seguimiento del tratamiento del cáncer.
- 40 [0013] Se han identificado aberraciones cromosómicas 12q21, específicamente aberraciones del gen Neuron Navigator 3 (NAV3), en neuroblastomas y linfomas cutáneos de células T (CTCL). Cuatro de los 10 neuroblastomas principales estudiados por Coy et al mostraron una expresión reducida o nula de NAV3, y tres de ellos tenían deleciones homocigóticas de ambos alelos (Coy JF et al. Gene 290: 73-94, 2002). En CTCL, una deleción o una translocación del gen NAV3 se asoció con una mutación puntual en el alelo restante sólo en uno de los 7 pacientes estudiados (Karenko L et al. Cancer Res 65:8101-81 10, 2005 y EP1476567 A1). En carcinomas pancreáticos, las aberraciones cromosómicas 12q21 fueron identificadas por análisis de microsatélites. La pérdida de heterocigosidad (LOH) fue detectada con los marcadores D12S1684 y D12S1708, que bordean una región cromosómica que comprende el gen NAV3 (Kimura M et al. Cancer Res 58:2456-60, 1998). Sin embargo, la región cromosómica descrita en el artículo por Kimura et al. es grande y no se observó que la región específica ni el gen NAV3 estuvieran vinculados con el carcinoma pancreático. Por el contrario, esta aplicación describe anomalías cromosómicas que son específicas de los tumores de origen epitelial, en la región cromosómica específica.
- 45 [0014] Se desean nuevos biomarcadores para proporcionar un diagnóstico más eficaz y precoz de tumores potencialmente agresivos, así como para identificar tumores sensibles a las terapias dirigidas. La presente invención proporciona una solución para predecir o identificar la progresión de un tumor y un carcinoma. La presente invención también describe una herramienta para evaluar la agresividad clínica de los tumores epiteliales y la supervivencia de
- 50
- 55

los pacientes. Además, la invención proporciona un nuevo objetivo terapéutico para la prevención o terapia del carcinoma.

**Breve descripción de la invención**

5 [0015] El objeto de la invención es por lo tanto proporcionar nuevos métodos y medios para el diagnóstico, estadificación y seguimiento de los pacientes con cáncer, métodos y medios tales que permitan un diagnóstico precoz de la enfermedad.

[0016] Otro objeto de la invención es proporcionar nuevos métodos y medios para predecir la iniciación del tumor, la progresión del tumor y / o carcinoma.

10 [0017] Otro objeto de la invención es proporcionar nuevos métodos y medios para la identificación de individuos con un mayor riesgo de desarrollar carcinomas, métodos y medios tales que siendo específicos y fiables, permitan la identificación tan pronto como sea posible.

[0018] Aún otro objeto de la invención es proporcionar nuevos métodos y medios para la predicción de la progresión de los carcinomas y la transformación a una forma agresiva, métodos y medios tales que permitan una oportuna intervención terapéutica, que pueda salvar la vida.

15 [0019] Aún otro objeto de la invención es proporcionar nuevos métodos y medios para el desarrollo de nuevas directrices para la iniciación y el seguimiento de las intervenciones terapéuticas, así como para el desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento para los cánceres, métodos y medios tales que prolonguen la fase de remisión de la enfermedad e introduzcan nuevas posibilidades para la lucha contra la enfermedad y para la recuperación del paciente.

20 [0020] Aún otro objeto de la invención es proporcionar nuevos biomarcadores útiles en la detección precoz del cáncer así como en la evaluación del riesgo de cáncer.

25 [0021] La presente invención se refiere a un método novedoso para la predicción de la iniciación del tumor, la progresión del tumor y / o carcinomas, caracterizado por la detección de la presencia o la ausencia de anomalías genéticas en 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, estando asociada la presencia de dichas anomalías genéticas con tumores de origen epitelial, en una muestra biológica. En otras palabras, las anomalías genéticas indican la presencia de tumores epiteliales o una iniciación o progresión de tumores de origen epitelial y / o carcinoma.

30 [0022] La presente invención además se refiere a un nuevo método para la identificación de un individuo con potencial para desarrollar un carcinoma de origen epitelial, el método comprendiendo la detección de anomalías genéticas en 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, estando asociada la presencia de dichas anomalías genéticas con tumores de origen epitelial. Es decir, las anomalías genéticas indican tumores de origen epitelial con potencial para desarrollar un carcinoma.

35 [0023] La presente invención se refiere además a un método novedoso de predecir la progresión de los carcinomas de origen epitelial y / o la transformación de los mismos a una variante agresiva, caracterizado por la detección de anomalías genéticas en 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, donde las anomalías indican la probabilidad de desarrollar un carcinoma.

[0024] La presente invención se refiere también al uso del gen NAV3 o un fragmento del mismo para predecir la iniciación de un tumor, progresión del tumor y / o carcinoma, anomalías genéticas en el gen NAV3 que indican tumores de origen epitelial.

40 [0025] La presente invención se refiere también al uso de marcadores genéticos en 12q21.2, para predecir la iniciación del tumor, la progresión del tumor y / o carcinoma, caracterizado por la detección de la presencia o ausencia de anomalías genéticas, dichas anomalías genéticas en 12q21.2 en el gen NAV3 o en un fragmento del mismo indicando tumores de origen epitelial. Dichas anomalías genéticas se asocian con tumores de origen epitelial y / o carcinoma.

45 [0026] La presente invención también describe el uso de una región cromosómica específica 12q21.2, específicamente el gen NAV3, un fragmento del mismo o un producto genético del mismo en terapia, para el desarrollo de la terapia o para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores de origen epitelial.

**Breve descripción de los dibujos**

50 [0027] En lo que sigue, se describe la invención con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra una LOH observada en el microsatélite D12S1708 del cromosoma 12 en adenoma (medio) y carcinoma (inferior) en comparación con su correspondiente tejido normal (arriba).

La figura 2 muestra una MSI observada en el microsatélite D12S1708 del cromosoma 12 en el carcinoma (inferior) en comparación con su correspondiente tejido normal (arriba). El adenoma (centro) es MSS.

5 La Figura 3 muestra la extensión del iniciador del nucleótido-simple, (SnuPE) mostrando LOH en un carcinoma (inferior) en comparación con su correspondiente normal (arriba).

La figura 4 muestra un cariotipo de las verdaderas células malignas de carcinoma de pulmón de un paciente con LCCT y el SCLC.

10 La Figura 5a muestra el resultado de NAV3 específico FISH con metástasis en cáncer de mama. Las barras negras indican la cantidad de poliploidía en las células estudiadas y las barras grises indican la cantidad de células con NAV3 suprimido. Los resultados se muestran como porcentaje del recuento celular total.

La Figura 5b muestra células típicas de metástasis del cáncer de mama con NAV3 suprimido. Las señales verdes indican los centrómeros y las señales rojas copias NAV3.

15 La Figura 6 muestra la comparación de los resultados de NAV3FISH de muestras de colon normal y muestras de un cáncer de colon. El análisis NAV3FISH incluía tanto muestras de colon normal como muestras de CRC del mismo paciente (n = 36). Se muestran los valores medios (%) de colon normal (barras grises) y cáncer de colon (barras negras).

#### Descripción detallada de la invención

20 [0028] Se ha encontrado que las anomalías en 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2, están asociadas con tumores de origen epitelial.

[0029] Las aberraciones cromosómicas en 12q21.1-q21.31, específicamente las aberraciones en 12q21.2, más específicamente las aberraciones en el gen NAV3, se ha encontrado que tienen un papel en el desarrollo de tumores de origen epitelial.

25 [0030] La presente invención se basa en un método para la detección de anomalías genéticas en 12q21.1-q21.31, específicamente en 12q21.2, asociadas con los tumores de origen epitelial, excluyendo el carcinoma de páncreas.

[0031] En concreto, las anomalías genéticas en la posición cromosómica 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2, afectan al gen NAV3 o un fragmento del mismo.

[0032] Específicamente, las anomalías genéticas se detectan en el gen NAV3 o un fragmento del mismo.

30 [0033] En una realización preferida del método de la invención, el tumor de origen epitelial es un adenoma y / o un carcinoma.

35 [0034] En otra realización preferida del método de la invención, la localización del tumor de origen epitelial es el colon, recto, pulmón, vejiga urinaria, mama, células escamosas o basales. En otras palabras, el tumor epitelial es un tumor de colon, un tumor de recto, un tumor de pulmón, un tumor de vejiga, un tumor de mama, un tumor de células escamosas o un tumor de células basales. En el intestino grueso, los tumores colorrectales pueden ser o adenocarcinomas o adenomas o pólipos premalignos, en la vejiga urinaria el tumor puede ser pólipos del epitelio de transición con pobre diferenciación o carcinomas manifiestos de células de transición, los tumores de mama pueden ser o carcinomas ductales o carcinomas acinares y en la piel, los tumores pueden ser tanto basaliomas o carcinomas epidermoides (también llamado carcinoma de células escamosas o carcinoma espinocelular). En el pulmón, el tumor puede ser o bien carcinoma epidermoide o adenocarcinomas.

40 [0035] En una realización adicional preferida del método de la invención, las anomalías genéticas son determinadas por la pérdida de heterocigosidad (LOH) del gen NAV3 o un fragmento del mismo, donde LOH de NAV3 indica progresión del tumor.

[0036] En una realización adicional preferida del método de la invención, las anomalías genéticas del gen NAV3 se determinan en células haploides, diploides y / o poliploides.

45 [0037] En una realización adicional preferida del método de la invención, las células tumorales son de microsatélite estable (SMS) o de microsatélite inestable (MSI).

[0038] En una realización adicional preferida del método de la invención, el tumor de origen epitelial es distinto al carcinoma de páncreas.

- [0039] La presente invención también se basa en el uso de la región cromosómica 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2, el gen NAV3 o un fragmento del mismo, y / o marcadores en 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2, asociados con tumores de origen epitelial.
- 5 [0040] En una realización preferida, los marcadores en 12q21.1-q21.31 incluyen D12S1684, D12S326, D12S1708 y / o rs1852464.
- [0041] En una realización preferida, los marcadores en 12q21.2 incluyen D12S326 y / o rs1852464.
- [0042] Como se utiliza aquí, la expresión "anomalía genética" se refiere a la presencia de una translocación, delección, amplificación, inversión u otro defecto en 12q21.1-q21.31, específicamente en 12q21.2.
- 10 [0043] Como se utiliza aquí, la expresión "delección" se refiere a la ausencia de un nucleótido o nucleótidos y / o un exón o exones en la secuencia del gen cuya ausencia afecta negativamente a la función del gen. La expresión también se refiere a la ausencia del fragmento del gen, un gen o el fragmento cromosómico que contiene el gen.
- [0044] Como se utiliza aquí, la expresión "otro defecto" se refiere a cualquier alteración genética, como una sustitución, una adición, polimorfismo, inserción, inversión, etc., que está asociada con tumores de origen epitelial.
- 15 [0045] Como se utiliza aquí, la expresión "pérdida de heterocigosidad (LOH)" se refiere a la pérdida de la contribución de un solo progenitor a una parte del genoma de la célula. LOH puede considerarse como un suceso para desvelar un alelo mutante de un gen que puede desempeñar un papel en la supresión de la formación del tumor. Así, LOH es un marcador importante para la iniciación o progresión del tumor.
- [0046] Como se utiliza aquí, la expresión "BLOH" se refiere al límite de LOH, lo que significa que uno de los alelos de la muestra de tumor tiene una reducción de señal de 25% - 39% en comparación con su correspondiente normal.
- 20 [0047] Como se utiliza aquí, la expresión "translocación" se refiere a la transferencia de regiones cromosómicas entre cromosomas no homólogos.
- [0048] Como se utiliza aquí, la expresión "amplificación" se refiere a la ganancia de material genético tal como un fragmento del gen, un gen o el fragmento cromosómico que contiene el gen.
- 25 [0049] Como se utiliza aquí, la expresión "tumor" se refiere a una masa anormal de tejido debida a un exceso anormal de divisiones celulares o a la falta de muerte celular normal. Los tumores pueden ser benignos o malignos, es decir, no cancerosos o cancerosos. Los tumores incluyen adenomas, carcinomas o pólipos.
- [0050] Como se utiliza aquí, la expresión "adenoma" se refiere a un tumor no canceroso.
- [0051] Como se utiliza aquí, la expresión "carcinoma" se refiere a un cáncer de origen epitelial.
- 30 [0052] Como se utiliza aquí, la expresión "epitelial" se refiere a las células que recubren las superficies internas y externas del cuerpo.
- [0053] Como se utiliza aquí, la expresión " tumores de origen epitelial" se refiere a tumores que se originan a partir de células epiteliales. Los tumores de origen epitelial incluyen tumores de mama, colorrectal, pulmón, vejiga urinaria, de células escamosas, de células basales, de próstata, gástrico, de esófago y de boca / lengua.
- 35 [0054] Los tumores epiteliales se originan a partir de epitelio, conjunto específico de células que cubren los órganos y las superficies del cuerpo. El epitelio puede ser simple, tal como el epitelio de una capa de células que cubre parte del tracto respiratorio, conductos y conductillos de las glándulas mamarias o de intestino, o puede ser estratificado, compuesto de varias capas de células, tal como el que se encuentra en la capa superior de la piel o en la vejiga urinaria. El epitelio de la piel es queratinizante, que significa que mientras las células basales de la epidermis, que cubren la piel son redondas y proliferan, las células superiores están aplanadas, no se dividen y su citoplasma está
- 40 lleno de fibras de queratina. El epitelio urinario, por otro lado, no es queratinizante pero incluso en este caso, las células localizadas basalmente son redondas, mientras que las células situadas más cerca de la superficie están aplanadas y por tanto, este tipo de epitelio se denomina de transición.
- [0055] Como se utiliza aquí, la expresión " indicando tumores de origen epitelial " se refiere a que la presencia o alta probabilidad o posibilidad de tumores epiteliales se ha mostrado o descrito o probado o evidenciado.
- 45 [0056] Como se utiliza aquí, la expresión "variante agresiva" se refiere a un cáncer, que crece rápidamente y, posiblemente, metastatiza.
- [0057] Como se utilizan aquí, las expresiones "fragmento" o "fragmento funcional" se refieren a una parte del gen NAV3, que es detectable por los métodos de la invención tal como análisis de LOH o métodos FISH.

