

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 497**

51 Int. Cl.:

**C40B 40/06** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C40B 30/04** (2006.01)

**C40B 50/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11755585 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2547809**

54 Título: **Métodos, conjuntos de sondas, y equipos para detección de eliminación de gen supresor de tumores mediante hibridación in situ de fluorescencia**

30 Prioridad:

**15.03.2010 US 313916 P**

**15.03.2010 CA 2696545**

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

**21.12.2015**

73 Titular/es:

**QUEEN'S UNIVERSITY AT KINGSTON (50.0%)**

**Kingston, Ontario K7L 3N6, CA y**

**KINGSTON GENERAL HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SQUIRE, JEREMY, A. y**

**YOSHIMOTO, MAISA**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 554 497 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, conjuntos de sondas, y equipos para detección de eliminación de gen supresor de tumores mediante hibridación in situ de fluorescencia

5

Esta invención se relaciona con métodos, conjuntos de sondas y equipos para uso en ensayos para detectar eliminaciones de genes supresores de tumor. También se describen aquí métodos para preparar dichos conjuntos de sonda y optimizar dichos ensayos. Los métodos descritos aquí se pueden utilizar para detectar eventos cromosómicos tales como eliminaciones, amplificaciones, translocaciones y otros eventos cromosómicos en muestras tales como tumores sólidos o de sangre, como en secciones delgadas embebidas en parafina fijadas con formalina (FFPE), biopsias de aspiración con aguja fina (FNA), frotis, etc. Los eventos cromosómicos pueden incluir genes tales como genes supresores de tumores, oncogenes asociados y/o proto-oncogenes.

10

El conocimiento de si se suprimen las células cancerosas o precancerosas por un gen supresor de tumor es de manera general útil para mejorar la exactitud o elección del tratamiento de diagnóstico y/o pronóstico. Es común para las muestras de células que se sospecha son cancerosas o precancerosas, tal como de crecimientos cancerosos o que se sospecha son precancerosos que incluyen tumores, neoplasias, hiperplasias, etc., se proporcionen para análisis de laboratorio, por ejemplo, como muestras conservadas, fijas, tales como muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE). De forma notable, la conservación de estas muestras también permite que los estudios retrospectivos que se van a realizar, puedan proporcionar información útil para realizar pronósticos futuros y selecciones de tratamiento. La eliminación de un gen supresor de tumor se puede ensayar en las muestras FFPE mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), en la que se pone en contacto la muestra con una sonda para el gen de interés y, de manera general, por lo menos una sonda de control y/o contraindicación nuclear. Ejemplos de genes supresores de tumores incluyen PTEN, p53, p16 (también conocido como CDKN2A), RB1, DCC, BRCA1, BRCA2, y APC. Las sondas se pueden visualizar con fluorescencia y las señales FISH resultantes se analizan para determinar si se presenta una eliminación.

15

20

25

Cuando las muestras de tumores sólidos se proporcionan como muestras fijadas y conservadas, de manea general se proporcionan como secciones de varias micras de espesor. Por lo tanto, la parte del núcleo que contiene el gen supresor de tumor se puede someter a ablación durante el seccionamiento de la muestra. Este fenómeno a menudo resulta en artefactos de truncamiento nuclear, provocando que las células realmente no alberguen una eliminación de un gen supresor de tumor aparezcan ya que se pierde por lo menos una copia del gen supresor de tumor. Los artefactos de truncamiento pueden ocurrir en las células de interfase, en las que los cromosomas se descondensan y distribuyen dentro del volumen tridimensional de los núcleos de forma esférica que constituyen secciones de tejido de patología de rutina. En las células en metafase, los cromosomas ~46 están presentes como, estructuras planas, en forma de rodillo, lineales, que generalmente se pueden depositar sobre la superficie del portaobjetos de microscopio sin truncamiento. De hecho, en muestras clínicas, que incluyen muestras de crecimientos sólidos precancerosos o que se sospechan son cancerosos, tales como tumores sólidos, la mayoría de las células de manera general están en interfase. Las muestras representativas de células en metafase pueden ser difíciles o imposibles de obtener a partir de muestras utilizadas para análisis retrospectivos, o a partir de muestras tomadas de un paciente, fijadas, conservadas, y enviadas a un laboratorio fuera del sitio para análisis.

30

35

40

Por lo tanto los artefactos de truncamiento nuclear impactan negativamente en el rendimiento de los ensayos de eliminación de supresores de tumores en función de FISH. Con el fin de protegerse contra la posibilidad de falsos positivos (es decir una conclusión incorrecta de que ha ocurrido una eliminación del supresor de tumor), un umbral mínimo para la frecuencia de eliminación aparente se puede fijar, en donde los resultados se consideran negativos o a lo sumo inconcluyentes para supresión cuando la frecuencia de eliminación aparente no excede el umbral. El umbral se puede basar en una estimación de la frecuencia de eliminación de artefactos hechos utilizando células de control; con el fin de considerar un nivel de supresión observado significativo, puede ser necesario exceder la frecuencia de eliminación de artefactos en una cantidad tal como tres desviaciones estándar de la frecuencia de eliminación de artefactos. El uso de dichos umbrales mínimos puede dar lugar a una compensación de la sensibilidad, sin embargo, en que puede ser difícil o imposible llamar eliminaciones cuando, por ejemplo, es bajo el número de células en la muestra que alberga la supresión, o cuando las células en la muestra son genéticamente heterogéneas.

45

50

55

El homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) es una proteína que en los humanos está codificada por el gen PTEN. La inactivación de este gen supresor de tumor se ha observado en muchos tipos de cánceres (Cristofano AD et al., PTEN is essential for embryonic development and tumour suppression, Nature Genetics 1998; 19:348- 355) y en el defecto del desarrollo hereditario conocido como Síndrome de Cowden (Marsh DJ et al., Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families, J. Med. Genet. 1998; 35:881-885). En los últimos años, se ha hecho evidente que las eliminaciones genómicas de una sonda de 368 kb o más alrededor del locus PTEN son comunes en el cáncer de próstata, en función del uso de una sonda de 368 kb que se hibrida con PTEN (Yoshimoto et al., Cancer Genetics and Cytogenetics 2006; 169:128-137), y su presencia lleva un pronóstico desfavorable (Yoshimoto et al., British Journal of Cancer 2007; 97:678- 685; Yoshimoto et al., Modern Pathology 2008; 21 :1451-1460). Por lo tanto, los ensayos precisos para eliminaciones de genes supresores de tumores tales como PTEN son clínicamente importantes. Sircar et al (J. Pathol 2009; 218: 505-513) informa que las eliminaciones genómicas PTEN están asociadas con la activación de señalización p-Akt y AR en el peor resultado, cáncer de próstata resistente a hormonas.

60

65

- Adicionalmente, subsiste la necesidad de una mayor capacidad para detectar eliminaciones de una manera que distingue las eliminaciones por tamaño. Los tumores de próstata en el que hay una supresión PTEN homocigota, en la que por lo menos uno de los eventos de supresión elimina un área del cromosoma mayor que solo PTEN y sus alrededores inmediatos, puede ser más probable que sea metástasis de tumores o tenga un mayor potencial para metástasis. Por lo tanto, los conjuntos de sonda y métodos para dichas supresiones pueden ser útiles en el pronóstico y para tomar decisiones sobre el tratamiento, así como en la investigación adicional en la progresión y clasificación de cánceres de próstata.
- De acuerdo con lo anterior, subsiste la necesidad de métodos, conjuntos de sondas, y equipos para uso en ensayos para detectar eliminaciones de genes supresores de tumor, tales como, por ejemplo, PTEN, que reduce la incidencia de artefactos de truncamiento nuclear, y métodos para preparar dichos conjuntos de sondas y optimizar dichos ensayos.
- La presente invención proporciona un método para realizar un ensayo en función de hibridación in situ con fluorescencia para eliminación de un gen supresor de tumor que comprende:
- (a) realizar hibridación in situ con fluorescencia (FISH) con un conjunto de sondas sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células, en donde el conjunto de sondas comprende por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor;
  - (b) enumerar las señales FISH desde por lo menos una primera y por lo menos una segunda sondas de flanqueo y por lo menos una sonda objetivo en la pluralidad de células;
  - (c) proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos para (1) una supresión que afecta solo la sonda objetivo, (2) una supresión que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, (3) una supresión que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, o (4) una supresión que afecta la sonda objetivo, la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, la frecuencia de eliminación de artefactos se selecciona de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto;
  - (d) determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), para el mismo tipo de evento de supresión que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos de la etapa (c), la frecuencia de eliminación aparente se selecciona de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota aparente y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota aparente, en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación hemicigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto en la etapa (c), y en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación homocigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto en la etapa (c); y
  - (e) determinar si la muestra comprende células con una supresión hemicigota del gen supresor de tumor en función de si la frecuencia de eliminación hemicigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto, o determinar si la muestra comprende células con una eliminación homocigota del gen supresor de tumor en función de si la frecuencia de eliminación homocigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefacto.
- La invención también proporciona un conjunto de sondas que comprenden por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN, por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU, y por lo menos una sonda que se hibrida con WAPAL, en donde la sonda que se hibrida con WAPAL se deriva de RP11-661 D10.
- Los métodos y composiciones de esta invención se basan en parte en el descubrimiento que el desempeño (especificidad, sensibilidad, y/o significación estadística) de ensayos de eliminación de supresor de tumor en función de FISH se puede optimizar al proporcionar conjuntos de sondas que pueden reducir las fuentes de error tales como artefactos de truncamiento. Los conjuntos de sondas comprenden por lo menos una primera sonda de flanqueo, una sonda objetivo, y una segunda sonda de flanqueo, que se hibrida en las posiciones centroméricas a, en o adyacentes a, y teloméricas al gen supresor de tumor, respectivamente. El gen supresor de tumor puede estar propenso a supresión en determinados tipos de células cancerosas o precancerosas; por ejemplo, el PTEN es propenso a supresión por lo menos en neoplasmas de próstata. La distancia entre el sitio de hibridación de la primera o segunda sonda de flanqueo

y la sonda objetivo se puede acortar en una escala de longitud citogenética, por ejemplo, una distancia que varía desde 500 kb hasta 10 o 20 Mb.

En algunas realizaciones, los sitios de hibridación de la primera y segunda sondas de flanqueo se separan del sitio de hibridación de la sonda objetivo mediante primera y, opcionalmente, segundas zonas límite, respectivamente (por ejemplo, características de arquitectura genómica cercanas a estos sitios tales como duplicados de segmento y variaciones en el número de copias; discutidas adicionalmente adelante). Los sitios de hibridación de la primera y segunda sondas de flanqueo pueden estar dentro o adyacentes, en una escala de longitud citogenética, para la primera y segunda (si está presente) zonas límite, respectivamente.

Los conjuntos de sondas pueden optimizar el desempeño de los ensayos en función de FISH para aberraciones genómicas debido a la posición de sus sitios de hibridación. Posicionar las sondas de flanqueo cerca al sitio de hibridación de la sonda objetivo y/o adyacente a una zona límite, pero distal al objetivo de ensayo para la zona límite, puede servir para minimizar los resultados inconclusos y/u observaciones de artefactos, que incluyen falsos positivos que resultan del truncamiento nuclear.

De acuerdo con lo anterior, esta divulgación describe métodos para realizar ensayos en función de FISH, métodos para preparar sondas para ensayos de eliminación de supresor de tumor en función de FISH, y métodos para medir el efecto de truncamiento nuclear en un ensayo en función de FISH para supresión de supresor de tumor. Esta descripción también describe conjuntos de sondas y composiciones y equipos que comprenden sondas útiles para ensayos de eliminación de supresor de tumor en función de FISH.

Un método para preparar un conjunto de sondas para un ensayo de eliminación de supresor de tumor en función de FISH, puede comprender:

(a) identificar por lo menos una zona límite en un cromosoma, dicha cromosoma que comprende un gen supresor de tumor, en donde por lo menos una zona límite comprende una primera zona límite centromérica al gen supresor de tumor;

(b) proporcionar por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una secuencia ácidos nucleicos dentro de la primera zona límite o a una secuencia de ácidos nucleicos distal al gen supresor de tumor con relación a la primera zona límite;

(c) proporcionar por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos teloméricos al gen supresor de tumor; y

(d) proporcionar por lo menos una sonda objetivo que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos en el gen supresor de tumor entre las zonas límite.

Un método para realizar un ensayo en función de FISH para eliminación de un gen supresor de tumor puede comprender:

(a) realizar FISH con un conjunto de sondas sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células,

en donde el conjunto de sondas comprende por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor;

(b) enumerar las señales FISH desde por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo y por lo menos una sonda objetivo en la pluralidad de células;

(c) proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos seleccionada de (i) una frecuencia de eliminación hemigota de artefacto y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto;

(d) determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente seleccionada de (i) una frecuencia de eliminación hemigota aparente y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota aparente a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación hemigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto en la etapa (c), y en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación homocigota aparente sin no se proporciona una frecuencia de eliminación hemigota de artefacto en la etapa (c); y

(e) determinar si la muestra comprende células con una supresión hemigota del gen supresor de tumor en función de si la frecuencia de eliminación hemigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemigota de artefacto, o determinar si la muestra comprende células con una eliminación homocigota del gen supresor

de tumor en función de si la frecuencia de eliminación homocigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefacto.

5 Un método para realizar un ensayo en función de FISH para determinar de forma distinguible supresiones pequeñas y grandes de un gen supresor de tumor puede comprender:

10 (a) realizar FISH sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células con un conjunto de sondas, o realizar FISH sobre una primera muestra celular que comprende una pluralidad de células con un primer subconjunto de sondas compuesto por un conjunto de sondas y realizar FISH sobre una segunda muestra celular que comprende una pluralidad de células del mismo individuo como la primera muestra celular con un segundo subconjunto de sondas compuesto por dicho conjunto de sondas,

15 en donde el conjunto de sondas comprende por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor, por lo menos una primera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flaqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una de por lo menos una tercera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el sitio de hibridación de la primera sonda de flaqueo y por lo menos una cuarta sonda de flaqueo que se hibrida con una posición telomérica para el sitio de hibridación de la segunda sonda de flaqueo;

20 (b) enumerar las señales FISH desde por lo menos una sonda objetivo y por lo menos primera, por lo menos segunda, y por lo menos una de por lo menos la tercera y por lo menos la cuarta sondas de flaqueo en la pluralidad o pluralidades de células;

25 (c) proporcionar por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo;

30 (d) proporcionar por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos para eliminaciones del gen supresor de tumor en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo;

(e) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo;

35 (f) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente para eliminaciones del gen supresor de tumor en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo; y

40 (g) determinar si la muestra comprende células con una supresión pequeña del gen supresor de tumor en función de si por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefacto, y determinar si la muestra comprende células con una eliminación grande del gen supresor de tumor en función de si por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una segunda frecuencia de eliminación homocigota de artefacto.

45 Un método para optimizar un ensayo en función de FISH para supresión de un gen supresor de tumor, puede comprender:

50 (a) proporcionar una pluralidad de conjuntos de sondas candidatos, en donde cada conjunto de sondas candidato comprende por lo menos una primera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flaqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor;

(b) para cada conjunto de sondas candidato,

55 (i) realizar FISH con el conjunto de sondas candidato sobre por lo menos una muestra celular que comprende una pluralidad de células que comprende un número euploide de copias intactas del gen supresor de tumor;

60 (ii) enumerar las señales FISH desde por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo y por lo menos una sonda objetivo del conjunto de sondas candidato en la pluralidad de células de por lo menos una muestra; y

(iii) determinar una frecuencia de eliminación de artefactos a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (ii); y

65 (c) seleccionar un conjunto de sondas a partir de los conjuntos de sondas candidatos para uso en el ensayo en función de FISH optimizado para supresión de un gen supresor de tumor, en donde se determina que el conjunto de sondas seleccionado tiene una frecuencia de eliminación de artefactos favorable en la etapa (iii).

Un método para realizar un ensayo en función de FISH para una supresión en las bandas 21q22.13-21q22.3 del cromosoma 21 puede comprender:

5 (a) realizar FISH con un conjunto de sondas sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células, en donde el conjunto de sondas comprende:

10 por lo menos una sonda objetivo que se hibrida con por lo menos un gen objetivo ubicado entre TMPRSS2 y ERG o alternativamente, ubicado dentro de la región abarcada por los genes TMPRSS2 y ERG,

15 por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para por lo menos un gen objetivo, y

20 por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica para por lo menos un gen objetivo;

(b) enumerar las señales FISH desde por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo y por lo menos una sonda objetivo en la pluralidad de células;

25 (c) proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos seleccionada de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto;

30 (d) determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente seleccionada de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota aparente y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota aparente a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación hemicigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación homocigota de artefacto en la etapa (c), y en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación homocigota aparente sin no se proporciona una frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto en la etapa (c); y

35 (e) determinar si la muestra comprende células con una supresión hemicigota de por lo menos uno de los genes objetivo en función de si la frecuencia de eliminación hemicigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto, o determinar si la muestra comprende células con una eliminación homocigota de por lo menos uno de los genes objetivo en función de si la frecuencia de eliminación homocigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefacto.

Un método para realizar un ensayo en función de FISH para detectar de forma distinguible supresiones pequeñas y grandes en las bandas 21q22.13-21q22.3 del cromosoma 21 puede comprender:

40 (a) realizar FISH sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células con un conjunto de sondas, o realizar FISH sobre una primera muestra celular que comprende una pluralidad de células con un primer subconjunto de sondas compuesto por un conjunto de sondas y realizar FISH sobre una segunda muestra celular que comprende una pluralidad de células del mismo individuo como la primera muestra celular con un segundo subconjunto de sondas compuesto por dicho conjunto de sondas,

45 en donde el conjunto de sondas comprende:

por lo menos dos sondas objetivo que se hibridan con por lo menos dos genes objetivo ubicados entre TMPRSS2 y ERG,

50 por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para por lo menos dos genes objetivo,

por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica para por lo menos dos genes objetivo;

55 y, opcionalmente, por lo menos una de por lo menos una tercera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para el sitio de hibridación de la primera sonda de flanqueo y por lo menos una cuarta sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica para el sitio de hibridación de la segunda sonda de flanqueo;

60 (b) enumerar las señales FISH desde por lo menos dos sondas objetivo y por lo menos primera, por lo menos segunda, y, si está presente, por lo menos una por lo menos tercera y por lo menos cuarta sondas de flanqueo en la pluralidad o pluralidades de células;

65 (c) proporcionar por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos para supresiones de por lo menos uno de los genes objetivo con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo, uno de los criterios de valoración está entre dos genes objetivo;

(d) proporcionar por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos para supresiones de por lo menos uno de los genes objetivo en donde (i) ni el criterio de valoración está entre dos genes objetivo, o (ii) si por lo menos se utiliza una de por lo menos tercera y por lo menos la cuarta sondas de flanqueo, por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo;

(e) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente para supresiones de por lo menos uno de los genes objetivo con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo, uno de los criterios de valoración está entre dos genes objetivo;

(f) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente para supresiones de por lo menos uno de los genes objetivo en donde (i) ni el criterio de valoración está entre dos genes objetivo, o (ii) si se utiliza por lo menos una de por lo menos tercera y por lo menos la cuarta sondas de flanqueo, por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo; y

(g) determinar si la muestra celular comprende, o la primera y segunda muestras celulares comprenden, células con una supresión pequeña de por lo menos uno de los genes objetivo en función de si por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefacto, y determinar si la muestra celular comprende, o la primera y segunda muestras celulares comprenden, células con una eliminación grande de por lo menos uno de los genes objetivo en función de si por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una segunda frecuencia de eliminación homocigota de artefacto.

También se describe aquí un conjunto de sondas que comprenden por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN, por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU, y por lo menos una sonda que se hibrida con TSPAN1 5.

También se describe aquí un conjunto de sondas que comprenden por lo menos una sonda que se hibrida con por lo menos un gen objetivo ubicado entre TMPRSS2 y ERG, por lo menos una sonda que se hibrida con DYRK1A o ERG, y por lo menos una sonda que se hibrida con TMPRSS2 o U2AF1.

Se debe entender que la descripción general anterior y la siguiente descripción de las realizaciones son solo de ejemplo y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica.

## Descripción de las realizaciones

### A. Información general

Se describen aquí métodos para realizar ensayos en función de FISH; métodos para preparar sondas para ensayos de eliminación de supresor de tumor en función de FISH; métodos para optimizar un ensayo en función de FISH para supresión de un gen supresor de tumor; y conjuntos de sondas, composiciones, y equipos que comprenden sondas útiles para ensayos de eliminación de supresor de tumor en función de FISH.

El supresor de tumor se puede seleccionar de PTEN, p53, p16 (también conocido como CDKN2A), RB1, DCC, BRCA1, BRCA2, y APC. Estos supresores de tumor se discuten en, por ejemplo, Chang H et al., Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions, *British Journal of Haematology* 2004; 127:280-284; Kohno T and Yokota J, Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivación de the p16 supresor de tumor gene in human cancer: Deduction from structural análisis of breakpoints for deletions, *DNA Repair* 2006; 5:1273-1281; Friend SH et al., A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma, *Nature* 1986; 323:643-6; Popat S and Houlston RS, A systematic review and meta-análisis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis, *European Journal of Cancer* 2005; 41:2060-2070; Becker K et al., Deleciones de BRCA1/2 and p53 R248W gain-of-function mutation suggest impaired homologous recombination repair in fragile histidine triad negative sebaceous gland carcinomas, *British Journal of Dermatology* 2008; 159:1282-1289; and Castellsague E et al., Detección de APC gene deletions utilizando quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments, *Clin. Chem.* 2008; 54:1132-40.

El supresor de tumor se puede seleccionar de un supresor de tumor ubicado en un cromosoma humano en una banda cromosómica seleccionada de 10q23, 17p131, 3q14, 9q24, y 9p21. El supresor de tumor se puede seleccionar de un supresor de tumor ubicado en un brazo de cromosoma humano seleccionado de 10q, 17p, 13q, 9p, 1p, 5q, 19q, 20q, 8p, 12p, y 16q. La presencia de supresores de tumor en las bandas y brazos anteriores se discute, por ejemplo, en Kolomietz E et al., Quantitative PCR identifies a minimal deleted region of 120kb extending from the Philadelphia chromosome ABL translocation breakpoint in chronic myeloid leukemia with poor outcome, *Leukemia* 2003; 17: 1313-1323, 2003; Haase D, Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes, *Ann. Hematol.* 2008; 87:515-526; Reifenberger J et al., Molecular genetic análisis of oligodendroglial tumors muestra preferential allelic deletions on 19q and 1p, *Am. J. Pathol.* 1994; 145:1175-1190; Chang B et al., Integración de Somatic Deletion Análisis of Prostate Cancers and Germline Linkage Análisis of Prostate Cancer Families Reveals dos Small Consensus Regions for Prostate

Cancer Genes at 8p, Cancer Research 2007; 67:4098-4103; and Reiner M et al., Microarray comparative genomic hybridization analysis of tubular breast carcinoma shows recurrent loss of the CDH13locus on 16q, Human Pathology 2008; 39:1621-1629.

5 Las bandas y brazos de cromosoma humanos son como se define en ISCN 2009. Un Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana, Editores: Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ., 2009; Chapter 2, S. Karger Publishers Inc.

10 Las siguientes definiciones son definiciones de términos y conceptos útiles en la comprensión de las realizaciones de la invención y están seguidos por una discusión en detalle de las realizaciones y ejemplos de las realizaciones. Aunque la discusión de las realizaciones está organizada en secciones y subsecciones, se debe entender que muchos de los aspectos discutidos en una subsección tienen relevancia para realizaciones en otras secciones; por ejemplo, una discusión de los tipos de sondas es relevante para los métodos que utilizan las sondas.

15 B. Definiciones

20 Como se utiliza aquí, una “zona límite” es una región de un cromosoma en los cuyos criterios de valoración de eliminación ocurren en la frecuencia aumentada. La ubicación de zonas límite cercanas a un gen supresor de tumor sobre un cromosoma se puede determinar al medir criterios de valoración de eliminaciones para un número de muestras, e identificar una región en la que se agrupan muchos de los criterios de valoración. Se puede medir la eliminación de criterios de valoración en una población de muestras mediante técnicas tales como FISH o hibridación genómica comparativo (CGH) utilizando matrices; esto se discute adicionalmente adelante en sección C.1. En algunas realizaciones, los tamaños de zonas límite son mayores de o igual a 50 kb, 100 kb, 200 kb, 300 kb, 400 kb, 500 kb, o 1 Mb, y/o menos de o igual a 1.5 Mb, 2 Mb, 3 Mb, 4 Mb, o 5 Mb. Las zonas límite incluyen regiones frágil identificados por CGH.