[0058] Como se utiliza aquí, la expresión "producto de gen" se refiere a un ARNm, proteína o cualquier producto conseguido directa o indirectamente a partir del gen.

5 [0059] El gen Neuron navigator 3 (NAV3 o POMFIL1) es un miembro de una familia de genes humanos recientemente identificada, que muestra homología con unc-53, un gen de guía de axones del *Caenorhabditis elegans* (Maes et al. Genomics 80: 21-30, 2002). También comparte secuencias homólogas con RAINB1 humano (inducible por ácido retinoico en células del neuroblastoma) un homólogo mamífero de unc-53 (Merrill et al. PNAS 99: 3422-3427, 2002). En la predicción de la estructura NAV3 tiene dominios tipo calponin y sitios de unión SH3 sugerentes de una función en la señalización celular. NAV3 consta de 39 exones y su expresión, basada en la detección de ARNm, está en gran medida restringida al tejido cerebral (Maes et al. Genomics 80: 21-30, 2002). Se ha demostrado que NAV3 produce transcripciones de proteínas de diferentes longitudes y puede estar sujeto a corte y empalme alternativo específico de tejidos. Estructuralmente NAV3 es una helicasa y exonucleasa, que recuerda a las proteínas de los síndromes de Werner y Bloom con la función de mantener la estabilidad de los cromosomas (Coy JF et al. Gene 290: 73-94, 2002, Maes et al. Genomics 80: 21-30, 2002). Subcelularmente, se ha informado que NAV3 está ubicado en complejos pre nucleares (Coy JF et al. Gene 290: 73-94, 2002) y podría tener un papel en el transporte nuclear, formación de cinetóforo y el control del ciclo celular (Fahrenkrog B and Aebi U, Nat Rev Mol Cell Biol 4: 757-66, 2003). Por lo tanto, NAV3 podría ser un supresor tumoral haploinsuficiente no clásico (Sherr CJ, Cell 116: 235-46, 2004).

20 [0060] En la presente invención, las anomalías genéticas en 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2, fueron estudiadas por análisis de LOH para adenomas colorrectales, carcinomas, cánceres de pulmón y cáncer de vejiga urinaria. Se utilizó también hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para tumores de colon, cáncer de mama, carcinoma de células basales (BCC) y carcinoma de células escamosas (SCC), e hibridación genómica comparada (CGH) para cánceres de pulmón con el fin de escrutar la posición cromosómica 12q21.1-q21.31, específicamente 12q21.2.

25 [0061] Todos los marcadores microsatélites (D12S1684, D12S326, D12S1708), así como el marcador SNP (el intragénico NAV3 rs 1852464) mostraron LOH en 12q21.1-q21.31 en los adenomas y carcinomas de colo - recto. En las muestras de cáncer de vejiga urinaria, se detectó al menos LOH límite con estos cuatro marcadores. Los marcadores microsatélites también mostraron LOH en cánceres de pulmón. Además, FISH reveló pérdida de 12q21 en tumores de colon y tanto pérdida como ganancia de 12q21 en cánceres de mama, carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas. CGH reveló pérdida de 12q21 en un cáncer de pulmón. Así, la pérdida o ganancia de NAV3 aparece como un marcador de tumores originados en los epitelios.

30 [0062] Además, adenomas y carcinomas colorrectales originados en el mismo paciente mostraron NAV3 LOH sugiriendo que los pacientes con adenoma desarrollarán carcinomas a través de NAV3 LOH. Se observó pobre diferenciación en un adenoma con NAV3 LOH y el tamaño de adenomas NAV3LOH tendía a ser mayores que la de aquéllos sin LOH.

35 [0063] Hemos observado ahora que las anomalías cromosómicas, encontradas en tumores epiteliales, de hecho se producen en tumores que se originan en todos los diferentes tipos de epitelio. Así, los basaliomas (también llamado carcinoma basocelular o carcinomas de células basales) están formados por células que normalmente se ubican en la parte más basal de la epidermis. Por otro lado, el carcinoma de células escamosas (también llamado carcinoma escamocelular o carcinoma espinocelular), se forma a partir de las células situadas más distalmente y este tumor a menudo muestra queratinización, un rasgo característico de las células queratinizadas. Los carcinomas de mama y carcinomas colorrectales son ejemplos de tumores malignos derivados del epitelio simple, teniendo normalmente solamente una capa de células, pero incluso en este caso, el epitelio benigno original contiene tipos de células diferenciadas, tales como las células exocrinas de la glándula mamaria, que secretan ya sea leche o mucosidad, o células calciformes secretoras de moco en el epitelio intestinal.

40 [0064] Los tumores epiteliales pueden ser benignos, premalignos o manifiestamente malignos. Observamos la anomalía cromosómica que se describe con más detalle en esta solicitud principalmente en tumores malignos, carcinomas, pero también en algunas de las condiciones premalignas, tales como grandes adenomas de colon o recto.

45 [0065] Debido a que las anomalías genéticas se asociaron con tumores de origen epitelial, la presencia de estas anomalías indican la iniciación, progresión y / o presencia de tumores de origen epitelial o al desarrollo, progresión y / o presencia de carcinomas. Por lo tanto, es posible diagnosticar o identificar a los pacientes que tienen tumores de origen epitelial o carcinoma mediante la detección de la presencia de dichas aberraciones en una muestra biológica. También es posible diagnosticar o identificar a los pacientes cuyos tumores tienen probabilidad de progresar o desarrollarse o transformarse a una variante agresiva detectando la presencia de dichas aberraciones. Las muestras biológicas de los pacientes o los pacientes sospechosos pueden examinarse para detectar la presencia de dichas anomalías genéticas.

[0066] De acuerdo con el método de la presente invención, la presencia o ausencia de anomalías genéticas puede ser detectada a partir de una muestra biológica por cualquier método de detección conocido adecuado para la detección de translocaciones, deleciones, inserciones, etc. Tales métodos son fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica e incluyen hibridaciones por fluorescencia in situ, tales como hibridaciones por fluorescencia multi-color in situ, hibridación multi-flúor in situ (MFISH), cariotipo espectral (SKY), marcado combinado de proporción binaria (COBRA), cariotipo de cambio de color (CCK). En la hibridación genómica comparativa (CGH) los cambios genéticos se clasifican como ganancias y pérdidas de ADN. CGH revela un patrón característico que incluye aberraciones en niveles cromosómicos y subcromosómicos. Las técnicas convencionales de bandas G también pueden utilizarse en casos donde la detección grosera de ganancias, pérdidas o translocaciones es considerada como suficiente. Los métodos preferibles son los que son adecuados para su uso en laboratorios clínicos.

[0067] Según una realización preferida de la presente invención, que aprovecha la identificación del gen NAV3 en los tumores de origen epitelial, la presencia o ausencia del gen NAV3 o un equivalente o un fragmento del mismo se puede detectar a partir de una muestra biológica por cualquier método de detección conocido adecuado para detectar una expresión génica (o número de copia), es decir, métodos basados en la detección del número de copias del gen (o ADN) y / o los basados en la detección de los productos de expresión genética (ARNm o proteína). Dichos métodos son fácilmente reconocidos por los expertos en la técnica e incluyen métodos convencionales de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), RT-PCR, hibridaciones in situ, como FISH, hibridación in situ de ARNm, análisis Northern, análisis Southern y Western, inmunohistoquímica, y otros inmunoensayos, tales como ELISA. Los métodos preferibles son los que son adecuados para su uso en laboratorios clínicos de rutina.

[0068] Según otra realización preferida de la presente invención, que aprovecha el análisis LOH para la detección de anomalías del gen NAV3, puede detectarse la deleción, conversión génica, pérdida de recombinación mitótica y cromosómica. LOH en los cánceres se puede identificar por la presencia de heterocigosidad en un locus genético en la línea germinal de ADN y la ausencia de heterocigosidad en el mismo locus en las células tumorales.

[0069] Según otra realización preferida de la presente invención, que aprovecha los marcadores adecuados para la detección de anomalías del gen NAV3, los marcadores incluyen cualquier marcador biológico, como marcadores de microsátélites, marcadores SNP, cualquier sonda, cebador o anticuerpo asociado con el gen NAV3. Existen numerosos métodos adecuados para el análisis de ácidos nucleicos para detectar la presencia de variaciones específicas de secuencia tales como polimorfismos, SNP, inserciones o deleciones. Las variantes alélicas pueden ser discriminadas por ejemplo por métodos enzimáticos, métodos electroforéticos y métodos físicos. Estos métodos incluyen por ejemplo polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP), análisis heterodúplex, análisis de fragmentos, secuenciación del ADN, minisequenciación, métodos de extensión de cebador, microarrays, espectrometría de masas y cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución (DHPLC). PCRs se utilizan con frecuencia en el análisis de variaciones específicas de secuencia o se usan en combinación con métodos antes mencionados.

[0070] En el método de la invención, la muestra biológica puede ser cualquier muestra de tejido adecuado, tal como una biopsia del tejido epitelial, un nódulo linfático o una lesión tumoral metastásica de cualquier órgano del cuerpo o sangre completa. La muestra biológica puede ser pretratada, si es necesario, de una manera apropiada conocida por los expertos en la técnica.

[0071] En la terapia, se puede utilizar la restauración de la función normal del gen NAV3. Esto se puede lograr mejorando la expresión de los genes funcionalmente homólogos, introduciendo un gen NAV3 intacto o usando una forma modificada del gen NAV3 o el oligonucleótido antisentido contra el NAV3 en cualquier técnica actualmente disponible para la terapia génica para prevenir la progresión de una enfermedad proliferativa. En particular, el crecimiento de células tumorales puede ser ralentizado o incluso detenido por dicha terapia. Estas técnicas incluyen métodos terapéuticos *ex vivo* e *in situ*, los primeros comprendiendo la transducción o trasfección de un gen NAV 3 intacto o alterado (o sus dominios funcionales) en una forma recombinante o péptido o como oligonucleótidos antisentido o en un vector para el paciente, y los últimos comprendiendo insertar el gen alterado o el oligonucleótido en un portador, que se introduce después en el paciente. Dependiendo de la enfermedad a tratar, se puede lograr una cura transitoria o permanente. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos o péptidos monoclonales o humanizados de unión a la proteína NAV3 o al gen de fusión generado como resultado de la translocación para suprimir la función de la proteína NAV3 alterada y por lo tanto el crecimiento de las células tumorales puede ser ralentizado o incluso detenido. Los anticuerpos contra NAV3 también podrían utilizarse para transportar otros agentes, tales como sustancias citotóxicas, a las células cancerosas que sobreexpresan el gen NAV3. Tales agentes podrían utilizarse para matar específicamente las células cancerosas.

[0072] La comprensión de las aberraciones genéticas o los cambios cromosómicos, especialmente los asociados con la iniciación del tumor contribuirá al diagnóstico precoz del cáncer y el tratamiento de los pacientes. La presente invención describe por primera vez el papel de LOH de NAV3 en tumores epiteliales. La presente invención divulga



también que cuando se observa LOH de NAV3 en adenomas colorrectales es probable que dicho paciente desarrolle también carcinomas a través de LOH de NAV3.

5 [0073] La detección de deleciones u otros defectos del gen NAV3 como se describe en la presente invención, permite por tanto la identificación más temprana de pacientes con un mayor riesgo de desarrollar un cáncer agresivo y permite la prevención eficaz del cáncer y el desarrollo de un nuevo diagnóstico y seguimiento de los carcinomas, como el cáncer colorrectal o de pulmón. El descubrimiento de anomalías genéticas de NAV3 en tumores epiteliales también abre nuevas posibilidades en el avance de las terapias de los mismos.

[0074] Los siguientes ejemplos se dan para ilustración adicional de la invención.

10 [0075] Será obvio para un experto en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto inventivo puede aplicarse de diversas maneras. La invención y sus realizaciones no se limitan a los ejemplos descritos a continuación, sino que pueden variar dentro del ámbito de las reivindicaciones.

### Ejemplo 1

#### a) Análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) en NAV3, utilizando marcadores microsatélites

15 [0076] La histología de las muestras de tejido fijado en formol y embebido en parafina fue verificada por un histopatólogo. Los tumores, adenomas o zonas normales se diseccionaron para obtener una proporción tejido de carcinoma o adenoma puro normal o al menos 50% de proporción para la preparación de ADN de acuerdo con un protocolo estándar. Las secciones de parafina fueron cortadas con un grosor de 10 µm y el ADN se purificó siguiendo estos protocolos estándar (Isola et al. Am J Pathol 145: 1301-1308, 1994).

20 [0077] Se realizaron análisis de LOH para el gen NAV3. Se escogieron tres marcadores microsatélite que abarcan el locus del gen NAV3 en 12q21.1-q21.31 y rodeando el gen en ambas direcciones (se indican entre paréntesis distancias físicas entre los loci en mega-bases según <http://www.ensembl.org>): pter D12S1684-(0.8 Mb)-D12S326-(0.2 Mb)-NAV3-(3.8 Mb)-D12S1708 qter. Las muestras de ADN se amplificaron mediante reacción cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores: D12S1684F 5'cctgcatgcctcagttatga3', D12S1684R 5'acaagccataccagtcagg3', D12S326F 5'accaggctcccctaaaagtg3', D12S326R 5'agaatgaccagaccacagg3', D12S1708F 5'gggaacttatgtcaaggcttaga3', D12S1708R 5'gatctagtgtcaagagggtttcaa3'. Las reacciones PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl conteniendo 75-150 ng de ADN-molde, buffer GeneAmp 10x PCR (Applied Biosystems), 0,2 mM de dNTP Mix (GE Healthcare Biosciences Ab), 0,8 umol de cada cebador, y 1,5 U de polimerasa AmpliTaq (AB). Los siguientes ciclos de PCR fueron utilizados para la amplificación: 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, recocido a una temperatura de 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 45 segundos. La extensión final fue a 72°C durante 5 minutos. Los cebadores hacia adelante se marcaron con fluorescencia con FAM y los fragmentos de PCR corrieron en el secuenciador/genotipador ABI3730 y los resultados se analizaron utilizando software GeneMapper v3 (Applied Biosystems).

#### 35 b) Análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) de NAV3, utilizando la extensión de un cebador con un único nucleótido, SnuPE.

[0078] El ADN se preparó como anteriormente.

40 [0079] Se utilizó un método no radiactivo para cuantificar la expresión relativa de los dos alelos NAV3 en pacientes heterocigotos para el polimorfismo codificante A / G (rs1852464) en el exón 19 del gen NAV3. La heterocigosidad para rs1852464 es de hasta 0,493 en Caucásicos / Europeos por lo que es un marcador muy útil. La reacción de extensión de SnuPE se basa en la incorporación de un solo ddNTP que se selecciona para permitir la extensión diferencial de un cebador marcado recocido cerca del sitio polimórfico.

45 [0080] Las muestras correspondientes tumorales y normales de ADN genómico de los mismos individuos fueron amplificadas por PCR mediante cebadores rs1852464F 5 'CCTGCTATTTTCATCTTTCAAGC 3' y rs1852464R 5 'GGCTGGGATGCTGTTTGGAG 3' para obtener un fragmento de PCR de 130 bp que contiene el polimorfismo A / G. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 25 µl conteniendo 60-100 ng de ADN-molde, buffer GeneAmp 10x PCR (Applied Biosystems), 0,2 mM de dNTP Mix (GE Healthcare Biosciences Ab), 0,8 µM de cada cebador, y 1,5 U de polimerasa AmpliTaq (AB). Los siguientes ciclos de PCR fueron utilizados para la amplificación: 94 ° C durante 3 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94 ° C durante 30 segundos, temperatura de recocido 56 ° C durante 30 segundos, y extensión a 72 ° C durante 45 segundos. La extensión final fue a 72 ° C durante 5 minutos. El producto de PCR se purifica posteriormente mediante exonucleasa I (10 U / µl) y SAP (fosfatasa alcalina de camarón, 2 U / µl) (ExoSAP-IT, Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 [0081] La extensión de PCR se realizó utilizando un cebador de extensión 5"GATGCTGTTTGGAGCGCATCATGCTGGGCC 3 ' marcado con fluorescencia y una mezcla de nucleótidos

conteniendo el nucleótido de terminación ddCTP en lugar de la citosina normal. Las extensiones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 20 µl conteniendo 2 µl de producto purificado PCR, Buffer Thermo Sequenase Reaction (GE Healthcare Biosciences Ab), 50 µM de cada dATP, dGTP, dTTP, y ddCTP (GE Healthcare Biosciences Ab), 0,2 µM de SNUPE, y 6,4 U de Thermo Sequenase DNA Polymerase (GE Healthcare Biosciences Ab). Los siguientes ciclos de PCR fueron utilizados para las reacciones de extensión: 95 ° C durante 2 minutos, 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 segundos, temperatura de recocido de 56 ° C durante 20 segundos, y extensión a 70 ° C durante 40 segundos. La extensión final fue a 70 ° C durante 10 minutos. De éste modo se obtuvieron productos de extensión de: 43 pb y 49 pb dependiendo de si G o A están presentes en el molde. Los productos de la reacción de extensión del cebador se llevaron a cabo en secuenciador/genotipador ABI3730 y los resultados se analizaron utilizando software GeneMapper v3 (Applied Biosystems).

### c) Interpretación de los resultados de LOH

[0082] Una muestra se clasificó como mostrando LOH, si uno de los alelos en la muestra del tumor tenía un 40% o más de disminución de señal en comparación con su correspondiente normal. Hay un gran consenso en la literatura para usar este nivel de corte, ya que es específico y suficientemente sensible si los porcentajes tumorales son más del 50%, que era efectivamente el mínimo en este estudio. Se observó una reducción de señal hasta un 23% en tejidos normales (por ejemplo, Cleton-Jansen et al, Cancer Res 61:1171, 2001) dejando una zona gris entre 25% - 39% de reducción de la señal. Estos fueron considerados aquí como LOH "BLOH" límite de acuerdo con la literatura publicada. (Cleton-Jansen et al, Cancer Res 61:1171, 2001, Vauhkonen et al. Gastric Cancer 8: 238-244, 2005 y Kim et al. Virchows Arch 443: 491-500, 2003) (Figuras 1-3).

### 20 Ejemplo 2

#### a) Análisis NAV3LOH en series de tumores colorrectales

[0083] Tres series (designadas aquí A, B y C) fueron examinadas:

25 Serie A: Serie consecutiva de 56 carcinomas colorrectales y 21 adenomas (número total = 77) de 59 pacientes. Los adenomas y carcinomas que se originan en los mismos pacientes estaban disponibles en 10 de los 59 casos. A juzgar sólo por la inestabilidad en tres loci microsatélites examinados del cromosoma 12, todos los adenomas fueron MSS mientras que 14 de los 56 carcinomas mostraron MSI en uno o más marcador (es) (25%).

30 Serie B: Serie bien caracterizadas de tumores colorrectales familiares que dieron negativo para una mutación germinal en un gen reparador. Esta constó de 18 carcinomas MSS, 1 carcinoma MSI y 4 adenomas MSS (número total de tumores = 23). Esta serie se ha caracterizado previamente por los cambios moleculares frecuentes en la carcinogénesis colorrectal.

Serie C: Serie bien caracterizada de cánceres colorrectales MSI que se originan en familias HNPCC con el gen MMR probado en las mutaciones germinales (número total = 24 tumores).

35 [0084] Las muestras normales correspondientes fueron en su mayoría de bloques de mucosa normal o, cuando éstas no estaban disponibles, de otros tejidos corporales normales disponibles de los pacientes (por ej. ganglios linfáticos, apéndice o la sangre).

40 [0085] La inestabilidad de microsatélites, MSI, se refiere a la variación de la longitud en todo el genoma de los microsatélites, que son tramos cortos de nucleótidos en tándem en el ADN, como resultado de un fallo en la reparación de desajustes del ADN, mientras que los microsatélites estables, MSS, se refieren a longitud constante de los microsatélites, en otras palabras, falta de variación de longitud de los microsatélites causada por un fallo en la reparación de desajustes del ADN.

[0086] El análisis de LOH se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

45 [0087] Los resultados obtenidos en todas las series examinadas se resumen en la Tabla 1. La Tabla 2 muestra los resultados para cada marcador ensayado por separado. Es de especial interés que, utilizando el SNP NAV3 rs1852464 intragénico como marcador estrictamente específico para LOH en el exón 19 de NAV3, los datos disponibles hasta el momento muestran una frecuencia de 7/20 (35%) para la pérdida de NAV3 en este sitio en los tumores MSS. Estos 7 tumores incluyen 6 ya implicados por los marcadores microsatélites, mientras que en sólo un caso se vio BLOH en el SNP rs1852464, pero no en los loci microsatélite de las zonas flanqueantes. De los 31 tumores que mostraron LOH / BLOH por marcadores microsatélites en la serie A, 23 fueron no informativos o están todavía pendientes, dejando 8 casos para la comparación con SNUPE. De estos 8 casos, 6 mostraron concordancia con la pérdida de NAV3 en el SNP rs1852464.

50

**Tabla 1. Resultados de NAV3 LOH y BLOH en diferentes series**

	MSS carcinoma	MSI carcinoma	MSS adenoma
<b>Series A (n=77)*</b>	22/42 (52%)	1/8 (13%)*	8/21 (38%)
<b>Series B (n=23)</b>	12/18 (67%)	0/1 (0%)	3/4 (75%)
<b>Series C (n=24)</b>		5/24 (21%)	
<b>Total</b>	34/60 (57%)	6/33 (18%)	11/25 (44%)
* El carcinoma MSI en Series A constaba de 14 cánceres de los que 14 fueron no informativos			

**Tabla 2. Resultados de NAV3LOH y BLOH para cada marcador**

	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE @rs1852464
A-MSS carcinoma	14/37	13/33	7/29	9/23*
A-MSI carcinoma	0/3	0/2	1/4	0/7*
A-MSS adenoma	4/21	6/19	3/16	0/8*
B-MSS carcinoma	6/13	6/12	2/10	4/8
B-MSI carcinoma	0/1	0/1	0/1	1/1

(continuación)

	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE @rs1852464
B-MSS adenoma	1/4	1/2	1/3	0/1
C-MSI carcinoma	3/5	0/6	2/11	0/15
<b>Totals:</b>				
All MSS carcinoma	20/50 (40%)	19/45 (42%)	9/39 (23%)	13/31 (42%)
All MSI carcinoma	3/9 (33%)	0/9 (0%)	3/16 (19%)	1/23 (4%)
All MSS adenoma	5/25 (20%)	7/21 (33%)	4/19 (21%)	0/9 (0%)
<b>Total all tumors</b>	<b>28/84 (33%)</b>	<b>26/75 (35%)</b>	<b>16/74 (22%)</b>	<b>14/63 (22%)</b>

\*NOTA: Como es habitual, las frecuencias de LOH se calcularon para los casos informativos solamente. La prueba SNUPE fué no informativa, debido a la homocigosidad constitucional en 9 carcinomas (8 MSS, 1 MSI) y en 6 adenomas que mostraron LOH en microsatélites examinados en el cromosoma 12. Esta casualidad de homocigosidad en rs1852464 hará que sea un riesgo para comparar los datos disponibles por microsatélites frente a SNUPE.