30 Para un gen supresor de tumor dado, tamaño de zona, y condición de interés (por ejemplo, cáncer de próstata), la cromosoma que comprende el gen supresor de tumor puede comprender, en algunas realizaciones, “zonas límite primarias”. Una zona límite primaria es una región centromérica o telomérica a un gen supresor de tumor que comprende eliminación de criterios de valoración en la mayor frecuencia. Pueden existir dos zonas límite primarias, una a cada lado del gen supresor de tumor.

35 El término “supresión” se utiliza aquí en un sentido citogenético para describir una aberración cromosómica estructural en la que falta una parte de un brazo del cromosoma. Por lo tanto, la supresión es la pérdida de material cromosómico y el gen que se mapea a la región particular del genoma que falta. En términos generales, las sondas FISH, tales como sondas preparadas por marcado de ADN a partir de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), se hibridan con una muestra celular, y se utiliza la presencia o ausencia de señal FISH para determinar si está presente una supresión. El tipo más simple de supresión encontrada clínicamente es una supresión intersticial (véase Figura 1). Algunas supresiones son consideradas como microsupresiones, que están por debajo de la resolución de los análisis citogenéticos clásicos que es ADN -5Mb. Dichas pérdidas intersticiales submicroscópicas de ADN se producen desde el interior de un cromosoma y es probable que se produzcan dentro de una citobanda. Pueden ser tan pequeñas como de unos pocos cientos de kb de ADN y normalmente se detectan por métodos FISH.

45 Como se utiliza aquí, un “conjunto de sondas” es un grupo de secuencias de ADN diferencialmente marcadas o capaces de ser diferencialmente marcadas para uso en un ensayo de FISH multicolor. Las sondas de un conjunto de sondas se pueden preparar mediante diversos procedimientos conocidos por aquellos expertos en la técnica, que incluyen, sin limitación, mediante aislamiento del BAC o ADN cósmido a partir de cepas anfitrionas; amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa o amplificación por círculo rodante) de ADN genómico o clonado; o síntesis artificial, por ejemplo, de un conjunto de oligonucleótidos que cubren una región suficientemente grande en el genoma objetivo (por ejemplo, por lo menos 50 kb, o por lo menos 100 kb) para generar señales visibles mediante microscopía de fluorescencia. Cabe señalar que una sonda para una región dada se puede derivar de una pluralidad cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cósmidos, productos de amplificación, oligonucleótidos, etc. En algunos casos, la sonda se puede diseñar para que no contenga secuencias repetidas que también se hibridan con otras regiones del genoma. Se debe entender que un conjunto de sonda “que comprende” sondas “derivado de” BAC específicos está abierto con respecto a los BAC adicionales que se utilizan, ya que contribuyen a las sondas orto explícitamente mencionadas ya sea al proporcionar o contribuir a sondas adicionales. En contraste, un conjunto de sondas “que consiste de” sondas “derivadas de” BAC específicos se cierra con respecto a BAC adicionales que se utilizan. Una sonda que “se hibrida a” un gen especificado tiene un sitio de unión que solapa el gen especificado por lo menos en parte. La sonda también se puede o no hibridar a una parte de los genes vecinos. El término “gen” se utiliza generalmente como una referencia a un área de ADN genómico delimitada por coordenadas cromosómicas tal como se proporciona para un gen dado en la base de datos GeneCards®, v3.05, 13 de febrero 2011 (Véase, por ejemplo, <http://www.genecards.org>).

65 Como se utiliza aquí, una “señal FISH” es un punto de fluorescencia observada en un ensayo FISH resultante de la hibridación de una sonda a su objetivo. Las señales FISH a menudo son similares a punto pero puede que no siempre aparezcan totalmente compactadas, dependiendo del estado de condensación de la cromatina en la célula bajo observación.



Cuando se discute una muestra celular que comprende una pluralidad de células con una característica dada, cabe señalar que no es necesariamente el caso de que todas las células en la muestra celular tengan la característica dada.

5 Como se utiliza aquí, "frecuencia de eliminación de artefacto" se refiere a la frecuencia en un ensayo de supresión con la que se observa la falta de una señal FISH debido a fuentes de error, tales como truncamiento de los núcleos durante la preparación de la muestra o cualquier otra causa no relacionada con el genotipo de las células en la muestra. Las frecuencias de eliminación de artefactos se pueden determinar utilizando muestras de control negativo que no contienen supresiones del gen dirigido en el ensayo FISH.

10 Como se utiliza aquí, "frecuencia de eliminación aparente" se refiere a la frecuencia en un ensayo de supresión con la que se observa la falta de una señal FISH; por lo tanto es la combinación de la frecuencia de eliminación de artefactos (que es generalmente desconocida para una muestra de prueba, pero se puede estimar a partir de una muestra de control como se discutió anteriormente) con la frecuencia de las supresiones reales en la muestra. Una frecuencia de eliminación aparente se puede referir a la frecuencia de la ausencia de un conjunto específico de una o más señales FISH, a la frecuencia total con la que una señal FISH de la sonda objetivo carece, a la frecuencia total con la que dos señales FISH de la sonda objetivo carece, o para la frecuencia total con la que por lo menos una señal FISH de la sonda objetivo carece.

20 Como se utiliza aquí, "número euploide" se refiere al número de copias de un gen que serían normales para una célula de un tipo dado. Un valor típico del número euploide es 2 para locus cromosómicos somáticos en células somáticas, excepto después de replicación y antes de división cuando el número euploide es 4. Existen otras situaciones en las que el número euploide difiere, que son conocidas por aquellos expertos en la técnica; por ejemplo, el número euploide se reduce a la mitad de las células de línea germinal que han sufrido una división meiótica reductora, y en células masculinas para el locus del cromosoma X. El número euploide de locus de cromosomas es 0 en las células femeninas y 1 (o 2, después de replicación y antes de división) en las células masculinas.

25 Una "sonda de enumeración de cromosomas" se refiere a una sonda utilizada para determinar el número de un cromosoma específico en un núcleo; tipos comunes de sondas de enumeración de cromosomas incluyen sondas que se hibridan en el locus centromérico o pericentromérico.

30 "Favorable" cuando se utiliza con referencia a valores de frecuencia supresión de artefactos y/o sensibilidad dados por un conjunto de sondas candidato significa que los valores son por lo menos mejores que los valores promedios de los conjuntos de sondas candidatos probados. Por supuesto, también es posible seleccionar un conjunto de sondas candidato al aplicar criterios más estrictos, tales que los valores de frecuencia de eliminación de artefactos y/o sensibilidad están en por lo menos en 60, 70, 80, 90 o 95 percentiles, quedando claro que los percentiles más altos indican un mejor rendimiento (es decir, más alta sensibilidad o más baja frecuencia de eliminación de artefacto).

35 Un primer locus es "centromérico" a un segundo locus si el primer locus está más cerca del centrómero que el segundo locus.

Un primer locus es "telomérico" a un segundo locus si el primer locus está más cerca que el segundo locus al telómero del brazo donde se produce el primer locus.

40 Cuando un primer locus es "distal" a un segundo locus con relación a un tercio, tal como un sitio de hibridación que es distal a un supresor de tumor en relación con una zona límite, significa que el primer locus está más lejos del segundo locus que es del tercer locus; por lo tanto, si un sitio de hibridación es distal a un supresor de tumor en relación con una zona límite que es centromérica al supresor de tumor, el sitio de hibridación es necesariamente centromérico al supresor de tumor. Del mismo modo, si un sitio de hibridación es distal a un supresor de tumor en relación con una zona límite que es telomérica al supresor de tumor, el sitio de hibridación es necesariamente telomérico al supresor de tumor.

### C. Métodos para preparar sondas

55 La descripción aquí se relaciona, en parte, con la preparación de sondas para tres o más ensayos FISH de color para detección de eliminación. Las sondas se pueden diseñar para tener sitios de hibridación dentro y en o cerca de los extremos de un intervalo genómico de, por ejemplo, entre 0.5-10 megabases (MB) de ADN que se suprimen con frecuencia en los cánceres humanos. Se prepara una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor, y se proporcionan sondas de flaqueo que tienen sitios de hibridación teloméricos y centroméricos con el gen supresor de tumor (Figura 2A).

60 Las sondas de flaqueo preparadas de acuerdo con los métodos descritos aquí pueden tener sitios de hibridación dentro de las zonas límite identificadas y/o distal a un gen supresor de tumor en relación con una zona límite. Una sonda de flaqueo puede tener un sitio de hibridación distal para un gen supresor de tumor con respecto a una zona límite, en el que el centro del sitio de hibridación está cerca al borde próximo de la zona límite, por ejemplo, menos de o igual a 2 Mb, 1,5 Mb, 1 Mb, 500 kb, 200 kb, o 100 kb desde el borde próximo de la zona límite.

## 1. Identificación de zonas de límite

Se pueden identificar zonas de límite utilizando datos de hibridación genómica comparativa derivados de conjuntos de datos de dominio público, como están disponibles en [<http://www.broadinstitute.org/tumorscape/pages/portalHome.jsf>], se describe en Beroukhim R et al., The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature* 2010; 463:99-105; véase también Liu W et al., Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer, *Nat Med* 2009; 15:559-65, y Ferreira BI et al., Array CGH y gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair y cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma, *Oncogene* 2008; 27:2084-2090. Normalmente, estos conjuntos de datos se han obtenido mediante la realización de experimentos de hibridación comparativos con ADN marcado de una pluralidad de muestras cancerosas, por ejemplo, muestras de tumores, que puedan comprender una supresión del gen supresor de tumor de interés para micromatrices genómicas de alta resolución junto con el ADN de referencia marcado distinguible de células normales que no comprenden una supresión. Una vez que se ha determinado el ADN genómico a partir de la pluralidad de muestras que comprenden un subconjunto con una supresión frecuente del supresor de tumor de interés, entonces una zona límite se puede identificar como una región en la que hay un agrupamiento de puntos de ruptura de eliminación identificados como distintas transiciones del número de copias de muestras individuales. Esto se puede identificar a partir de la abundancia promedio por la posición en la población de las muestras cancerosas como un descenso marcado en el número de copias con posición ya que uno se mueve más cerca del supresor de tumor de interés. Por ejemplo, el número de copias promedio con respecto a la de referencia puede disminuir en una cantidad tal como 15%, 20%, o 25% en una longitud tal como 500 kb, 750 kb, 1 Mb, 1.5 Mb, o 2 Mb.

Cuando se realiza un análisis de una serie grande de hibridaciones genómicas comparativas de matriz (por ejemplo, 50, 75, 100, o más) para ensayar la pluralidad de muestras de forma individual, las zonas límite también se pueden identificar al determinar dónde ocurren las transiciones número de copias en cada muestra, agrupando estas posiciones (por ejemplo, en grupos correspondientes a alargamientos de ADN de un tamaño tal como 50 KB, 100 KB, 200 KB, 300 KB, 400 KB, 500 KB, 1 Mb, 1.5 Mb, o 2 Mb), e identificar grupos que se enriquecen de manera significativa para las transiciones número de copias. Se pueden identificar las transiciones de número de copias en muestras individuales, por ejemplo, como se describe en Ferreira BI et al., Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma, *Oncogene* 2008; 27:2084-2090. Se puede utilizar segmentación de rango para identificar segmentos de ganancia y pérdida; se implementa este proceso, por ejemplo, en el software disponible comercialmente Nexus Copy Number versión 4 o 5 (February 2010) (BioDiscovery, El Segundo, CA), como se describe en el manual de usuario.

Adicionalmente al modo anterior de clases de determinación de zona de límites de microhomología de secuencias denominadas "duplicados de segmento" y otras clases denominadas "variación de número de copias" (CNV) pueden estar presentes en la vecindad de una transición de número de copias identificada como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, cuando por lo menos una de estas clases o ambas clases de dichas secuencias están presentes adyacentes a, o cerca de (por ejemplo, dentro de 25, 50, 75, o 100 kb de) una transición de número de copias, la región será seleccionada por análisis de sonda FISH como se describe adelante. Las posiciones de duplicados de segmento se pueden obtener de la Base de Datos de Duplicados de segmentos Database (She X et al., Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome, *Nature* 2004; 431:927-930). Los datos CNV se pueden obtener del Proyecto CNV del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>) véase, por ejemplo, Redon R et al., Global variation in copy number in the human genome, *Nature* 2006; 444:444-454, y Komura D et al., Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays, *Genome Res.* 2006; 16:1575-84. Los CNV y duplicados de segmento también se discuten en Stankiewicz P, Lupski JR, *Genome architecture, redistribuciones and genomic disorders*, *Trends Genet.* 2002; 18:74-82, Beroukhim R et al., The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature* 2010; 463:899-905, and Casci T, *Genome evolution: CNV evolution revisited*, *Nature Reviews Genetics* 2008; 9:814-815.