**2b) Análisis de LOH de los adenomas y carcinomas colorrectales que se originan en el mismo paciente.**

5 [0088] Los adenomas y carcinomas que se originan en los mismos pacientes estaban disponibles en 10 de los 59 casos en las series A. El análisis se realizó como se describió en el Ejemplo 1.

[0089] En 4 de estos 10 pacientes los adenomas mostraron LOH o BLOH y en 3 de estos 4 casos los carcinomas coincidentes eran informativos y tienen mayormente un patrón similar de LOH / BLOH (Tabla 3). Esto sugiere que cuando se observa NAV3LOH en adenomas es probable que dicho paciente desarrolle también carcinomas a través de NAV3 LOH.

10

**Tabla 3. Resultados de LOH de adenomas y carcinomas que se originan en el mismo paciente**

Caso no	Tumor	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE @rs1852464
1	Ca	BLOH (0.73)	no	no	
	Ad	BLOH (0.67)	no	no	
	Ad	ND	BLOH (0.74)	LOH	
2	Ca	no	LOH	no	
	Ad	no	BLOH (0.68)	no	
	Ad	no	LOH	no	
3	Ca	no	no	no	
	Ad	no	no	no	
	Ad	no	no	no	
4	Ca	BLOH (0.75)	homocigótico	no	
	Ad	no	homocigótico	no	
5	Ca	MSI	MSI	MSI	homocigótico
	Ad	no	no	no	
6	Ca	no	no	BLOH (0.66)	
	Ca	no	no	BLOH (0.66)	
	Ad	no	no	no	
7	Ca	no	no	homocigótico	
	Ad	no	no	homocigótico	
8	Ca	no	homocigótico	homocigótico	

(continuación) --

Caso no	Tumor	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE @rs1852464
	Ad	no	homocigótico	homocigótico	
9	Ca	MSI	MSI	?MSI	homocigótico
	Ad	BLOH (0.73)	no	homocigótico	
10	Ca	LOH	LOH	LOH	
	Ad	LOH	LOH	LOH	

**2c) Características morfológicas e histológicas de tumores colorrectales que tienen NAV3 LOH**

5 [0090] La presencia de LOH en los adenomas tendía a ser asociada a casos que, por criterios estándar, se consideran en riesgo para desarrollar un cáncer. De los cinco adenomas con LOH, el diámetro promedio fue de más de 9 mm y por lo tanto, cerca del nivel crítico de 1 cm, mientras que en los otros cinco casos sin LOH, el diámetro promedio fue menor de 6 mm (Tabla 4). Por otra parte, en los adenomas con LOH, uno de cada cinco mostró una pobre diferenciación, mientras que el grado de diferenciación en los casos LOH negativo siempre fue elevado.

**Tabla 4. Análisis de LOH con los marcadores D12S1684 y D12S326 y D12S1708 de diez casos con adenomas tubulares de colon y recto. La diferenciación fue clasificada de 1 (muy diferenciados) a 3 (pobre diferenciación). El tamaño se da como el diámetro en milímetros.**

Caso	D12S1684	D12S326	D12S1708	*Diferenciación	**Tamaño
1	Completa LOH	LOH	LOH	1	15
2	No	BLOH	No	2	10
3	No	BLOH	No	1	8
4	BLOH	No	No	1	7
5	No	LOH	No	1	7
6	No	No	No	1	7
7	No	No	No	1	6
8	No	homocigótico	homocigótico	1	5
9	No	No	No	1	5
10	No	No	No	1	5

\* Grado de diferenciación 1-3  
 \*\* Tamaño en milímetros

### Ejemplo 3

#### Deleción de NAV3 detectado por FISH en tumores colorrectales.

##### Muestras

5 [0091] Las muestras para el análisis FISH (hibridación fluorescente in situ) se prepararon a partir de 18 casos seleccionados al azar de carcinoma colorrectal de la serie A (descrita en el Ejemplo 2a) y de siete casos con muestras de piel obtenidas a partir de pacientes que sufren de eczema crónico, una lesión inflamatoria no maligna como control negativo. Todas las muestras de tejido se procesaron de forma rutinaria mediante fijación en formol y embebidos en parafina.

#### 10 Preparación de los núcleos a partir del tejido embebido en parafina

[0092] Secciones de 50 µm fueron cortadas a partir de tejido fijado en formol y embebido en parafina. Después de la desparafinización cada sección se digirió con proteasa XXIV (Sigma) a 37 ° C durante 30 minutos. Después de la digestión enzimática, los núcleos se sedimentaron por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos y se diluyeron en 0.1 M Tris-HCl, 0.07 M NaCl, pH 7.2. La suspensión nuclear se pipeteó sobre un portaobjetos y se secó durante una noche a temperatura ambiente. Los portaobjetos se fijaron con paraformaldehído 0,01% durante 4 minutos a temperatura ambiente, seguido de deshidratación con etanol clasificado (70%, 85%, 100%). Los portaobjetos fueron almacenados a -70 ° C.

#### Marcado de las sondas con Fluoresceína-12-dUTP y con Alexa-594-5-dUTP

20 [0093] Tres clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) específicos para NAV3 ADN (RP11-494K17, RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, USA) fueron marcados con Alexa-594-5-dUTP (Invitrogen) y la sonda del centrómero del cromosoma 12 (pA12H8) se marcó con fluoresceína-12-dUTP (Roche) utilizando traslación por muescas ((Hyytinen E et al. Cytometry, 16: 93-99, 1994). Para cada reacción de marcaje se utilizó 1-2 µg de ADN en un volumen de reacción total de 50 µl. 4 µl de cada sonda de BAC y de centrómero marcadas se mezclaron con COT1 ADN humano (Invitrogen) y se precipitó con acetato sódico y etanol. La mezcla de sondas precipitadas se diluyó en tampón de hibridación (15% p/v de sulfato de dextrano, 70% de formamida en SSC, pH 7,0) y se desnaturizó a 76 ° C durante 10 minutos.

#### FISH con núcleos extraídos del tejido embebido en parafina

30 [0094] Los portaobjetos fueron pre tratados con tiocianato de sodio 1 M a 80 ° C durante 5 minutos y se lavaron tres veces con 2 x SSC durante 5 minutos. Después de lavar los portaobjetos fueron tratados con glicerol 50% , 0.1 x SSC a 90 ° C durante 6 minutos, con 2 x SSC durante 3 minutos y con agua destilada tres veces, durante 2 minutos. Los portaobjetos se desnaturizaron en formamida 70%, 2 x SSC a 87 ° C durante 7 minutos. Después de la desnaturización los portaobjetos se deshidrataron con etanol clasificado (70%, 85%, 100%) y fueron digeridos enzimáticamente con proteinasa K (Sigma; 8 µg / ml en 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>) a +37 ° C durante 7 minutos. Después de la digestión los portaobjetos fueron deshidratados y se pipeteó 10 µl. de la mezcla de sondas

5 desnaturalizadas en los portaobjetos. La hibridación se llevó a cabo durante una noche a 37 ° C. los portaobjetos se lavaron tres veces con urea 1.5 M, 0,1 x SSC a 45 ° C durante 10 minutos, una vez con 0,1 x SSC durante 10 minutos y 4 x SSC durante 5 minutos, seguido de tres lavados con tampón PN (tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 8.0, NP-40 0.1%). Por último, los portaobjetos se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se montaron en medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector).

### Análisis y resultados

10 [0095] Los portaobjetos fueron analizados utilizando Olympus BX 50, Tokio, Japón, equipado con filtro de serie 8300 y excitador de triple banda 83103x (Chroma Technology Corp., Brattleboro, Vermont, EE.UU.) y una cámara CCD enfriada (Sensi Cam, PCO, Computer Optics, Kelheim, Germany) junto a un ordenador (Dell GX280, Limerick, Irlanda) con software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Se analizaron cincuenta células de cada caso y se agruparon como normales si tenían dos marcadores del centrómero para el cromosoma 12 y dos para las células NAV3. Las células poliploides tienen tres o más marcadores centroméricos. La delección de NAV3 fue definida cuando el número de marcadores del centrómero fue mayor que el número de marcadores de NAV3. 15 Unas pocas células tenían un marcador del centrómero y un marcador de NAV3; esto fue tomado como un artefacto técnico. Los resultados (Tabla 5) muestran claramente que las muestras de los carcinomas de colon tienen una alta frecuencia de poliploidía y que estas células a menudo muestran delección de uno o más de los alelos de NAV3.

**Tabla 5. Número de células normales, células poliploides y células con delección NAV3 en muestras de pacientes con carcinoma colorrectal y lesiones inflamatorias de la piel. Se calcularon cincuenta células por caso.**

Muestra	Número de células contadas	normal 2/2, cel *	todas las cel. poliploides (>2 cen), **	cen>nav cél. , ***	1 cen 1 nav, ****
Caso C1, colon carcinoma	50	28	14	5	2
Caso C2, colon carcinoma	50	31	6	11	3
Caso C3, colon carcinoma	50	29	10	8	7
Caso C4, colon carcinoma	50	27	17	9	2
Caso C5, colon carcinoma	50	22	15	20	2

(continuación)

Muestra	Número de células contadas	normal 2/2 cel , *	Todas las cél. poliploides (>2 cen), **	cen>navcél. , ***	1 cen 1 nav, ****
Caso C6, colon carcinoma	50	19	18	7	5
Caso C7, colon carcinoma	50	31	5	6	7
Caso C8, colon carcinoma	50	21	21	11	5
Caso C9, colon carcinoma	50	16	30	10	2
Caso C10, colon carcinoma	50	18	16	16	7
Caso C11, colon carcinoma	50	19	18	8	4
Caso C12, colon carcinoma	50	23	18	10	0
Caso C13, colon carcinoma	50	34	1	3	5
Caso C14, colon carcinoma	50	19	18	8	4
Caso C15, colon carcinoma	50	23	18	10	5
Caso C16, colon carcinoma	50	24	11	8	3
Caso C17, colon carcinoma	50	28	12	6	3
Caso C18, colon carcinoma	50	24	14	12	3
Caso S1, piel eczema	50	42	1	2	3
Caso S2, piel eczema	50	43	1	3	3
Caso S3, piel eczema	50	47	1	0	2
Caso S4, piel eczema	50	42	0	2	5

(continuación)

Muestra	Número de células contadas	normal 2/2 cel, *	Todas las cél. poliploides (>2 cen), **	cen>nav cells, ***	1 cen 1 nav, ****
Caso S5, piel eczema	50	44	1	3	2
Caso S6, piel eczema	50	38	3	3	9
Caso S7, piel eczema	50	41	2	2	3
* = Número normal (2 y 2) de marcadores del centrómero y NAV3 por célula ** = Más de 2 marcadores del centrómero por célula *** = Número de marcadores del centrómero más que marcadores de NAV3 por célula **** = Un marcador del centrómero y un marcador de NAV3 por célula					

**Ejemplo 4****Análisis NAV3 LOH de tumores de pulmón**

- 5 [0096] Se examinaron muestras archivadas embebidas en parafina de cinco pacientes con cáncer de pulmón sin ninguna evidencia de otro órgano implicado u otro cáncer concomitante. Tres de las muestras de cáncer de pulmón eran SCLC y dos carcinomas epidermoides. Se realizó una microdissección y amplificación por PCR de las muestras de células de cáncer de pulmón y sus correspondientes muestras normales de tejido pulmonar según el siguiente protocolo.
- 10 [0097] Se cortaron secciones de 5 µm de las muestras usando un microtomo y se montaron sobre una membrana delgada de polietileno de 1,35 µm (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bemried, Alemania), unida a un portaobjetos. Las secciones de tejido fueron entonces desparafinadas y teñidas con hematoxilina según lo descrito antes (Stoecklein et al Am J Pathol 161: 43-51, 2002). La tinción hematoxilina-eosina para el control morfológico se hizo de acuerdo con el protocolo estándar. Áreas de células malignas cubriendo 200.000 µm<sup>2</sup> fueron microdissecadas mediante captura por láser usando el sistema P.A.L.M. Laser-Microbeam (P.A.L.M. Microlaser Technologies). Posteriormente, se llevó a cabo una digestión con proteinasa K y el ADN se amplificó con SCOMP como se describió anteriormente. (Klein et al Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96:.. 4494-9, 1999 y Stoecklein et al Am J Pathol 161: 43-51, 2002). El éxito de la amplificación fue ensayado por PCR para marcadores microsatélites D5S500 y D17S1161, como se describió anteriormente (Klein et al Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96:.. 4494-9, 1999 y Stoecklein et al Am J Pathol 161: 43-51, 2002).
- 15
- 20 [0098] Los cinco casos de cáncer de pulmón se analizaron con éxito para LOH de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1a. De estos cinco cánceres de pulmón, uno fue no informativo para los tres marcadores que se utilizaron, sin embargo la pérdida de heterocigosidad se encontró en dos de los otros cuatro casos (Tabla 6).



Tabla 6. NAV3LOH en cánceres de pulmón.

Caso	D12S326 (cerca de NAV3)	D12S1708	D12S1684
EC normal	OK-heterocigoto	homocigoto	??
EC tumor	NO	homocigoto	??
SCLC normal	OK-heterocigoto	homocigoto	homocigoto
SCLC tumor	LOH	??	??
EC normal	OK-heterocigoto	OK-heterocigoto	OK-heterocigoto
EC tumor	NO	LOH	LOH
SCLC normal	homocigoto	homocigoto	homocigoto
SCLC tumor	homocigoto	homocigoto	??
SCLC normal	homocigoto	OK-heterocigoto	homocigoto

(continuación)

Caso	D12S326 (cerca de NAV3)	D12S1708	D12S1684
SCLC tumor	homocigoto	NO	homocigoto
<p>?? significa patrón no interpretable  NO = no LOH  CEP = cáncer de pulmón de células pequeñas  EC = carcinoma epidermoide de pulmón</p>			

**Ejemplo 5****Análisis CGH de tumores de pulmón**

5 [0099] Muestras de cáncer de pulmón de doce pacientes fueron utilizadas para CGH. Estos doce pacientes fueron también diagnosticados con CTCL.

10 [0100] CGH se realizó de acuerdo con el protocolo publicado por Klein et al.1999 con las modificaciones descritas por Stoecklein et al.2002 (Klein et al Proc Natl Acad Sci EE.UU. 96:.. 4494-9, 1999 y Stoecklein et al Am J Pathol 161: 43-51, 2002). Brevemente, ADN microdisecionado y digerido con proteinasa K se digirió con la enzima de restricción Mse I (BioLabs) dando como resultado fragmentos de ADN con una longitud media de 256 bp, los adaptadores se ligaron a los salientes 5', y los fragmentos de ADN fueron amplificados por reacción en cadena de polimerasa. El ADN amplificado se marcó a continuación con digoxigenin-dUTP (Roche) y de forma similar se procesaron alícuotas de ADN de referencia obtenido de células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos con biotin-dUTP (Roche). Las sondas marcadas se hibridaron en portaobjetos metafásicos de macho normal durante 2-3 noches. Después de lavados post hibridación, las metafases fueron examinadas bajo un microscopio de fluorescencia y fueron capturadas tres imágenes digitales en color utilizando un microscopio de epifluorescencia (Axioplan imaging 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) equipado con una cámara CCD utilizando los límites estadísticos para ratios de verde a rojo para determinar las ganancias y pérdidas del número de copias de ADN. Ocho a doce metafases fueron incluidas en el análisis para cada caso. Como control interno, ADN macho y hembra normal fueron cohibridados y sólo fueron identificadas diferencias en los cromosomas sexuales.

25 [0101] En las células tumorales de un paciente con cáncer de pulmón, la pérdida de 12q21 se demostró por CGH (Figura 4). El cariotipo del paciente con SCLC y CTCL representa cambios típicos de SCLC: pérdidas de 3p, 5q, 8p, 10q, y 13q, así como ganancias de 5p, y 9q. Algunas otras aberraciones típicas de SCLC (pérdida 17p, y ganancia de 8q) están ausentes. Hallazgos característicos de CTCL por ejemplo, incluyen pérdidas de 10q/10, y 13, y ganancias de 4q, 7, 17q/17, y 18, las cuales pueden demostrarse en este caso. Curiosamente, la pérdida de 12q21 fue también evidente.

**Ejemplo 6****Deleciones de NAV3 en cáncer de vejiga urinaria****Muestras de tejido**

5 [0102] Se seleccionaron para el estudio muestras de 16 pacientes diagnosticados de carcinoma del epitelio transicional de la vejiga urinaria. Las muestras fueron fijadas de forma rutinaria en formol neutro y embebidas en parafina. Se cortaron 1-3 secciones de 50 micras de espesor y se aislaron los núcleos como se describe en el Ejemplo 3, página 18, párrafo segundo.

**Marcado de sonda**

10 [0103] Dos clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) específicos para NAV3 ADN (RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, USA) fueron marcados con Alexa-594-5-dUTP (Invitrogen) y la sonda del centrómero del cromosoma 12 (pA12H8; American Type Cell Culture) se marcó con Alexa488-5-dUTP (Invitrogen) utilizando traslación de muescas (Hyytinen et al. 1994). 50-75 ng de cada BAC marcado y 30 ng de la sonda del centrómero se mezclaron con 1 µg de COT1ADN humano (Invitrogen) y se precipitó con acetato sódico y etanol. La mezcla de sondas precipitadas se diluyó en 10 µl de tampón de hibridación (15% w / v de sulfato de dextrano, 70% de formamida en 2 x SSC, pH 7.0).

**Hibridación in situ con fluorescencia**

20 [0104] Portaobjetos con núcleos fueron pretratados con tiocianato de sodio 1 M a 80 ° C durante 5 minutos y se lavaron tres veces con 2 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar, los portaobjetos fueron tratados con glicerol 50%, 0.1 x SSC a 90°C durante 6 minutos, con 2 x SSC durante 3 minutos y con agua destilada tres veces, durante 2 minutos. Los portaobjetos fueron digeridos enzimáticamente con proteinasa K (Sigma; 8 µg / ml en 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>) a +37°C durante 8 minutos. Después de deshidratación y secado al aire se pipeteó la mezcla de sondas sobre los portaobjetos y los portaobjetos se desnaturalizaron durante 6 min a 85°C sobre una placa caliente. La hibridación se llevó a cabo durante 48 hr. a 37°C. Los portaobjetos se lavaron tres veces con urea 1.5 M, 0,1 x SSC a 47 ° C durante 10 minutos, una vez con 0,1 x SSC durante 10 minutos a 47°C, seguido de tres lavados con PBS, 0.1 % NP-40 a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se montaron en medio de montaje Vectashield con 4',6-diamino-2 fenilindol dihidrocloruro (DAPI; Vector).

30 [0105] Los resultados FISH fueron evaluados utilizando un microscopio Olympus BX51 (Tokio, Japón) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 60X y un filtro de triple paso de banda para la detección simultánea de Alexa488, Alexa594 y DAPI (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT, USA). Se analizaron 200 núcleos de cada caso y los núcleos fueron agrupados como normales si tenían dos marcadores para el centrómero del cromosoma 12 y dos para el NAV3. Los núcleos poliploides tenían tres marcadores del centrómero. La deleción de NAV3 fue definida cuando el número de marcadores del centrómero fue mayor que el número de marcadores de NAV3 y la amplificación de NAV3 se definió cuando el número de marcadores de NAV3 fue mayor que los marcadores del centrómero. Los análisis fueron hechos sin saber el diagnóstico o la identidad de la muestra por dos analizadores independientes.

**Análisis NAV3LOH utilizando marcadores microsatélites**

40 [0106] Para el ensayo LOH (pérdida de heterocigocidad), el ADN procedente tanto de tejido normal del paciente como el procedente de muestras de tumor, fue extraído de secciones embebidas en parafina de 10 µm de espesor siguiendo métodos estándar (Isola et al. Am J Pathol 145: 1301-1308, 1994). El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 1a.

**Resultados**

45 [0107] Los resultados relativos a la LOH (y LOH límite; BLOH), así como el estado del número de copias de NAV3 en el ensayo FISH se muestran en la Tabla 7. 7 de cada 17 muestras de cáncer de vejiga urinaria (40%) mostraron LOH / BLOH con al menos uno de los marcadores utilizados en el estudio. 20 de 64 (30%) alelos eran homocigotos y no se pudieron analizar utilizando el método de LOH. En el análisis de FISH, 3 de cada 15 muestras (20%) mostraron deleción de NAV3. La duplicación del gen NAV3 (amplificación) se observó con 20% de las muestras. Una de las muestras tenía tanto deleción como amplificación de NAV3. Dos muestras no fueron analizadas para los cambios en el número de copias NAV3 debido a la mala calidad de la muestra.

Tabla 7. Resultados de análisis NAV3LOH y FISH en cáncer de vejiga urinaria

Caso no	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE@rs1852464	NAV3 Aberración (por FISH)
1	No	No	No	No	-
2	BLOH	LOH	homocigoto	homocigoto	delección
3	No	BLOH	No	No	-
4	No	BLOH	No	homocigoto	delección
5	No	No	No	No	delección y amplificación
6	BLOH	BLOH	No	No	-
7	No	homocigoto	No	homocigoto	amplificación
8	No	homocigoto	homocigoto	homocigoto	NA
9a	No	No	No	BLOH	-
9b	No	LOH	No	No	amplificación
10	BLOH	BLOH	BLOH	homocigoto	delección
11	No	No	No	homocigoto	-
12	No	homocigoto	homocigoto	homocigoto	-
13	homocigoto	No	homocigoto	homocigoto	-
14	No	No	homocigoto	No	-
15	No	homocigoto	homocigoto	No	NA

(continuación)

Caso no	D12S1684	D12S326	D12S1708	SnuPE@rs1852464	NAV3 aberración (por FISH)
16	No	No	No	homocigoto	amplificación
<b>No de resultados positivos</b>	<b>3/17, 1 no informativo</b>	<b>6/17, 4 no informativos</b>	<b>1/17, 6 no informativos</b>	<b>1/17, 9 no informativos</b>	<b>7/15, 2 muestras no analizadas (NA)</b>

**Ejemplo 7****Delección de NAV3 en cáncer de mama****5 Muestras de tejido**

[0108] Se estudió la presencia de delecciones de NAV3 en cáncer de mama mediante la selección de ganglios linfáticos centinela de cuatro pacientes operados de cáncer de mama como material de estudio. Las biopsias se obtuvieron a partir de ganglios linfáticos frescos o de material congelado y almacenado a -70 ° C hasta su utilización para el análisis NAV3FISH.

**10 Marcado de la sonda**

[0109] Dos clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) específicos para NAV3 ADN (RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, USA) fueron marcados con Alexa-594-5-dUTP (Invitrogen) y la sonda del centrómero del cromosoma 12 (pA12H8; American Type Cell Culture) se marcó con Alexa488-5-dUTP (Invitrogen) utilizando traslación de muescas (Hyytinen et al. 1994). 50-75 ng de cada BAC marcado y 10 ng de la sonda del centrómero se mezclaron con 1 µg de COT1ADN humano (Invitrogen) y se precipitaron con acetato sódico y etanol. La mezcla de sondas precipitadas se diluyó en 10 µl de tampón de hibridación (15% w / v de sulfato de dextrano, 70% de formamida en 2 x SSC, pH 7.0).

**Hibridación in situ con fluorescencia**

[0110] Los portaobjetos fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 minuto en hielo. Después de los lavados con PBS, los portaobjetos fueron digeridos enzimáticamente con proteinasa K (Sigma; 0,66 µg / ml en 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM de CaCl<sub>2</sub>) a +37°C durante 6 minutos. Después de deshidratación y secado al aire la

mezcla de sondas se pipeteó en los portaobjetos y los portaobjetos se desnaturalizaron durante 5 min a 75 ° C sobre una placa caliente. La hibridación se llevó a cabo durante 24 hr a 37°C. Los portaobjetos se lavaron tres veces con urea 1.5 M, 0,1 x SSC a 47 ° C durante 10 minutos, una vez con 0,1 x SSC durante 10 minutos a 47 ° C, seguido de tres lavados con PBS, 0.1 % NP-40 a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se lavaron con agua destilada, se secaron al aire y se montaron en medio de montaje Vectashield con 4',6-diamino-2 fenilindol dihidrocloruro (DAPI; Vector).

[0111] Los resultados FISH fueron evaluados utilizando un microscopio OlympusBX51 (Tokio, Japón) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 60X y un filtro de triple paso de banda para la detección simultánea de Alexa488, Alexa594 y DAPI (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT, USA). Todas las células cancerosas obtenidas a partir de la muestra se analizaron en cada caso y las células se agruparon como normales si tenían dos marcadores para el centrómero del cromosoma 12 y dos para el NAV3. Las células poliploides tenían tres o más marcadores del centrómero. La delección de NAV3 fue definida cuando el número de marcadores del centrómero fue mayor que el número de marcadores de NAV3 y la amplificación de NAV3 se definió cuando el número de marcadores de NAV3 fue mayor que los marcadores del centrómero. Los análisis fueron hechos sin saber el diagnóstico o la identidad de la muestra por dos analizadores independientes.