En algunos métodos, se determina si un grupo de duplicados de segmento está presente cerca de una transición de número de copias. Un grupo puede comprender por lo menos tres, cuatro, cinco, seis, o más duplicados de segmento dentro de una región de 500 kb, 1 Mb o 2 Mb.

Alternativamente o adicionalmente al modo anterior para la determinación de zona límite, las zonas límite se pueden identificar utilizando FISH, al ensayar una gran pluralidad (por ejemplo, 300 o más muestras) probablemente comprende una eliminación del supresor de tumor de interés con una serie de sondas con sitios de hibridación separados a lo largo de la secuencia normal de un cromosoma. Las sondas en la serie se consideran vecinas si no existe una sonda que se una entre ellos. Se determina que una zona límite está presente entre dos sondas vecinas si la sonda más lejana al supresor de tumor de interés genera señales FISH en las muestras que comprenden una supresión significativamente más a menudo que la sonda más cercana al supresor de tumor de interés. Adelante se discuten umbrales significativos.

## 2. Sitios de hibridación

Se considera que una sonda hibrida un sitio si la sonda forma de manera estable pares bases en un grado suficiente para la detección mediante FISH en condiciones de baja rigurosidad, tales como 45% en 2X SSC con 50% de

formamida. Por lo general, la baja rigurosidad se asocia con baja temperatura y alta concentración de sal (Bayani J, Squire JA, Fluorescence in situ Hibridación (FISH), Curr Protoc Cell Biol. 2004; Chapter 22: Unit 22.4).

5 Los sitios de hibridación de sondas preparadas de acuerdo con los métodos descritos aquí se pueden posicionar en varias formas, que incluyen uno o más de los siguientes.

(a) Posicionamiento con relación a objetivos y otros sitios de hibridación

10 Los métodos para preparar conjuntos de sondas descritos aquí normalmente comprenden proporcionar por lo menos una sonda objetivo que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos en un gen supresor de tumor, y por lo menos dos sondas de flanqueo, una de las cuales se hibrida con un sitio centromérico al gen supresor de tumor, y una de las cuales se hibrida telomérica al gen supresor de tumor.

15 (b) Posicionamiento con relación a primera y segunda zonas límite

Las sondas de flanqueo se pueden posicionar con relación a las zonas límite. Una sonda de flanqueo se puede hibridar a una secuencia de ácidos nucleicos dentro de la primera zona límite o a una secuencia de ácidos nucleicos distal al gen supresor de tumor relacionado con la primera zona límite, y otra sonda de flanqueo se puede hibridar a una secuencia de ácidos nucleicos dentro de la segunda zona límite o a una secuencia de ácidos nucleicos distal al gen supresor de tumor relacionado con la segunda zona límite. Estas secuencias pueden ser distales al gen supresor de tumor relacionado con la primera o segunda zona límite.

(c) Posicionamiento con relación una zonas límite adicionales

25 Los métodos pueden comprender adicionalmente identificar zonas límite adicionales (tales como una tercera, cuarta, o quinta zona límite) y, para cada zona límite adicional, proporcionar una sonda que se hibrida con una secuencia de ácidos nucleicos dentro de la zona límite adicional o a una secuencia de ácidos nucleicos distal al gen supresor de tumor relacionado con la zona límite adicional; el sitio de hibridación puede estar cerca de la zona límite. Cuando se identifican más de dos zonas límite, se espera que el tamaño de supresión sea propenso a variar entre las muestras. Se pueden utilizar conjuntos de sondas para obtener información acerca de los tamaños de las supresiones, en función de si señales FISH de una o más de las sondas de flanqueo cercanas a la sonda objetivo se pierden así como también la señal FISH de la sonda objetivo en sí misma.

35 3. Tamaño y Origen de Sonda

Además de identificar zonas límite, los métodos para preparar conjuntos de sondas comprenden proporcionar sondas. Se puede obtener ADN para uso como una sonda, por ejemplo, al aislar BAC o ADN cósmido a partir de una o más cepas anfitrionas preexistentes o colecciones de BAC/cósmidos, o construir uno o más nuevos BAC o cósmidos; amplificar (por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa o amplificación por círculo rodante) ADN genómico o clonado; o sintetizar artificialmente ADN, por ejemplo, un conjunto de oligonucleótidos que cubren una región suficientemente grande en el genoma objetivo (por ejemplo, por lo menos 50 kb, o por lo menos 100 kb) para generar señales visibles mediante microscopía fluorescente. El tamaño de la región hibridada por una sonda puede ser mayor que o igual a 50 kb o 100 kb, y/o menos de o igual a 150 kb, 200 kb, 300 kb, 400 kb, o 500 kb.

45 4. Funcionalidad de Sonda

Por lo menos una sonda objetivo y por lo menos primera y segunda sondas de flanqueo preparadas de acuerdo con los métodos descritos aquí se pueden utilizar en un ensayo de eliminación de supresor de tumor en función de FISH en donde el ensayo tiene un umbral de importancia determinado como frecuencia de eliminación de artefactos más tres desviaciones estándar) por debajo de 20%, 25%, 30%, o 35% sobre muestras celulares fijadas en formalina, embebidas en parafina con un grosor de 5 µm y con un diámetro nuclear promedio menor de 5 µm. Los núcleos intactos en secciones FFPE de muestras tales como muestras de próstata cancerosas pueden no estar presentes como esferas perfectas, sino que tienden a ser comprimidas ligeramente en una forma elíptica durante la preparación de la sección.

55 D. Conjuntos de sondas y equipos

Se pueden preparar conjuntos de sondas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

60 Los conjuntos de sondas pueden comprender por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN, por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU, y por lo menos una sonda que se hibrida con TSPAN15. En dichos conjuntos de sondas, por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN sirve como una sonda objetivo, y por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU y por lo menos una sonda que se hibrida con TSPANIS sirve como sondas de flanqueo. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda de flanqueo adicional que se hibrida con BMPR1A. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda de flanqueo adicional que se hibrida con WAPAL.

65

- 5 Por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN puede comprender una sonda derivada de BAC RP11-846617. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con FAS derivado de por lo menos uno de los BAC RP11- 399019 y RP11-360H2O. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con TSPAN15 derivado de por lo menos uno de los BAC RP11-404C6 y RP11-6P16. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con BMPR1A derivado por lo menos uno de RP11-141D8 y RP11-52G13. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con WAPAL y/o BMPR1A derivada de por lo menos uno de RP11-351D13, RP11-661D10, RP11-141D8, y RP11-52G13. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con WAPAL derivado de por lo menos uno de RP11-141D8 y RP11-661 D10. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con SUFU derivado de por lo menos uno de RPI 1-18114 y RPI 1-2F13. Estos y todos los demás BAC mencionados aquí están disponibles en el Instituto del Cáncer Roswell Park, Buffalo, Nueva York, y el Centro de Recursos BACPAC del Hospital de Niños y Centro de Investigación en Oakland, California. La información de secuencia está disponible, por ejemplo, del Registro NCBL Clone (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/clone/>).
- 10
- 15 Adelante se muestra una tabla que proporciona información sobre las ubicaciones de los sitios de hibridación en el cromosoma 10 (las coordenadas son como en la versión NCB136/hg18, marzo de 2006) para los BAC seleccionados que se pueden utilizar en conjuntos de sondas de acuerdo con la descripción.

	Inicio	Fin
<b>Centromérico (10q11.21)</b>		
RP11-89J23	43,432,326	43,596,132
RP11-1044H3	43,572,030	43,801,357
RP11-80C16	43,723,472	43,889,995
<b>TSPAN15 (10q21.3)</b>		
RP11-404C6	70,784,881	70,979,123
RP11-6P16	70,824,041	71,006,065
<b>BMPR1A/WAPAL (10q23.2)</b>		
RP11-351D13	87,894,018	88,064,908
RP11-661D10	88,057,057	88,255,780
RP11-141D8	88,280,060	88,465,884
RP11-52G13	88,441,801	88,565,254
<b>PTEN (10q23.31)</b>		
RP11-846G17	89,666,216	89,843,092
<b>FAS (10q23.31)</b>		
RP11-399019	90,596,403	90,783,731
RP11-360H20	90,679,956	90,860,541
<b>SUFU (10q24.32)</b>		
RP11-18114	104,104,382	104,271,861
RP11-2F13	104,232,698	104,414,392

20

El conjunto de sondas puede comprender sondas que se hibridan con PTEN, FAS, y TSPAN15, en donde por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN comprende una sonda derivada de BAC RP11-846G17, por lo menos una sonda

que se hibrida con FAS comprende una sonda derivada de los BAC RP11-399019 y RP11-360H2O, y por lo menos una sonda que se hibrida con TSPAN15 comprende una sonda derivada de los BAC RP11-404C6 y RP11-6P16.

5 El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda centromérica o pericentromérica. Esta se puede utilizar para enumeración de cromosomas. Ejemplos de sondas pericentroméricas incluyen sondas derivadas de los BAC RP11- 89J23, RP11-1044H3, y/o RP11-80C16.

10 El conjunto de sondas puede consistir de sondas derivadas de RP11-846G17, por lo menos uno de RP11-399019 y RP11-360H2O, y por lo menos uno de RP11-404C6 y RP11-6P16.

15 El conjunto de sondas puede consistir de sondas derivadas de RP11-846G17, por lo menos uno de RP11-399019 y RP11-360H2O, y por lo menos uno de RP11-14108 y RP11-52G13.

20 En general, una sonda se puede derivar de un BAC al llevar a cabo una reacción de marcado tal como la traducción nick para generar la sonda. Sin embargo, la derivación puede ser simplemente para hacer crecer y aislar el BAC, en el caso en donde se proporciona la sonda en forma no marcada; en otras palabras, los derivados de BAC incluyen los BAC en sí mismos.

25 La invención proporciona un conjunto de sondas que comprenden por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN, por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU, y por lo menos una sonda que se hibrida con WAPAL, en donde la sonda que se hibrida con WAPAL se deriva de RP11-661 D10.

### 1. Marcado de sonda

30 Se pueden marcar los conjuntos de sondas descritos aquí. También es posible proporcionar el conjunto de sondas en forma no marcada, pero de una manera (por ejemplo, como soluciones liofilizadas o separadas) que permite el marcado distinguible de las sondas antes de hibridación.

35 El marcado puede ser marcado fluorescente directo. Esto se puede lograr mediante métodos bien conocidos, tales como traducción nick o cebado aleatorio en presencia del análogo de nucleótido marcado directamente. También es posible, marcado indirecto en el que se proporciona un análogo de nucleótido en una reacción de marcado tal como traducción nick o reacción de cebado aleatorio que no lleve en sí misma un fluoróforo pero que lleve una unidad estructural que permita la unión covalente o no covalente de un fluoróforo en un momento posterior. Véase, por ejemplo, Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ Hibridación (FISH), Curr Protoc Cell Biol. 2004; Capítulo 22: Unidad de 22.4. Por ejemplo, los análogos de nucleótidos que llevan una unidad estructural aminoalilo se pueden conjugar covalentemente con un fluoróforo, y los análogos de nucleótidos que llevan una unidad estructural de biotina o digoxigenina se pueden unir de forma no covalente mediante un ligando tal como avidina o anti-digoxigenina, respectivamente, el ligando se dirige de forma fluorescente. También es posible amplificar la señal al proporcionar múltiples capas de socio de unión, tal como un segundo ligando (por ejemplo, anticuerpo) que reconoce el primer ligando y también se marca, y, posiblemente, luego, el tercer ligando que reconoce el segundo, y así sucesivamente.