### Resultados

[0112] Los resultados se muestran en la tabla 8 y en las Figuras 5a y 5b. Cuatro casos fueron analizados y todas las células cancerosas encontradas a partir de las muestras fueron contadas para cada caso. Las células fueron agrupadas como normales si tenían dos marcadores para el centrómero del cromosoma 12 y dos para el NAV3. Las células poliploides tenían tres o más marcadores del centrómero (>2ce). Las células con NAV3 suprimido contenían mayor número de marcadores del centrómero que marcadores de NAV3 (cen>nav) y las células con NAV3 amplificado tenían mayor número de marcadores de NAV3 que marcadores del centrómero. (cen<nav).

[0113] Todos los cuatro casos mostraron células que contenían un número anormal de copias de centrómeros y / o NAV3. Adicionalmente a la delección de NAV3 (menos de dos copias de la señal de NAV3 en FISH), el número de células con poliploidia (más de dos copias del centrómero del cromosoma 12) y amplificación de NAV3 (más de dos copias de la señal de NAV3) se analizaron y se registraron. En un caso (caso número 2) se observó poliploidia con delección de NAV3 menos extensa, mientras que en los tres casos restantes la poliploidia se asoció con la pérdida de un alelo de NAV3.

[0114] En la Figura 5a, las barras negras indican la cantidad de poliploidia en las células estudiadas y las barras grises indican la cantidad de células con NAV3 suprimido. Los resultados se muestran como porcentaje del recuento celular total. En la Figura 5b, las células cancerosas típicas muestran una delección de NAV3. Las señales verdes indican los centrómeros y las señales en rojo las copias de NAV3.

**Tabla 8. Resultados de NAV3FISH con muestras de cáncer de mama**

Caso	1	2	3	4
No de células cancerosas contadas	20	69	52	55
% Células normales	0	14.5	19	23.5
% Células poliploides	100	84	77	74.5
% Células con NAV3 amplificado	10	6	0	2
% células con NAV3 suprimido	90	6	77	71
Tipo de célula primaria (cen+NAV3)	4+2	4+4	4+2	4+2

[0115] Es de notar que si bien era difícil o incluso imposible encontrar células malignas de cáncer de mama en biopsia de ganglios linfáticos usando sólo microscopía de luz de rutina, esta tarea se hizo muy simple después de marcar los alelos de NAV3 con la sonda de fluorescencia específica. Incluso las células individuales, en el medio de miles de linfocitos normales, podrían ser identificados con claros cambios en el número de copias y, como regla general, estas células también mostraron los núcleos característicos atípicos de las células cancerosas. Estas células anormales han sido extremadamente difíciles de identificar con microscopía de luz.

**Ejemplo 8**

**Cambios en el número de copias de NAV3 en carcinoma de células basales (BCC) y carcinoma de células escamosas (SCC)**

**Muestras de tejido**

5 [0116] Se seleccionaron para el estudio muestras de 14 pacientes diagnosticados de carcinoma de células basales y 5 pacientes con carcinoma de células escamosas. Las muestras fueron fijadas de forma rutinaria en formol neutro y embebidas en parafina. Se cortaron 1-3 secciones de 50 micras de espesor y se aislaron los núcleos como se describe en el Ejemplo 3, página 18, párrafo segundo.

**Hibridación in situ con fluorescencia**

10 [0117] El marcado de la sonda y el análisis FISH se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 6.

**Resultados**

15 [0118] Los resultados de análisis NAV3FISH de muestras BCC y SCC se muestran en la Tabla 9. 3 de 14 (21%) de las muestras de BCC mostraron delección de NAV3 con un rango de eliminación de 6-11% del recuento celular total. Además, tres de las muestras (21%) mostraron una duplicación en el gen NAV3 (intervalo de amplificación 8-11%). Una de cada cinco (20%) muestras de SCC mostraron delección de NAV3 (12%).

**Tabla 9. Resultados NAV3 FISH con muestras BCC y SCC**

Caso	Células normales (% del recuento celular total)	Células poliploides (% del recuento celular total)	Células con NAV3 amplificado (% del recuento celular total)	Células con NAV3 suprimido (% del recuento celular total)
BCC1	87	3	NA	2
BCC2	87	4	NA	4
BCC3	77	14	9	4
BCC4	85	4	5	7
BCC5	84	3	8	4
BCC6	90	2	3	4

(continuación)

Caso	Células normales (% del recuento celular total)	Células poliploides (% del recuento celular total)	Células con NAV3 amplificado (% del recuento celular total)	Células con NAV3 suprimido (% del recuento celular total)
BCC7	85	7	4	2
BCC8	75	20	5	3
BCC9	88	2	7	1
BCC10	NA	2	NA	1
BCC11	NA	NA	NA	1
BCC12	NA	NA	NA	1
BCC13	NA	17	5	11
BCC14	NA	7	11	6
SCC1	89	4	4	2
SCC2	90	6	3	2
SCC3	94	2	2	2
SCC4	81	4	NA	3
SCC5	NA	9	NA	12

**Ejemplo 9****Cambios en el número de copias de NAV3 en cáncer de colon****Muestras y análisis NAV3FISH**

[0119]

5 a) Dos líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal tipo MSS [CCL-230 (SW403) y CCL-228 (SW480)] y dos líneas celulares de colon normal [CRL-1539 (CCD-33Co) y CRL-1541 (CCD-112CoN)] fueron adquiridas de American Type Culture Collection (LGC Promochem AB, Boras, Sweden) y se cultivaron a 37°C siguiendo las instrucciones del fabricante. Se centrifugaron en portaobjetos Super Frost Plus 50000-100000 células usando una  
10 citocentrífuga. Los portaobjetos se secaron al aire, se fijaron con acetona y se almacenaron a -70 ° C hasta su utilización para el análisis NAV3FISH. El marcado de la sonda y el análisis de FISH fueron similares a las muestras de cáncer de mama en el Ejemplo 7.

b) Para las preparaciones en metafase se cultivaron siguiendo las Instrucciones de ATCC líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal CCL-248, SW403, SW480, RKO, DLD, HCA7, LIM1215 y LoVo (American Type Culture Collection, LGC Promochem AB, Boras, Suecia).

15 Las células fueron tratadas con solución hipotónica de KCl, se fijaron con acetona-metanol (1:3) y se puso una gota de la suspensión celular en un portaobjetos para hacer las preparaciones convencionales de cromosomas.

ADN purificado de pA12H8 (centrómero 12, plásmido de ATTC, purificado como anteriormente o de acuerdo con Karenko L et al. J Invest Dermatol 108: 22-29, 1997) y ADN purificado de RP11-136F16 y BAC RP11-36P3 (Karenko L et al. Cancer. Res. 65: 8101-8110, 2005), se marcaron por traslación de muescas con FITC-dUTP (NEN Life  
20 Science Products, Inc, Boston, MA EE.UU.), Alexa-594-dUTP (Invitrogen Molecular Probes, Leiden, Netherlands), biotina-dATP (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU.) o digoxigenina-dUTP (Roche, Mannheim, Alemania). La sonda del centrómero (por ejemplo, 1-5 ng) marcada con FITC o biotina y una o dos sondas de BAC se mezclaron y se precipitaron por adición de 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 x volúmenes de etanol 100%, y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante, el sedimento se dejó secar, después de lo cual el ADN se disolvió en  
25 una mezcla consistente en 50% formamida, y 10% de sulfato de dextrano, 2 x SSC, pH 7 y, opcionalmente, Cot-1 ADN (por ejemplo, 125ng, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU.), llamado aquí mezcla de sondas. Las metafases diana se desnaturalizaron en un portaobjetos durante 2 a 3 minutos en formamida 70% / 2 x solución SSC (pH 7.0) a 70 - 73 ° C, y se deshidrataron en 70%, 85%, y 100% de etanol, y se trataron con proteinasa K (1 µg / ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en tampón 20 mM Tris/2mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5) durante 7,5 minutos a 37 ° C, y  
30 se deshidrataron como antes. La mezcla de sondas se desnaturalizó durante 5 minutos a 70°C, y se dispuso en portaobjetos pretratados en un plato caliente (37 ° C), sellado con un cubreobjetos con Rubber Cement (Starkey Chemical Co, LaGrange IL, EE.UU.) y se dejó hibridar en una cámara húmeda (37°C) durante 2 a 3 días. Los portaobjetos se lavaron 3 veces con formamida 50% en 2 x SSC, pH 7, 4 x SSC, y 0,1 x SSC, todo a 45°C, y con 4 x SSC, 2 x SSC y PBS a temperatura ambiente. Después de los lavados post hibridación, la sonda biotinilada se  
35 visualizó con avidina-FITC (verde, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) y la sonda marcada con digoxigenina se visualizó con anticuerpo anti-digoxigenina de oveja conjugado con rodamina (rojo, Roche, Mannheim, Alemania). Los portaobjetos se contratiñeron con DAPI y se montaron en Vectashield (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.).

40 Las preparaciones secadas al aire se fijaron con paraformaldehído 0,1% y se secaron en series de etanol (70%, 85%, 100%).

Las metafases se fotografiaron con un microscopio de rayos UV (Axioplan imaging 2, Zeiss, Germany) y se analizaron utilizando el programa informático de Isis MetaSystems GmbH con el programa del módulo MFISH.

c) Muestras de 36 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma colorectal tipo MSS, 14 pacientes con adenoma colorrectal tipo MSI y 19 pacientes con adenoma tubular fueron seleccionados para el estudio. Además, 58  
45 muestras normales de mucosa de colon normal se incluyeron en el estudio como material de referencia. Las muestras fueron fijadas de forma rutinaria en formol neutro y embebidas en parafina. Se cortaron 1-3 secciones de 50 micras de espesor y se aislaron los núcleos como se describe en el Ejemplo 3. El ensayo FISH específico de NAV3 se realizó como se describe en el Ejemplo 6.

**Resultados**

50 [0120]

a) El análisis de los resultados FISH de células de interfase de líneas celulares de cáncer de colon (SW 403 y SW480) se muestran en la Tabla 10. Ambas líneas celulares de cáncer mostraron tipo de delección dominante de 3

centrómeros 2 NAV3 en casi todas las células estudiadas. Las líneas celulares de colon normal no mostraron alteraciones en el número de copias del gen NAV3.

**Tabla 10. Resultados NAV3FISH con líneas celulares de cáncer de colon**

Línea celular	Células normales (2cen2NAV3) (% de células estudiadas)	Células poliploides (cen>2) (% de células estudiadas)	Células con NAV3 suprimido (cen>NAV3) (% de células estudiadas)
SW403	5	95	92
SW480	4	96	92

- 5 b) El análisis de los resultados FISH de células en metafase de líneas celulares de cáncer de colon (CCL-248, TS 403, SW480, RKO, DLD, HCA7, LIM1215 y LoVo) se muestran en la Tabla 11. La delección de NAV3 se detectó en la gran mayoría de las células en metafase en dos líneas celulares MSS (CCL-248, SW 403). También la línea celular RKO mostró abundantes delecciones de NAV3. Muchas de las amplificaciones de NAV3 se detectaron en la línea celular DLD (MSI). También la línea SW480 (SMS) mostró más señales del centrómero que señales de NAV3. Algunas delecciones de NAV3 se detectaron en la línea celular HCA7.

**Tabla 11. Resultados NAV3FISH de células en metafase con líneas celulares de cáncer de colon**

Línea celular	Tipo	Sonda	Células con NAV3 suprimido (cen>NAV3) (% de células estudiadas)	Células con NAV3 amplificado (cen<NAV3) (% de células estudiadas)
CCL-248	MSS	36P3	9/10 (90%)	0/10 (0%)
SW 403	MSS	36P3	6/7 (86%)	0/7 (0%)
SW480	MSS	36P3	2/10 (20%)	2/10 (20%)
RKO	MSI	136F16	12/29 (41%)	0/29 (0%)
		36P3	6/14 (43%)	0/14 (0%)
		both	3/7 (43%)	0/7 (0%)
DLD	MSI	136F16	0/8 (0%)	8/8 (100%)
		36P3	0/8 (0%)	8/8 (100%)
		both	0/2 (0%)	2/2 (100%)
HCA7	MSI	136F16	2/10 (20%)	0/10 (0%)
		36P3	0/6 (0%)	0/6 (0%)
		both	0/13 (0%)	0/13 (0%)
LIM1215	MSI	136F16	0/2 (0%)	0/2 (0%)
		36P3	0/10 (0%)	0/10 (0%)

10

(continuación)

Línea celular	Tipo	Sonda	Células con NAV3 suprimido (cen>NAV3) (% de células estudiadas)	Células con NAV3 amplificado (cen<NAV3) (% de células estudiadas)
		ambas	0/15 (0%)	0/15 (0%)
LOVO	MSI	ambas	0/1 (0%)	0/1 (0%)

15

- c) El ensayo NAV3FISH con núcleos extraídos de muestras de pacientes embebidas en parafina mostró cambios en el número de copias de NAV3 en el 31% de las muestras de adenocarcinoma colorectal MMS, el 7% de las muestras de adenocarcinoma colorectal tipo MSI (1 muestra de 14) y en el 16% de las muestras de adenoma tubular. Los resultados se muestran en la Tabla 12. La Figura 6 muestra la comparación de los resultados NAV3 FISH de muestras de colon normal y de adenocarcinoma colorectal tipo MSS. Las células cancerosas son diferentes de las células normales de la mucosa de colon en términos de poliploidía y número de copias de NAV3.

**Tabla 12. Análisis de los resultados NAV3FISH utilizando diferentes muestras de colon. En cada muestra, 200 células fueron analizadas. Las células con NAV3 suprimido contienen mayor número de marcadores del centrómero que marcadores de NAV3 y las células con NAV3 amplificado mayor número de marcadores de NAV3 que marcadores del centrómero**

Muestra de colon	Muestras con NAV3 aberrante	Rango de supresión (% de células estudiadas)	Rango de amplificación (% de células estudiadas)
CRC, MSS	11/36	5-41	8-28
CRC, MSI	1/14	7.5	-
Adenoma tubular	3/19	7-11	8
Colon normal	0/58	-	-



## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método in vitro de predicción de iniciación de tumor, progresión de tumor y / o carcinoma, **caracterizado por** la detección de la presencia o la ausencia de anomalías genéticas en 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, indicando la presencia de dichas anomalías genéticas una iniciación o progresión de tumores de origen epitelial y / o carcinoma en una muestra biológica.
- 2.- Un método in vitro de identificación de un individuo con potencial para desarrollar carcinoma de origen epitelial, el método comprendiendo la detección de anomalías genéticas en 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, indicando dichas anomalías genéticas tumores de origen epitelial.
- 10 3.-Un método in vitro para predecir la progresión de carcinomas de origen epitelial y / o la transformación de los mismos a una variante agresiva, **caracterizado por** la detección de anomalías genéticas en el 12q21.2 en un gen neuron navigator 3 (NAV3) o un fragmento del mismo, en donde anomalías indican la probabilidad de desarrollar un carcinoma.
- 4.- Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, **caracterizado porque** el tumor de origen epitelial es un adenoma y / o un carcinoma.
- 15 5.- Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, **caracterizado porque** el tumor de origen epitelial es en el colon, recto, pulmón, vejiga urinaria, mama, o en células escamosas o basales.
- 6.- Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, **caracterizado porque** las anomalías genéticas se determinan por hibridación in situ con fluorescencia (FISH).
- 20 7.- Un método según las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por** la determinación de la pérdida de heterocigosidad (LOH) del gen NAV3 o un fragmento funcional del mismo, en donde la LOH de NAV3 es indicativa de progresión del tumor.
- 8.- Un método según las reivindicaciones 1-7 **caracterizado porque** las anomalías genéticas del gen NAV3 se determinan en células haploides, diploides y / o poliploides.
- 25 9.- Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, **caracterizado porque** las células tumorales son de microsatélites estables o de microsatélites inestables.
10. Un uso in vitro del gen NAV3 o un fragmento del mismo para predecir iniciación de tumor, progresión de tumor y / o carcinoma, indicando las anomalías genéticas de NAV3 tumores de origen epitelial.
- 30 11.- Un uso in vitro de marcadores genéticos en 12q21.2 para la predicción de iniciación de tumor, progresión de tumor y / o carcinoma, **caracterizado por** la detección de la presencia o ausencia de anomalías genéticas de NAV3, indicando dichas anomalías genéticas tumores de origen epitelial.
12. Un uso según la reivindicación 11, **caracterizado porque** los marcadores genéticos son D12S326 y / o rs1852464.