40 Ejemplos de fluoróforos que se pueden utilizar como marcadores con las sondas y métodos descritos aquí son: SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumRed, y SpectrumAqua (todos de Abbott Molecular, Intera Medico, Markham, ON, Canadá); ácido 7-amino-4-metil-cumarina-3-acético (AMCA); Texas Red (TM) (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.); 5- (y-6) -carboxi-X-rodamina; lisamina rodamina B; 5- (y-6) -carboxifluoresceína; fluoresceína-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico; tetrametilrodamina-5-(y-6)- isotiocianato; 5- (y-6)-carboxitetrametilrodamina; Ácido 7-hidroxycumarina-3- carboxílico; ácido 6- [fluoresceína 5- (6-y) carboxamido] hexanoico; ácido N- (4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenopropionico; eosina-5-isotiocianato; eritrosina-5-isotiocianato; 5- (y-6) -carboxi-rodamina 6G;. y azul acetilazida Cascade(TM) (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.)

45 En el conjunto de sondas LAVysion, se utilizan fluoróforos de diferentes colores de tal manera que cada sonda cromosómica en el conjunto se puede visualizar claramente. Muchos de estos fluoróforos están disponibles comercialmente en forma de nucleótidos conjugados, por ejemplo, para dCTP y/o dUTP.

50 Los fluoróforos que se van a utilizar con cada sonda en el conjunto de sondas, de manera general se deben elegir para permitir que se puedan distinguir mediante microscopía de fluorescencia. Por ejemplo, cuatro fluoróforos distinguibles mutuamente SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumRed, y SpectrumAqua. Se puede realizar FISH de cinco colores al utilizar una quinta sonda mixta, por ejemplo, SpectrumAqua más SpectrumOrange.

### 2. Sondas de enumeración de cromosomas

60 Los conjuntos de sondas descritos aquí pueden comprender una sonda de enumeración de cromosomas, como se definió anteriormente. La sonda de enumeración de cromosomas puede tener un sitio de hibridación en el cromosoma 10, por ejemplo, la sonda CEP 10 (Vysis Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EE.UU.).

### 3. Equipos

La invención se relaciona con equipos que comprenden conjuntos de sondas de la invención. Los equipos también pueden comprender otros reactivos útiles para llevar a cabo los ensayos FISH, tales como proteasas (por ejemplo, proteinasa K o pepsina), reguladores (por ejemplo, citrato de sodio), y/o agentes químicos para tratamiento previo de muestra tales como tiocianato de sodio.

5

#### 4. Composiciones

La invención proporciona composiciones que comprenden conjuntos de sondas de la invención, en donde las sondas de los conjuntos de sondas se marcan de forma distinguible. Las composiciones pueden ser composiciones acuosas y pueden comprender sustancias adicionales tales como reguladores (por ejemplo, Tris, bicarbonato de sodio, MOPS, HEPES), sales, y/o agentes de quelación (por ejemplo, EDTA, EGTA).

10

#### E. Métodos de ensayo

La invención proporciona métodos de ensayo para supresión de un supresor de tumor mediante FISH. Los conjuntos de sondas que se pueden utilizar en dichos métodos incluyen los conjuntos de sondas preparadas como en la sección C y los conjuntos de sondas de la sección D, anteriormente. En algunas realizaciones, los conjuntos de sondas tienen sitios de hibridación posicionados con respecto una zonas límite como se discute en las secciones C.2(b) y C.2(c).

15

En términos generales, los métodos para ensayar supresión de un supresor de tumor mediante FISH comprenden las etapas para realizar FISH con un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica al gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor. Se enumeran señales FISH de las sondas de flanqueo y sondas objetivos. Por lo menos se proporciona una frecuencia de eliminación de artefacto; esto sirve como un control negativo. Es posible que la frecuencia de eliminación de artefactos sea determinada previamente con muestras de control que no comprenden células con una supresión del gen supresor de tumor, y para la frecuencia de eliminación de artefactos que se va a utilizar nuevamente en ensayos múltiples. En función de las señales FISH enumeradas, por lo menos se determina una frecuencia de eliminación aparente. Si la muestra comprende células con una supresión del gen supresor de tumor se determina en función de si la frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefacto. La frecuencia de eliminación de artefactos con la que se compara la frecuencia de eliminación aparente debe coincidir en términos de si las frecuencias de eliminación son hemicigotas u homocigotas y que los sitios de hibridación de sonda son afectados por la supresión.

20

25

30

35

#### 1. Muestras

Las muestras utilizadas en los métodos para ensayar la eliminación de un supresor de tumor son mediante muestras celulares FISH. En algunas realizaciones, las muestras se fijan de forma química utilizando un conservante tal como formalina, etanol, formaldehído, paraformaldehído-glutaraldehído, o una combinación de cacodilato de sodio, formalina, y glutaraldehído y se embebe en un material sólido inerte tal como parafina o una matriz de tejido congelado, por ejemplo, compuesto de temperatura de corte óptima (OCT). En algunas realizaciones, las muestras comprenden células de las que por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% son células diferentes a metafase (por ejemplo, interfase). Véase, por ejemplo, Wick MR, Mills NC, Brix WK. Tissue Procurement, Processing, and Staining Techniques. Chapter 1. p. 1-10. Diagnostic Histochemistry edited by Wick MR. Cambridge University Press 2008.)

40

45

De manera general, las muestras se proporcionan con un soporte sólido (por ejemplo, una matriz de parafina en la cual se embebe la muestra, y/o un portaobjetos de vidrio o pared de un pozo de microtítulo).

50

#### 2. Realización de FISH

Los métodos de ensayo de supresión de la invención involucran hibridación in situ con fluorescencia (FISH). El término "hibridación in situ" de manera general se refiere a hibridación de una sonda de ácido nucleico a un objetivo de ácido nucleico que es parte de una preparación citológica o histológica. Normalmente, los métodos FISH implican las siguientes etapas: (a) proporcionar una muestra fija a un soporte sólido como se discutió anteriormente; (b) tratamiento de la muestra para aumentar la accesibilidad del ADN de sonda al ADN objetivo, por ejemplo, con tratamientos químicos o de proteasa (por ejemplo, regulador de citrato 10 mM pH 6.0 con 8% de tiocianato de sodio; HCl 0.2N; o proteinasa K a 25 µg/ml o pepsina a 750 U/ml), (c) poner en contacto el tejido o material que contiene el ADN objetivo con sondas marcadas de un conjunto de sondas para formar complejos de hibridación específicos, (d) lavados después de hibridación de los complejos para retirar de forma selectiva sondas que no se hibridan específicamente al objetivo, y (e) detección de señales FISH a partir de sondas que tienen complejos de hibridación formados con moléculas de ADN objetivo. Dichos métodos se describen en un número de fuentes, que incluyen: Gall and Pardue, Methods of Enzymology 1981; 21:470-480; Henderson, International Review of Cytology, 1982; 76: 1-46; Angerer, et al., in Genetic Engineering: Principles and Methods (Setlow and Hollaender, Eds.) 1985; vol. 7, pp. 43-65, Plenum Press, New York; and Varella-Garcia M et al., EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer, J. Clin. Pathol. 2009; 62:970-977.

55

60

65

En algunas realizaciones, el tratamiento de los núcleos con enzimas proteolíticas tales como proteinasa K o tripsina puede mitigar la unión no específica de ADN marcado a proteína en los núcleos fijos intactos. También, la captura de imágenes, utilizando un equipo tal como un CCD (Charge Coupled Device). También, la captura de imágenes, utilizando un equipo tal como una cámara de CCD (Charge Coupled Device) se puede acoplar con el procesamiento de imágenes utilizando el software de procesamiento de imágenes para reducir la fluorescencia de fondo resultante de la hibridación no específica. Adicionalmente, la hibridación cruzada de secuencias repetidas en la sonda con aquellas en el genoma puede llevar a la complicación de las señales fluorescentes. Se puede incluir una etapa de supresión Cot-1 ADN en los protocolos de hibridación para mejorar este problema. Debido a que los ácidos nucleicos en la fracción Cot-1 se caracterizan por contener secuencias altamente repetitivas (por ejemplo, secuencias Alu, secuencias  $\alpha$ -satélite, y  $\beta$ -satélite), estos ácidos nucleicos se unen a secuencias de repetición en el genoma, bloqueando de esta manera la unión de sondas a dichas secuencias (véase, por ejemplo, Benjamin Lewin, Genes V, 1994, Oxford University Press). Adicionalmente, las sondas suprimidas de secuencias de repetición se pueden preparar por eliminación física o síntesis directa; véase, por ejemplo, y Publicación de Solicitud Estadounidense No. 2003/0022166 (Collins et al.).

Lo siguiente es un ejemplo de un procedimiento para preparar muestras y realizar FISH. Se pueden fijar los tejidos con un fijador tal como formalina y luego se embeben en parafina. Las secciones luego se cortan utilizando un microtomo y se aplican a un portaobjetos de microscopio. Las muestras se pueden preparar de biopsias u otras fuentes, dependiendo del tipo de células cancerosas o precancerosas que se van a analizar; por ejemplo, la fuente se puede seleccionar de tumores de próstata, mama, melanoma, y otros tumores sólidos: muestras con biopsia de aguja, biopsias aspiradas por aguja fina, prostatectomías radicales, muestras metastásicas (por ejemplo, de hueso o ganglio linfático), preparaciones de citología (a partir de fluidos corporales tal como orina o ascitos), y células de tumor de circulación aisladas a partir de sangre periférica. En algunas realizaciones, las muestras se pueden preparar mediante fijación de células en etanol o metanol: ácido acético combinado con citocentrifugación, métodos de depósito de capa delgada (por ejemplo ThinPrep, Cytoc Corp.), frotis, o pipeteos sobre portaobjetos de microscopio.

Se puede utilizar cualquier método de hibridación in situ adecuado. Antes de hibridación in situ, el ADN cromosómico contenido dentro de la célula, cada uno se desnaturaliza. La desnaturalización normalmente se realiza al incubar en la presencia de pH alto, calor (por ejemplo, temperaturas desde 70° C hasta 95° C, por ejemplo, 83° C), solventes orgánicos tales como formamida y haluros de tetraalquilamonio, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se puede desnaturalizar el ADN cromosómico mediante una combinación de temperaturas por encima de 70° C (por ejemplo, 73° C o 83° C, incubar durante aproximadamente 5 minutos) y un regulador de desnaturalización que contiene 70% de formamida y 2X SSC (cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03 M). Las condiciones de desnaturalización normalmente se establecen de tal manera que se conserva la morfología celular. Por ejemplo, las sondas cromosómicas se pueden desnaturalizar por calor, por ejemplo, al calentar las sondas a aproximadamente 73° C o 83° C durante aproximadamente cinco minutos.

Un ejemplo de un procedimiento de procesamiento para muestras de FFPE montadas en portaobjetos se muestra en la siguiente tabla.

	Acción	Temperatura	Tiempo de incubación
	Día 1		
1	Xileno, 3x	RT	cada 10 Minutos
2	100% de EtOH, 2x	RT	cada 5 minutos
3	85%,70% de EtOH, dH2O	RT	cada 2 Minutos
4	incuba en HCL 0.2N	RT	cada 20 Minutos
5	incuba en pNaSCN 1M precalentado	80° C	cada 10 Minutos
6	2xSSC	RT	Cada 2 Minutos
7	dH2O	RT	cada 5 minutos
8	incuba en HCL 0.2N	RT	cada 2 Minutos
9	Incuba en HCL+Pepsina 0.01 N precalentada	37° C	cada 10 Minutos
10	dH2O	RT	cada 5 minutos
11	70%, 85%, y 100% de EtOH	RT	cada 2 Minutos
12	Portaobjetos secos al aire		
13	Evalúa morfología del tejido mediante microscopía de contraste de fase		
15	Centrifugación en Vórtex luego de centrifugar brevemente la sonda		
16	Aplica la mezcla de sonda al portaobjetos e inmediatamente se aplica el cubreobjetos		
17	Sella el cubreobjetos con cemento de caucho		
18	Coloca el portaobjetos en una ThermobriteB	83° C	5 minutos
19	Hibridación de ADN objetivo y de sonda	37° C	16-24 Horas
	DÍA 2		
20	Utilizando pinzas, retira con cuidado el cemento de caucho		

21	0.4xSSC/0.3% DE NP40	72° C	2 Minutos
22	2xSSC	RT	2 Minutos
23	Aplica contrateñido Dapi al área objetivo		
24	Cubreobjetos utilizando 24x50		

En algunas realizaciones, tales como cuando las sondas del conjunto de sondas se proporcionan en forma de hebras dobles, las sondas del conjunto de sondas también se pueden desnaturalizar antes de hibridación in situ. Se pueden utilizar condiciones de desnaturalización tales como aquellas descritas anteriormente.