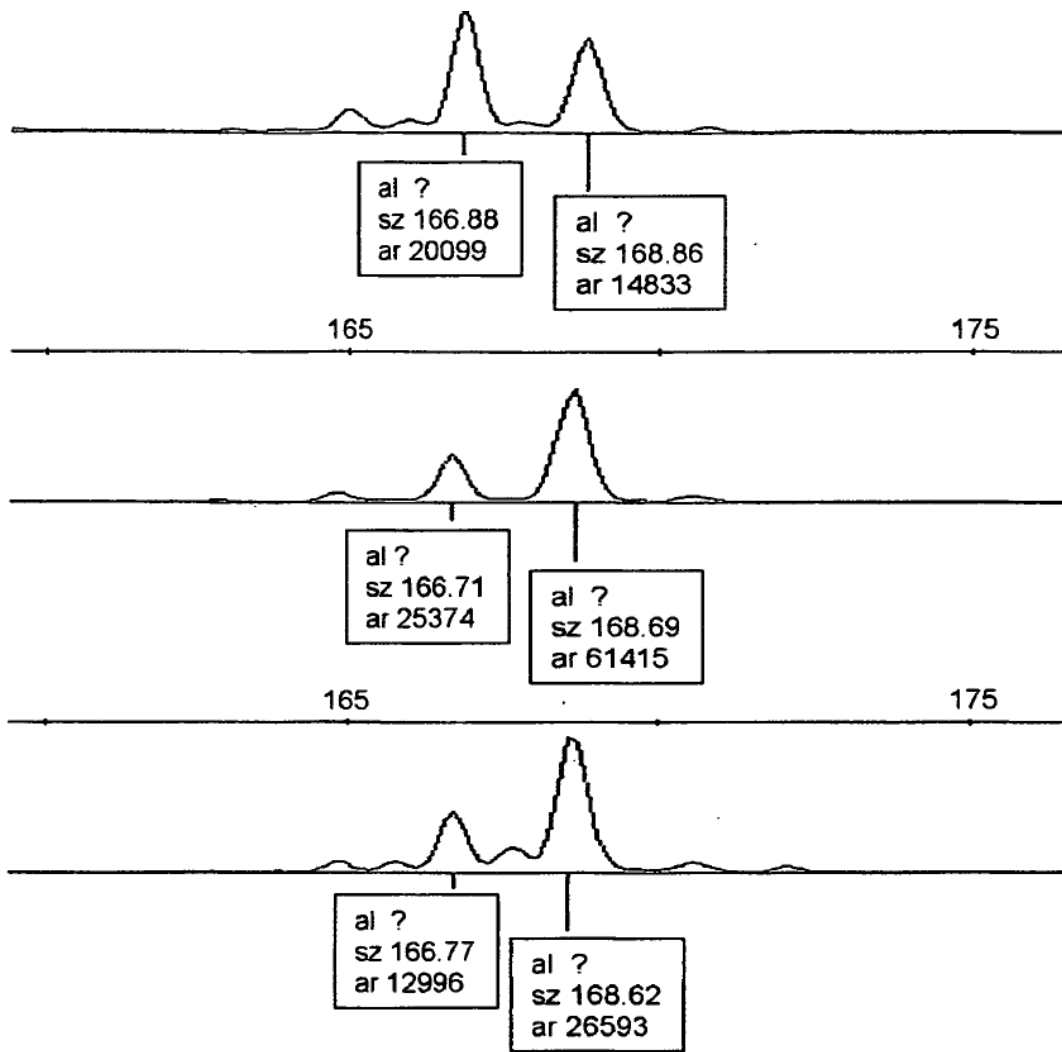


Figura 1

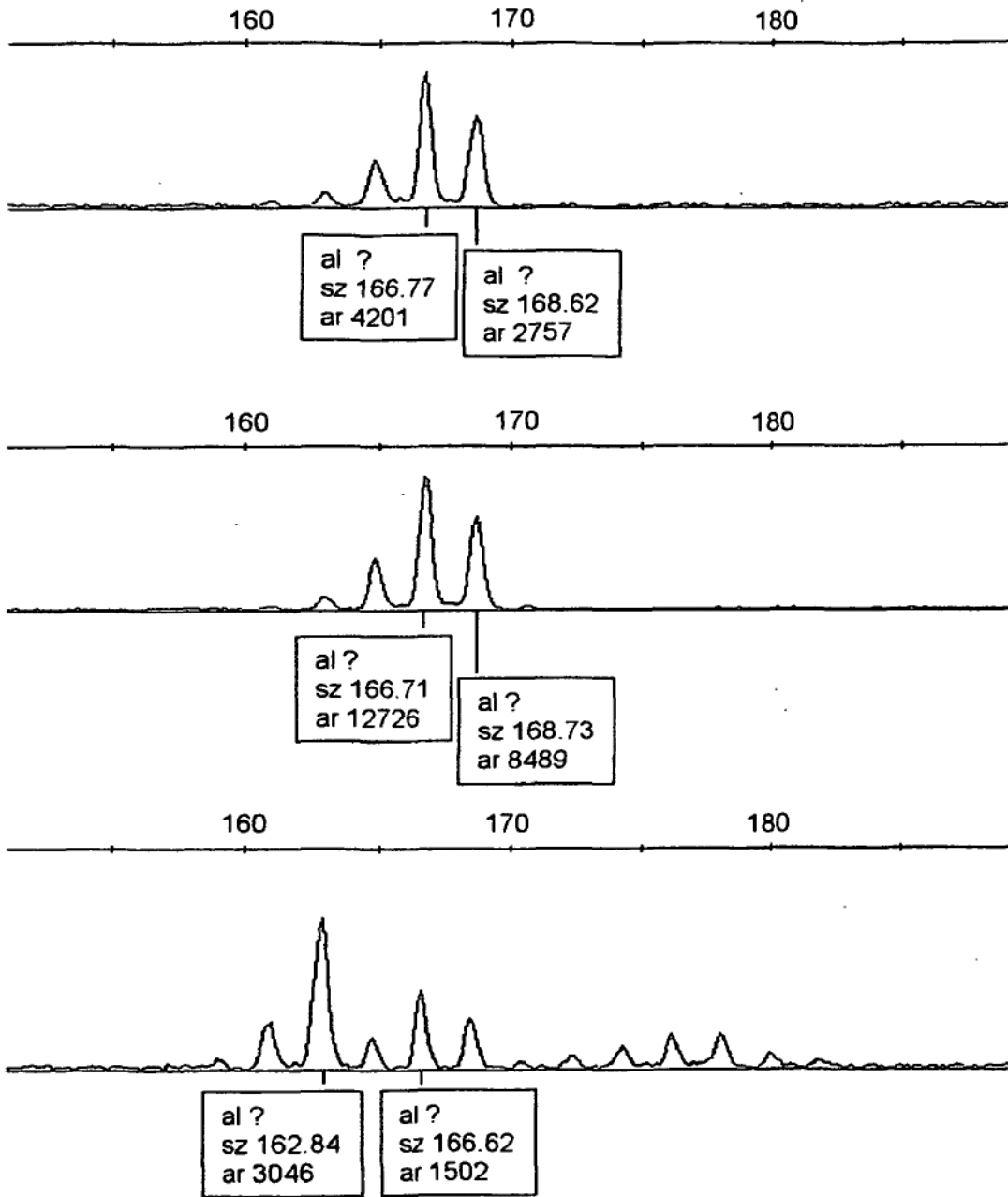


Figura 2

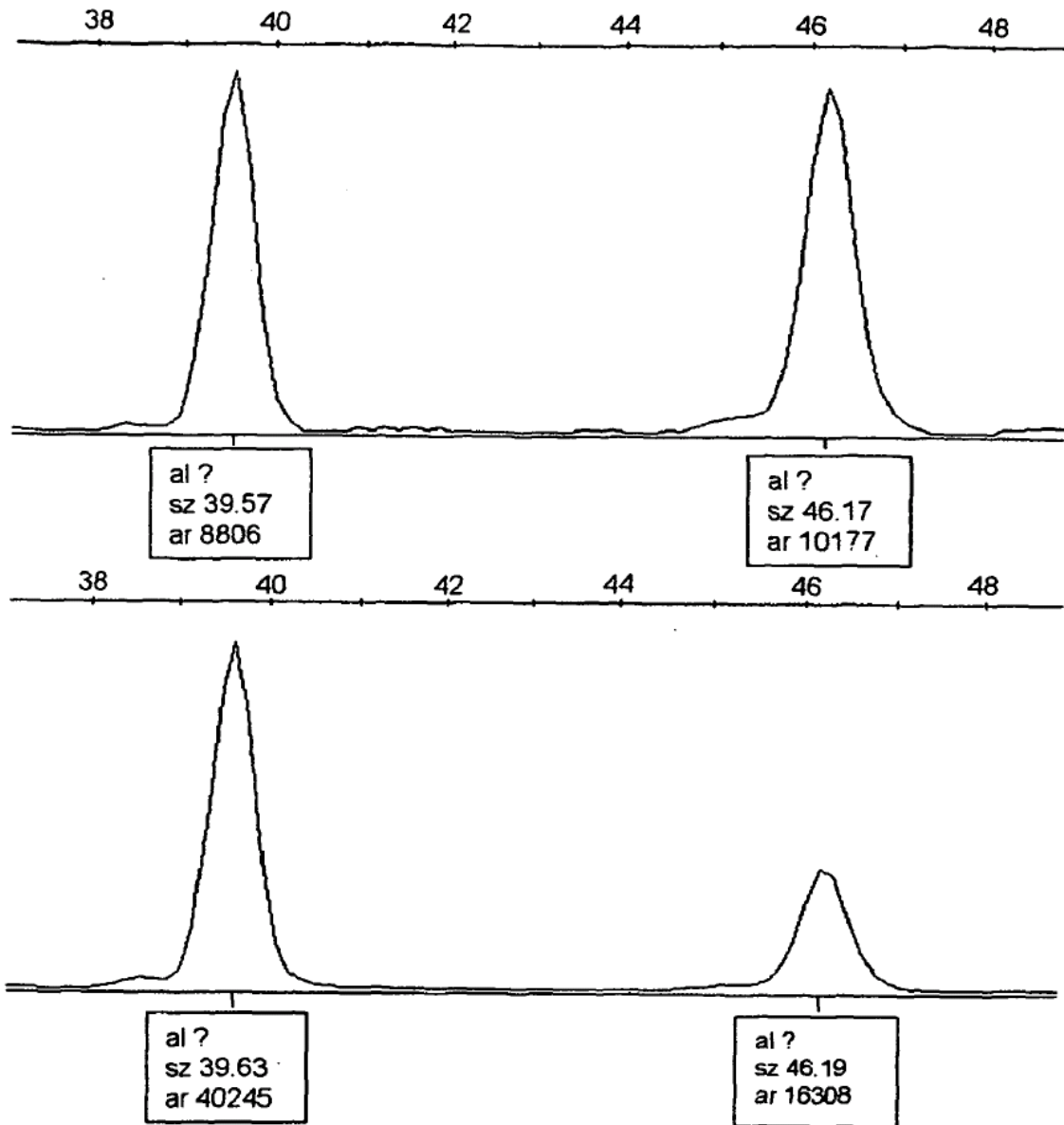


Figura 3

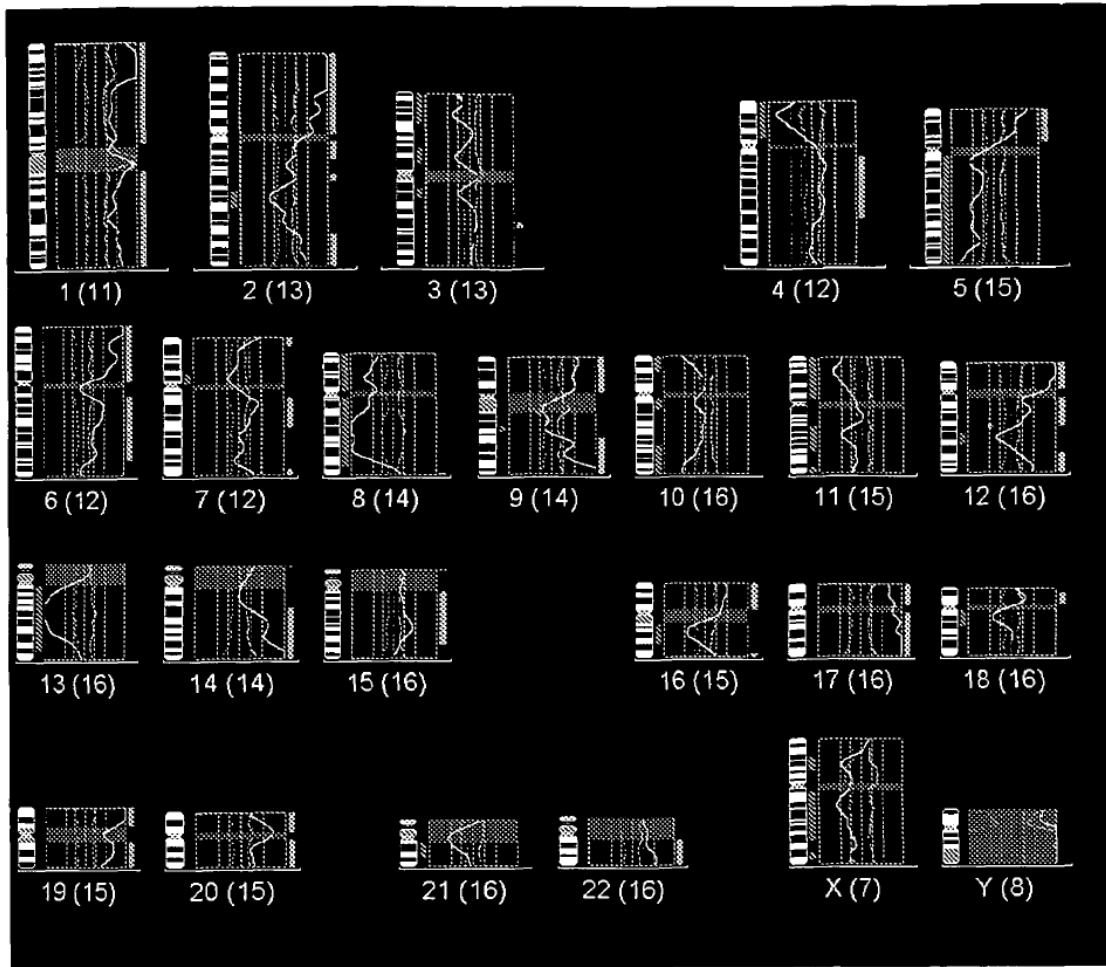


Figura 4

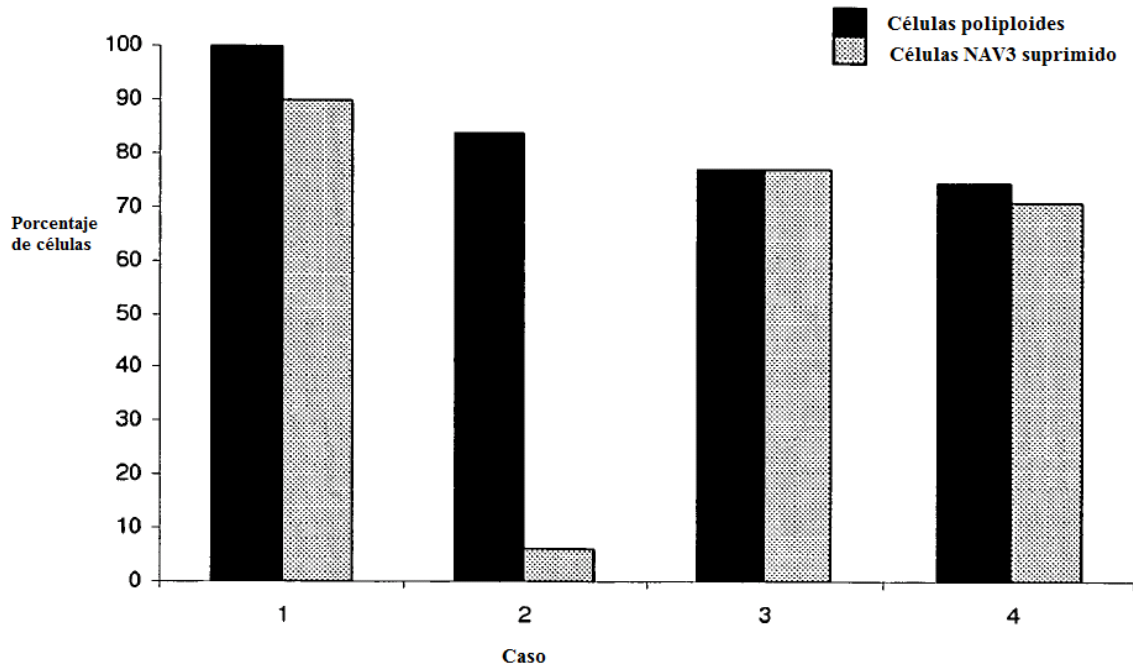


Figura 5a

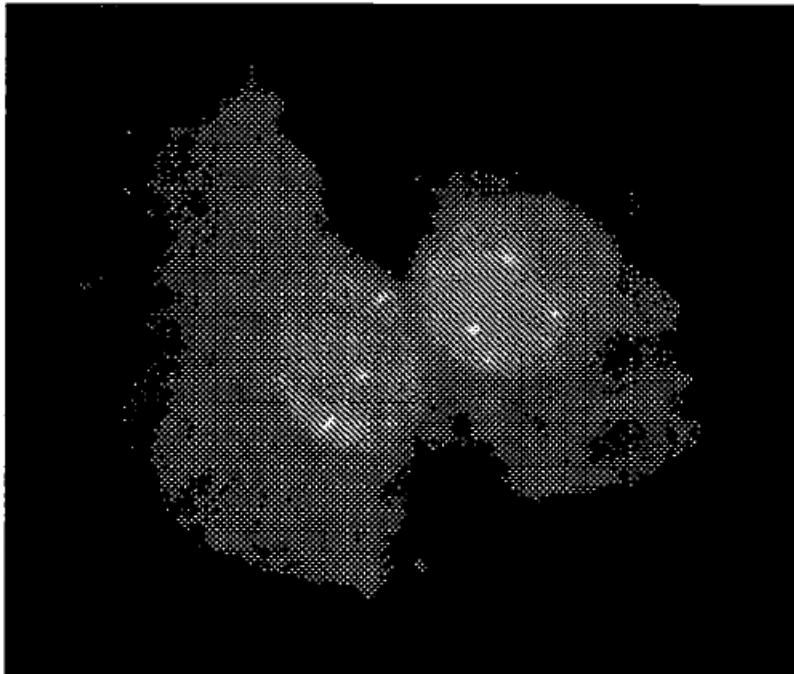


Figura 5b

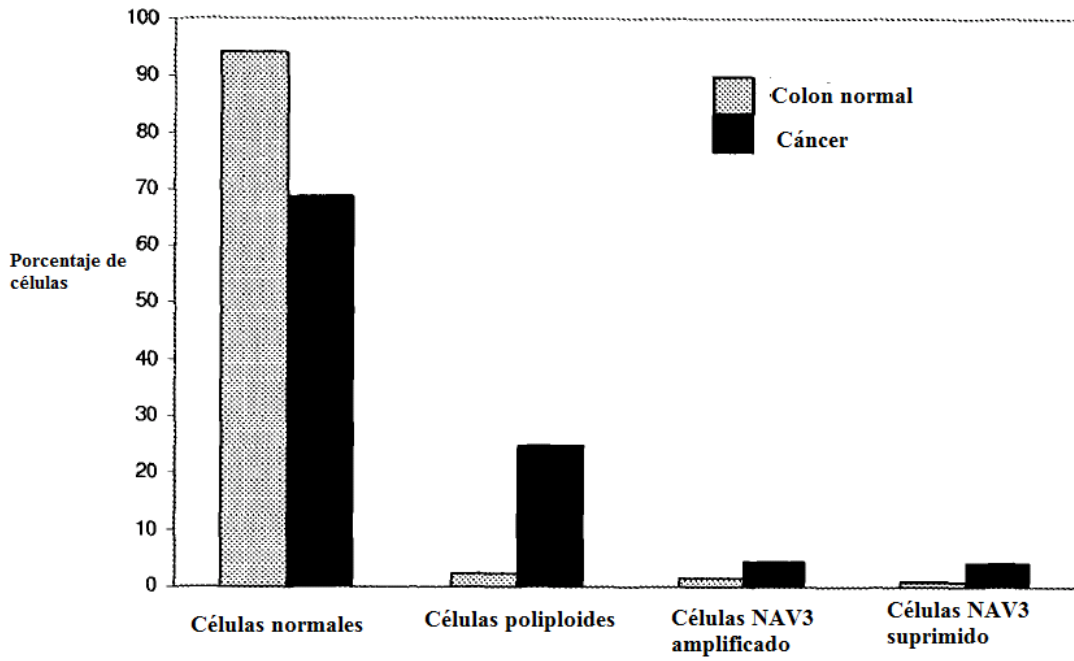


Figura 6