5

Después de eliminación de productos químicos o condiciones de desnaturalización, las se hibridan sondas al ADN cromosómico bajo condiciones de hibridación. "Condiciones de hibridación" son condiciones que facilitan la hibridación entre una sonda y el ADN cromosómico objetivo. Las condiciones de hibridación varían, dependiendo de las concentraciones, composiciones base, complejidades, y longitudes de las sondas, así como también concentraciones de sal, temperaturas, y longitud de incubación. Por ejemplo, las hibridaciones in situ se pueden realizar en regulador de hibridación que contiene 1X a 2X SSC, 50- 55% de formamida, un acelerante de hibridación (por ejemplo 10% de sulfato de dextrano), y ADN de bloqueo no marcado para suprimir la hibridación no específica. En general, las condiciones de hibridación, como se describió anteriormente, incluyen temperaturas de 25° C a 55° C, y incubación longitudes de 0.5 horas a 96 horas. En algunas realizaciones, se puede realizar hibridación a una temperatura desde 32° C hasta aproximadamente 45° C durante 2 a 16 horas.

10

15

La unión no específica de sondas cromosómicas a ADN fuera de la región objetivo se puede eliminar mediante una serie de lavados con una solución de sal. La temperatura y concentración de sal en cada lavado depende de la rigurosidad deseada. Por ejemplo, para altas condiciones de rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo a aproximadamente 65° C a aproximadamente 80° C, utilizando 0.2X a 2X SSC, y 0.1 % a 1 % de un detergente no iónico tal como NP-40. La rigurosidad se puede reducir al disminuir la temperatura de los lavados o al aumentar la concentración de sal en los lavados. La hibridación de las sondas a la muestra de tejido se puede realizar manualmente, o con la asistencia de instrumentos, tales como el horno de hibridación ThermoBrite, el Procesador VP 2000, o el instrumento de procesamiento XMatrix(TM) (todos disponibles comercialmente de Abbott Molecular, Inc.).

20

25

Se puede lograr la detección de señales FISH a partir de una muestra hibridada y lavada para permitir análisis posterior en tiempo real, tal como por un operador quien ve la fluorescencia directamente en un microscopio, o para permitir análisis posterior, al grabar imágenes. La detección de manera general involucra el uso de una fuente de luz de excitación adecuada para cada fluoróforo en uso en el ensayo (por ejemplo, luz que pasa a través de un filtro adecuado, o luz desde un láser de una longitud de onda adecuada); luego se pasa la luz emitida de forma fluorescente a través de un filtro adecuado, y puede ser vista directamente por un operador y/o fotografiar con una cámara, tal como una cámara digital o en función de película, que se puede conectar a un ordenador.

30

### 3. Enumeración

35

Se enumeran las señales FISH de una pluralidad de núcleos en la muestra. En algunas realizaciones, la pluralidad de núcleos comprende por lo menos 50, 75, o 100 núcleos. Se puede lograr la enumeración, por ejemplo, al hacer una lista que contiene una entrada para cada núcleo examinado y cuantas de cada una de las señales FISH está contenida, y/o al contar el número de núcleos que tiene cada combinación observada de cantidades de señal FISH. En algunas realizaciones, dicha lista también puede contener posibles combinaciones pero no observadas de cantidades de señal FISH. La lista puede ser reorganizada al hacer entradas para cada combinación de cantidades de señal FISH observada, acompañada por su frecuencia (véase, por ejemplo, Tabla 2 adelante). La información obtenida al enumerar las señales FISH debe ser interpretada en vista de por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto, discutida adelante.

40

45

### 4. Frecuencia de eliminación de artefacto

Los métodos de ensayo de supresión comprenden proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. Un núcleo puede carecer de una señal FISH desde una sonda objetivo por razones diferentes a una supresión; por ejemplo, en el caso de una muestra seccionada, que incluye muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina, se pueden trincar algunos núcleos en la muestra. También es posible que el sitio de hibridación objetivo en una fracción de los núcleos pueda no ser lo suficientemente accesible durante la etapa de la hibridación del procedimiento FISH. Adicionalmente, la frecuencia con la que se observan las señales FISH puede ser influenciada por la calidad de y afecta el envejecimiento en las preparaciones de tejido que se estudian. Por lo tanto, no todos los núcleos que carecen de una señal FISH de la sonda objetivo son indicadores de una supresión de gen real.

50

55

Por lo tanto, con el fin de mitigar el potencial de falsos positivos se proporciona (en los que una supresión se denomina erróneamente), por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos con el fin de distinguir entre resultados de una muestra indicadora de células que tienen una supresión del objetivo del ensayo, y resulta de una muestra en la que las causas de señales de sonda objetivo ausentes son probabilidades diferentes al genotipo subyacente, tal como las fuentes técnicas de error discutidas anteriormente.

60



Se puede determinar una frecuencia de eliminación de artefactos en función de un ensayo de control, utilizando muestras de células conocidas que no tienen una supresión del gen objetivo. La exactitud de la frecuencia de eliminación de artefactos determinada a partir de las muestras de control se puede optimizar con relación a una muestra de prueba al utilizar muestras de control de células cercanamente coincidentes a la muestra de prueba de células con respecto al método de preparación de muestra. Por ejemplo, las muestras de tejido no neoplásico tal como hiperplasias benignas del mismo tipo de tejido como las muestras precancerosas/ cancerosas/potencialmente cancerosas que se van a probar para pérdida de un gen supresor de tumor puede servir como controles. En el caso de ensayos en cánceres de próstata, se pueden obtener muestras de tejido no neoplásico de pacientes sin cáncer quienes solo se sometieron a cirugía por hiperplasia de próstata benigna (BPH) para propósitos de control. La frecuencia de eliminación de artefactos también se ve influida por otras variables biológicas que afectan ambas señales FISH y el volumen nuclear relativo en secciones de tumor. La condensación del ADN, el tamaño y la geometría del núcleo, el grosor de las secciones de muestra, el diseño del ensayo (la distancia de la señal en el ensayo FISH de 3 o 4 colores depende parcialmente de la distancia genómica de las sondas), y el índice de crecimiento y el estado de ploidía (mayor probabilidad de mayores niveles de transmisión de ploidía de núcleos de mayor volumen). Adicionalmente a estas variables nucleares, la señal FISH real en sí misma (el "tamaño de punto") puede ocupar más espacio tridimensional en la cromatina nuclear descondensada (paquete de ADN de abertura típica de los genes expresados) en comparación con las regiones condensadas del genoma (ADN de genes reprimidos, por ejemplo). Más aún, las señales FISH individuales pueden ser más difíciles de interpretar si la replicación del ADN ya ha tenido lugar, ya que presentan núcleos G2 "doble" o conteos de puntos emparejados debido a la duplicación del ADN de la célula. Estos dobletes son puntos físicamente unidos emparejados tocados o ligados por una hebra, o adyacentes (con una separación menor que el diámetro de la señal más grande o punto). En algunas realizaciones, los criterios de puntuación se pueden ajustar para asegurar que este efecto no distorsione los resultados de los ensayos (véase Varella-Garcia M et al., EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer, *J Clin Pathol.* 2009; 62:970-977). Esto puede incluir contar físicamente puntos emparejados ligados y/o puntos adyacentes como una sola señal. Los puntos que están adyacentes pero separados mediante por lo menos el diámetro de la señal más grande se pueden contar como señales separadas. Por otra parte, antes de la replicación del ADN cada señal muestra una señal de un solo punto como hibridación ("singulete") y estos también se cuentan como una sola señal. Varias de estas variables como la ploidía, tamaño nuclear, y condensación de cromatina pueden variar entre muestras de control normales y muestras de tumor. Por lo tanto, estos factores pueden ser difíciles de contar completamente en los controles negativos utilizados para establecer una frecuencia de eliminación de artefactos para ensayos FISH de interfase; esto puede ser de particular importancia en las muestras con bajo contenido de células de tumor o cambios genómicos subclonales adicionales. Por lo tanto, puede ser aconsejable utilizar un umbral estadístico relativamente estricto para denominar eliminaciones, como se discute adicionalmente adelante.

En algunas realizaciones, por lo menos se proporcionan dos, o más, frecuencias de eliminación de artefacto. Por ejemplo, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos para supresiones hemicingotas y homocingotas. También, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos separadas para supresiones que llevan a la ausencia de señales FISH a partir de diferentes combinaciones de sondas, por ejemplo, supresiones que solo afectan la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, y supresiones que afectan la sonda objetivo, la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo. En las realizaciones en las que se utiliza un conjunto de sondas que comprenden más de dos sondas de flanqueo, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos para cada sonda dentro de un conjunto dado de tal manera que las supresiones que afectan las sondas de flanqueo más distantes de la sonda objetivo se pueden considerar como pozos.

Una ventaja de proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos separadas es que las señales FISH que se pierden debido a fuentes de error, tal como eventos de truncamiento, pueden ser más variables desde el núcleo hasta el núcleo que el genotipo de una población clónica, de tal manera que la frecuencia de eliminación de artefactos para cualquier tipo dado de supresión (por ejemplo, una supresión hemicingota que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo) es menor de lo que sería si por lo menos una sonda de flanqueo centromérica tampoco se utiliza en el ensayo, debido a que algunas de las fuentes de error tal como eventos de truncamiento también pueden afectar por lo menos una sonda de flanqueo centromérica.

La reducción de la frecuencia de eliminación de artefactos puede ser útil dependiendo del tipo de célula bajo análisis, en que algunos tipos de células son especialmente propensos a artefactos de truncamiento. Por ejemplo, en un estudio reciente de las pérdidas de truncamiento de señales por interfase FISH en secciones histológicas de 5 micras, se encontró que alrededor del 20% de los núcleos de médula ósea normales exhiben pérdidas de señal debido a truncamientos. En contraste, 60% de los núcleos en secciones hepáticas normales exhiben pérdidas de truncamiento (Wilkens L et al. 2005. Standardised fluorescent in situ hybridisation in cytological and histological specimens. *Virchows Arch* 2005; 447: 586-592). Se considera que esta variación de los índices de falsos positivos para detectar pérdidas es debido a los artefactos de corte de truncamiento que tienen una influencia creciente cuando los núcleos de células de hígado mucho más grandes, de forma irregular se truncan con más frecuencia durante la preparación de secciones de 5 micras.

5. Determinación de por lo menos una frecuencia de eliminación aparente

La información obtenida al enumerar las señales FISH se analiza para determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente. Una frecuencia aparente es una observación de cómo a menudo la sonda objetivo se pierde en una muestra. Se debe observar que esta etapa puede ocurrir con cualquier temporizador relacionado con la etapa de proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. Así como con frecuencias de eliminación de artefacto, en algunas realizaciones, por lo menos dos, o más, se determinan frecuencias de eliminación aparentes. En aras de eficiencia, de manera general se aconseja determinar frecuencias de eliminación aparentes y proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos en pares susceptibles de comparación (por ejemplo, frecuencias de artefactos y de supresión aparentes para una supresión hemigigota que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo). En cualquier evento, con el fin de realizar la siguiente etapa, por lo menos una frecuencia de eliminación aparente debe ser para el mismo tipo de evento de supresión que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto.

#### 6. Detección de supresión del gen supresor de tumores

Si la muestra comprende células con una supresión se determina en función de si por lo menos una frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. Se puede seleccionar el umbral de importancia de acuerdo con el nivel deseado de especificidad versus sensibilidad; los valores comunes incluyen un valor p menor de o igual a 0.05 de acuerdo con una prueba estadística tal como la prueba t (una o dos colas), o una diferencia de por lo menos tres desviaciones estándar de la frecuencia de eliminación de artefacto. En algunas realizaciones, un umbral de importancia tal como la frecuencia de eliminación de artefactos más por lo menos 2.5, 3, o 3.5 desviaciones estándar se utiliza para determinar si por lo menos una frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto.

Como se discutió anteriormente, se pueden proporcionar múltiples frecuencias de eliminación de artefacto, y se pueden determinar múltiples frecuencias de eliminación aparentes. Por lo tanto, esta etapa puede comprender determinar si múltiples tipos de supresión están presentes. Por ejemplo, la presencia de dos conjuntos de señales FISH desde las sondas de flanqueo y objetivo indica que un núcleo no tiene una eliminación del supresor de tumor objetivo (esquemático en la Figura 2B, diagrama izquierdo). La ausencia de una o ambas de las señales FISH de sonda objetivo indica una supresión hemigigota aparente (Figura 2B, centro) o homocigota (Figura 2B, derecha), respectivamente. La información acerca del tamaño de la supresión aparente se puede obtener de ya sea una o más de las sondas de flanqueo que también están ausentes. Los ejemplos de la Figura 2B derecha y centro son indicadores de supresiones relativamente pequeñas en las que solo se afecta la sonda objetivo.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos comprenden determinar si la muestra comprende células con una supresión seleccionada de supresiones que solo afectan la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, y supresiones que afectan la sonda objetivo, la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo.

Además de las configuraciones de supresión simples mostradas en la Figura 2B, los patrones más complejos que implican ganancia o pérdida de las señales pueden verse debido a redistribuciones adicionales cerca de las regiones que contienen las sondas de control flanqueantes. Por ejemplo, algunas de las pérdidas de genes PTEN observadas en cáncer de próstata avanzado parecen tener pérdidas complejas que implican genes estrechamente ligados a PTEN que están asociados con eventos de supresión (discutidos adelante). Adicionalmente, las configuraciones de señales complejas que llevan puntos adicionales también pueden surgir de ganancias cromosómicas complejas debido a translocaciones desequilibradas, polisomías o poliploidía. Cualquier patrón que difiere de los patrones simples observados en núcleos normales también se considera usualmente anormal si aparece en una proporción significativa de células. La evaluación cuidadosa del número y localización de las señales en los patrones aberrantes puede proporcionar información valiosa del cambio cromosómico subyacente.

#### 7. Zonas límite

Una o más de las sondas de flanqueo utilizadas en los ensayos puede tener un sitio de hibridación en una zona límite o distal al gen supresor de tumor relacionado con una zona límite. En algunas realizaciones, por lo menos una primera sonda de flanqueo se hibrida con una posición dentro o centromérica a una primera zona límite centromérica al gen supresor de tumor, y/o por lo menos una segunda sonda de flanqueo se hibrida con una posición dentro o telomérica a una segunda zona límite telomérica al gen supresor de tumor. El uso de sondas de flanqueo con sitios de hibridación con el fin de posicionarlos puede ser útil debido a que el sitio de hibridación de una sonda de flanqueo posicionada en esta forma debe ser menos propensa a ser suprimida que si fuera próxima al gen supresor de tumor relacionado con la zona límite. El uso de dicho conjunto de sondas puede elevar la frecuencia de supresiones que dan patrones como en el centro y derecha de la Figura 2B. Estos patrones tienen señales de sondas de flanqueo que se hibridan centroméricamente y teloméricamente al (presumiblemente parcial o completamente suprimido) gen supresor de tumor, y es menos probable que estos patrones surjan repetidamente a través de artefactos de truncamiento en los cuales se extirpa una sección del volumen del núcleo, debido a que sería necesario para el cromosoma estar dispuesto de tal

manera que un bucle de cromatina que contiene el gen supresor de tumor pero ningún sitio de hibridación de sonda de flaqueo extendido en el volumen nuclear extirpado. Las zonas límite y posiciones de los sitios de hibridación con respecto a estos se discuten en mayor detalle en la sección C.2 anterior; esa discusión también es relevante aquí.

5 F. Ensayos para detectar de forma distinguible supresiones pequeñas y grandes

Es posible que las células en las cuales se han eliminado ambas copias de un gen supresor de tumor hayan experimentado dos eventos de supresión separados de diferentes tamaños. La invención se relaciona con método para detectar de forma distinguible eventos de supresión de diferentes tamaños.

10

1. Conjuntos de sondas

En estos métodos, se utiliza un conjunto de sondas de por lo menos cuatro sondas. El conjunto de sondas comprende por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor por lo menos una primera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flaqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen supresor de tumor, y por lo menos una de por lo menos una tercera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el sitio de hibridación de la primera sonda de flaqueo o por lo menos una cuarta sonda de flaqueo que se hibrida con una posición telomérica para el sitio de hibridación de la segunda sonda de flaqueo. El conjunto de sondas adicionalmente puede comprender una sonda centromérica o pericentromérica.

15

20

En algunas realizaciones, el conjunto de sondas comprende dos subconjuntos que comprenden sondas parcialmente superpuestas. Los dos subconjuntos se pueden utilizar en un ensayo de dos partes en los que por lo menos una sonda de flaqueo posicionada de forma diferente se utiliza en la segunda parte o reflejo del ensayo. Por ejemplo, la Figura 17 proporciona una ilustración de una posible configuración de sondas para un ensayo de dos partes supresiones PTEN pequeñas y grandes en las que una sonda centromérica, una sonda TSPAN15, una sonda PTEN, y una sonda FAS se utilizan en la primera parte, y una sonda centromérica, una sonda BMPR1A, una sonda PTEN, y una sonda SUFU se utilizan en la segunda parte. Si una supresión excede la región unida por las líneas de puntos verticales en la Figura 17, se deben afectar una o más de las sondas de flaqueo; supresiones muy grandes pueden ser indicadas cuando se afectan las sondas TSPAN15 o SUFU. Por ejemplo, es posible para una supresión resultar en la pérdida de PTEN al telómero, que puede afectar las sondas PTEN, FAS, y SUFU. más de manera general, el conjunto de sondas puede comprender por lo menos dos subconjuntos que comprenden sondas parcialmente superpuestas, en donde el primer subconjunto comprende por lo menos una sonda objetivo, por lo menos una sonda de flaqueo centromérica, por lo menos una sonda de flaqueo telomérica, y opcionalmente por lo menos una sonda con un sitio de hibridación centromérico o pericentromérico, y el segundo subconjunto comprende por lo menos una sonda objetivo, por lo menos una sonda de flaqueo centromérica, por lo menos una sonda de flaqueo telomérica, y opcionalmente por lo menos una sonda con un sitio de hibridación centromérico o pericentromérico, con por lo menos una de por lo menos una sonda de flaqueo centromérica y por lo menos una sonda de flaqueo telomérica del segundo subconjunto que es diferente de su contraparte en el primer subconjunto.

25

30

35

40

2. Enumeración; frecuencias de artefactos y de supresión aparentes

Las etapas de enumeración de las señales FISH, que proporcionan frecuencias de eliminación de artefacto, y que determinan frecuencias de eliminación aparentes son similares a aquellas discutidas en las secciones E.3-E.5 anteriores, excepto que existen más sondas para enumerar, y frecuencias de artefactos y aparentes para más tipos de supresiones se pueden proporcionar y determinar, respectivamente. Por ejemplo, por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo (es decir, las sondas de flaqueo más cercanas a la sonda objetivo en las direcciones centromérica y telomérica), y por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre las dos sondas de flaqueo más distales, en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo. La discusión anterior es aplicable independientemente de si por lo menos tres sondas de flaqueo se hibridan a las muestras juntas o en un ensayo de dos partes.

45

50

55

De forma similar, por lo menos se puede determinar una primera frecuencia de eliminación aparente para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo, y por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente se puede determinar para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre las dos sondas de flaqueo más distales, en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo.

60

3. Determinar si la muestra comprende células con una eliminación grande o pequeña

Si la muestra comprende células con una supresión del gen supresor de tumor que afecta el sitio de hibridación de cualquiera de las sondas de flaqueo utilizadas se determina en función de si la frecuencia de eliminación aparente

65

relevante es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos relevante, como se describió anteriormente en la sección E.6.

- 5 Una muestra en la que la sonda objetivo tiene una frecuencia de eliminación hemicigota u homocigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada se determina que comprende solo eliminaciones o eliminaciones pequeñas (que no afectan ninguna de las sondas de flaqueo) si ninguna de las sondas de flaqueo tienen frecuencias de eliminación aparentes significativamente mayores que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada.
- 10 Si la sonda objetivo y por lo menos una sonda de flaqueo tiene frecuencias de eliminación aparentes significativamente mayores que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada, entonces es probable que esté presente una supresión grande.
- 15 Se debe observar que la posibilidad de un par inusual de supresiones pequeñas en las que solo la hibridación de una sonda de flaqueo se elimina en una copia del cromosoma 10 y solo el sitio de hibridación de la sonda objetivo se elimina en la otra copia del cromosoma 10 de manera general se pueden descartar en función de la tendencia de señales FISH del mismo cromosoma que está cerca a otro; por lo tanto, en el caso de una eliminación grande hemicigota, las señales FISH del cromosoma no afectado deben estar cercanas entre sí.
- 20 Es posible para ambas supresiones pequeñas y grandes estar presentes; en estos casos, la sonda objetivo tiene una frecuencia de eliminación homocigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefacto correspondiente, y por lo menos una sonda de flaqueo tiene una frecuencia de eliminación hemicigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto correspondiente. En los casos en los que la eliminación grande ha resultado en la pérdida de dos sitios de hibridación de sonda de flaqueo (por ejemplo, una pérdida de la región completa del supresor de tumor al telómero que afecta dos sondas de flaqueo con sitios de hibridación telomérica al supresor de tumor), entonces dos sondas de flaqueo tendrían una frecuencia de eliminación hemicigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto correspondiente.
- 25
- 30 En algunas realizaciones, la eliminación homocigota del gen supresor de tumor en donde existe por lo menos una eliminación grande es indicadora de una metástasis o tumor metastásico; un tumor metastásico es capaz de hacer surgir por lo menos un segundo tumor en otra ubicación en el cuerpo, y el segundo tumor es un tumor metastásico. En alguna de dichas realizaciones, una copia del gen supresor de tumor se pierde debido a una supresión pequeña y se pierde una copia debido a una supresión grande. En algunas realizaciones, ambas copias del gen supresor de tumor se pierden debido a eliminaciones grandes. En algunas realizaciones, existe por lo menos una eliminación grande que afecta por lo menos dos sitios de hibridación de sonda de flaqueo localizados teloméricos al supresor de tumor. En algunas realizaciones, el más distal (con respecto al gen supresor de tumor) de dicho por lo menos dos sitios de hibridación de sonda de flaqueo es por lo menos 5, 7.5, 10, o 12.5 Mb a partir del gen supresor de tumor.
- 35
- 40 En algunas realizaciones, el método para detectar supresiones pequeñas y grandes comprende realizar FISH sobre una primera muestra celular que comprende una pluralidad de células con un primer subconjunto de sondas compuesto por el conjunto de sondas y realizar FISH sobre una segunda muestra celular del mismo individuo como la primera muestra celular que comprende una pluralidad de células con un segundo subconjunto de sondas compuesto por el conjunto de sondas; el gen supresor de tumor es PTEN; el primer subconjunto de sondas comprende una sonda de flaqueo que se hibrida con TSPAN15 y una sonda de flaqueo que se hibrida con FAS; y el segundo subconjunto de sondas comprende una sonda de flaqueo que se hibrida con BMPR1A o WAPAL (se entiende que una sonda que se hibrida con uno de BMPR1A o WAPAL también puede hibridar la otra, ya que son genes vecinos) y una sonda de flaqueo que se hibrida con SUFU. Cuando se detecta una supresión PTEN en este método, el análisis de si por lo menos uno de los sitios de hibridación de las sondas de flaqueo se elimina junto con PTEN se puede utilizar para determinar si la supresión es una supresión grande.
- 45
- 50

#### 4. Zonas límite

- 55 Como en los métodos de la sección E, en algunas realizaciones, por lo menos una primera sonda de flaqueo se hibrida con una posición dentro o centromérica a una primera zona límite centromérica al gen supresor de tumor, y/o por lo menos una segunda sonda de flaqueo se hibrida con una posición dentro o telomérica a una segunda zona límite telomérica al gen supresor de tumor.

- 60 También es posible para la tercera y/o cuarta sondas de flaqueo ser posicionadas dentro de una zona límite o distal al gen supresor de tumor relacionado con una zona límite. Es decir, en algunas realizaciones, por lo menos una tercera sonda de flaqueo se hibrida con una posición centromérica para una primera zona límite centromérica distal al sitio de hibridación de por lo menos una primera sonda de flaqueo, y/o por lo menos una cuarta sonda de flaqueo se hibrida con una posición telomérica para una segunda zona límite telomérica distal al sitio de hibridación de por lo menos una segunda sonda de flaqueo.

65

Las zonas límite y posiciones de sitios de hibridación relacionados con estas se discuten en mayor detalle en la sección C.2 anterior; esa discusión también es relevante aquí.

G. Métodos para optimización de ensayo

Se describen aquí métodos para optimizar un ensayo en función de FISH para supresión de un gen supresor de tumor. En estos métodos, se proporciona una pluralidad de conjuntos de sondas candidatos, y cada conjunto de sondas se utiliza para realizar FISH sobre por lo menos una muestra que comprende una pluralidad de células que comprende un número euploide de copias intactas del gen supresor de tumor. Las señales FISH se enumeran, y se determina una frecuencia de eliminación de artefacto. Un conjunto de sondas determinado tiene un índice de supresión de artefactos favorable se selecciona de los conjuntos de sondas candidatos para uso en el ensayo en función de FISH optimizado para supresión de un gen supresor de tumor.

1. Conjuntos de sondas candidatos

Se pueden proporcionar por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, o más conjuntos de sondas candidatos. Los conjuntos de sondas candidatos pueden tener algunas sondas en común; por ejemplo, por lo menos dos conjuntos de sondas candidatos pueden comprender por lo menos una sonda objetivo idéntica, y/o por lo menos una sonda de flanqueo idéntica. Por supuesto, por lo menos una sonda debe diferir entre cada conjunto candidato. En algunas realizaciones, por lo menos una, por lo menos dos, por lo menos tres, o por lo menos cuatro de las sondas de flanqueo se posicionan dentro de una zona límite o distal al gen supresor de tumor relacionado con una zona límite, al cual las sondas pueden estar cerca.

2. Determinación de frecuencia de eliminación de artefacto

Una frecuencia de eliminación de artefactos se determina para cada conjunto de sondas candidato al realizar FISH sobre por lo menos una muestra, que comprende una pluralidad de células que comprende un número euploide de copias intactas del gen supresor de tumor. Una frecuencia de eliminación de artefactos se determina al enumerar las señales FISH como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, el FISH se realiza con cada conjunto de sondas sobre una pluralidad de muestras, tales como por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, con el fin de permitir una comparación estadísticamente más rigurosa de frecuencias de eliminación de artefactos medidas.

3. Selección de un conjunto de sondas con una frecuencia de eliminación de artefactos favorable

Un conjunto de sondas que se encontró da una frecuencia de eliminación de artefactos favorable se selecciona para uso en un ensayo optimizado. La frecuencia de eliminación de artefactos del conjunto de sondas seleccionado puede estar en por lo menos el 60, 70, 80, 90, o 95 de percentiles, se entiende que los mayores percentiles indican mejor rendimiento (es decir, menor frecuencia de eliminación de artefacto).

4. Uso de muestras con supresiones

También se puede realizar FISH con cada conjunto de sondas candidato, o con un subconjunto de los conjuntos de sondas candidatos que se han encontrado dan frecuencias de eliminación de artefactos favorables, en una pluralidad de muestras celulares que comprenden una pluralidad de células que comprende una eliminación homocigota o hemicigota del gen supresor de tumor. Las señales FISH se enumeran, y se determina una frecuencia de eliminación aparente, como se describió anteriormente.

(a) Sensibilidad

En razón a que se sabe que las muestras abarcan células que comprenden una eliminación homocigota o hemicigota del gen supresor de tumor, los valores de sensibilidad se determinan en función de cuanta la pluralidad de muestras se determinó que tenían una frecuencia de eliminación aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos determinada para el conjunto de sondas candidato. Una desviación estándar para la frecuencia de eliminación de artefactos de un conjunto de sondas candidato se puede determinar en la forma usual como se describió anteriormente, dado que la frecuencia de eliminación de artefactos se determina para por lo menos tres muestras que comprenden una pluralidad de células que comprende un número euploide de copias intactas del gen supresor de tumor. Alternativamente, una desviación estándar de la frecuencia de eliminación de artefactos se puede estimar (por ejemplo, en función de frecuencias de eliminación de artefactos de un conjunto de conjuntos de sondas candidatos, o en función de desviaciones estándar conocidas para otros conjuntos de sondas) para uso en determinar la importancia con el fin de evaluar la sensibilidad. Las opciones de umbral para determinar la importancia son como se discutió anteriormente.

(b) Selección de un conjunto de sondas en vista de un valor de sensibilidad y frecuencia de eliminación de artefacto

5 Cuando se determina la sensibilidad para por lo menos algunos de los conjuntos de sondas candidatos, un conjunto de sondas candidato que tiene una valor de sensibilidad favorable y una frecuencia de eliminación de artefactos favorable se puede seleccionar para uso en el ensayo optimizado. La frecuencia de eliminación de artefactos y/o valores de sensibilidad pueden estar en por lo menos 60, 70, 80, 90, o 95 percentiles, se entiende que los mayores percentiles indican mayor rendimiento (es decir, mayor sensibilidad o menor frecuencia de eliminación de artefacto).

#### H. Métodos de ensayo para caracterización de locus proto-oncogénico y oncogénico

10 Los genes supresores de tumor, como el PTEN, son aquellos que codifican proteínas que de una manera u otra inhiben la proliferación celular. La pérdida de uno o más de estos "frenos celulares" contribuye al desarrollo de muchos tipos de cáncer mediante la liberación de ciclos celulares, haciendo al evento de pérdida "oncogénico". Muchas proteínas son generalmente reconocidas al ser codificadas por genes supresores de tumor, que incluyen proteínas intracelulares, tales como el inhibidor de ciclina-quinasa P16; receptores para hormonas secretadas (por ejemplo, factor  $\beta$  de crecimiento derivado de tumor); proteínas de control de criterio de valoración que detienen el ciclo celular si el ADN está dañado o los cromosomas son anormales; proteínas que promueven la apoptosis; e incluso enzimas que participan en la reparación del ADN (células que han perdido la capacidad para reparar errores, espacios, o extremos rotos en mutaciones acumuladas de ADN en muchos genes, que incluyen aquellos que son críticos en controlar el crecimiento y proliferación celular).

20 Debido a que una copia de un gen supresor de tumor puede ser suficiente para controlar la proliferación celular, usualmente ambos alelos de un gen supresor de tumores se deben perder o ser inactivados con el fin de promover el desarrollo de tumores. Por lo tanto, las mutaciones oncogénicas de pérdida de función en genes supresores de tumores tienden a actuar recesivamente. En muchos tipos de cáncer, las supresiones o mutaciones puntuales se han producido en uno o más genes supresores de tumor que impiden la producción de cualquier proteína o llevan a la producción de una proteína no funcional de los genes supresores de tumor mutados. Sin embargo, incluso la pérdida de una copia de un gen supresor de tumor puede predisponer una célula a un segundo evento oncogénico. Por ejemplo, dicha relación parece existir entre la pérdida de TMPRSS2-ERG y PTEN, y una conexión adicional con AKT. Véase Squire, JA, TMPRSS-ERG and PTEN loss in prostate cancer, *Nat Genetics* (2009) 41, 509-510. La expresión ERG aberrante se había caracterizado como un evento oncogénico en ratones que se asocia con la pérdida de PTEN. Véase Carver, BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, et al., Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in prostate. *Nat Genetics* (2009) 41, 619-624. Carver et al., sugiere que, mientras que la pérdida de una copia de PTEN puede promover la proliferación celular, la célula no progresa a enfermedad invasiva a menos que se sobreexpresen ERG. Véase Id. de forma similar, los ratones que tienen una construcción de sobreexpresión ERG humana solo parecen no desarrollar tumores de próstata, pero la progenie de cruces con ratones que tienen supresiones PTEN desarrollan tumores. Véase King JC, et al. *Nat Genetics* (2009) 41, 524-526.

40 Incluso con los recientes descubrimientos, muy poco se sabe acerca de este tipo de eventos oncogénicos en la carcinogénesis prostática, aunque el cáncer de próstata es la neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los hombres norteamericanos. Véase Carver, ES, Tran J, Gopalan A, Chen Z, et al., Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in prostate. *Nat Genetics* (2009) 41, 619-624. Con respecto a los eventos oncogénicos relacionados con PTEN, se observó ERG1 en el transcriptoma del cáncer de próstata (Cap), en consonancia con una función como un proto-oncogen sobre-expresado en los tejidos prostáticos malignos. Véase Jemal a. A, et al., *Cancer statistics*, 2005. *CA Cancer J Ch.* 2005;55:10-30. And Tomlins et al., Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer, *Science*, 2005;310:644-648, describe la primera redistribución génica en el cáncer de próstata recurrente, lo que resulta en la translocación de ERG a la región promotora de TMPRSS2. Adicionalmente, también se muestran otros genes para ser trasladadas a los andrógenos sensibles u otros fuertes promotores, ya que ahora se considera que la base del mecanismo de sobreexpresión ERG1. Véase Id. Las fusiones de genes descritas hasta la fecha implican el gen TMPRSS2 sensible a andrógeno y los tres miembros mencionados anteriormente de la familia ETS de factores de transcripción (ERG, ETV1, y ETV4). Los estudios anteriores comienzan con la detección de la expresión, y posteriormente encuentran que aquellas redistribuciones que resultan en sobreexpresión a través de supresión u otra redistribución.

50 Por lo tanto, la identificación de redistribuciones cromosómicas que llevan a supresiones de supresores de tumor, o sobreexpresión posterior de protooncogenes (por ejemplo, ERG) identificados en el cáncer de próstata, representa una nueva oportunidad para entender los tumores epiteliales, que en general han sido previamente caracterizados solo por aberraciones cromosómicas no específicas.

60 En un estudio reciente, la presencia de una supresión común de aproximadamente 2 Mb del cromosoma 21q22.2-3 fue descrito como causantes de las redistribuciones TMPRSS2: ERG discutidas anteriormente, y como se asocia con la progresión de enfermedad. Véase Yoshimoto M, et al., Three-Color FISH Analysis of TMPRSS2/ERG Fusions in Prostate Cancer Indicates That Genomic Microdeletion of Chromosome 21 Is Associated with Redistribución. *Neoplasia* (2006) 8, 465- 469. Adicionalmente, se utiliza un FISH de tres colores con separación para confirmar que una supresión entre TMPRSS2 y ERG en el cromosoma 21 se asocia con eventos de fusión de genes.

65 Por lo tanto, una región de aproximadamente 2Mb se elimina lo que resulta en la sobreexpresión de ERG. Esta supresión común resulta en la formación de gen de fusión en marco efectiva. Sin embargo, hay poca, si existe,

información disponible sobre las consecuencias de la pérdida de los 13 genes que intervienen TMPRSS2 y el ERG en la progresión del cáncer de próstata.

5 Poco o nada se sabe realmente acerca de los eventos que condujeron a redistribuciones del cromosoma 21 para producir fusiones TMPRSS2-ERG y la consiguiente sobreexpresión, o si las fusiones o sobreexpresión se relacionan con expresión de PTEN reducida debido a eliminaciones genómicas. Casi todo el énfasis está en la fusión y consiguiente sobreexpresión de ERG. Por lo tanto, la presente invención también se puede utilizar para caracterizar la naturaleza de eventos posteriores que se relacionan con el estado PTEN.

10 Se describen aquí procedimientos de ensayo para la supresión u otras redistribuciones de supresor (es) de tumor, oncogén(s), proto-oncogén(s), u otros genes de interés mediante FISH. Estos incluyen métodos para ensayar genes objetivo específicos de interés en una región cromosómica comúnmente eliminada cuando se forma el gen de fusión TMPRSS2-ERG, que resulta en la pérdida de ~2 Mb de ADN que contiene 13 genes (por ejemplo, la región 21q22.2 que  
15 pueden ser utilizados en dichos métodos incluyen los conjuntos de sondas preparados como en las secciones C o E y los conjuntos de sondas de la sección D anterior. En algunos métodos, los conjuntos de sondas tienen sitios de hibridación posicionados con respecto a zonas límite como se discute en las secciones C.2(b) y C.2(c).

20 En términos generales, los métodos de ensayo para eliminación de por lo menos un gen de interés mediante FISH comprenden etapas para la realización de FISH con un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende por lo menos una primera sonda de flanco que se hibrida con una posición centromérica para el gen de interés, por lo menos una segunda sonda de flanco que se hibrida con una posición telomérica al gen de interés, y por lo menos una sonda objetivo o sondas que se hibridan con el gen de interés. Las señales FISH de sondas de flanco y sonda objetivo(s) se enumeran. Por lo menos se proporciona una frecuencia de eliminación de artefactos provocada por  
25 truncamientos nucleares; esto sirve como un control negativo. Es posible que la frecuencia de eliminación de artefactos tenga que ser determinada previamente con muestras de control que no comprenden células con una supresión o redistribuciones del gen de interés, y para la frecuencia de eliminación de artefactos se vuelve a utilizar en ensayos múltiples. En función de las señales FISH enumeradas, por lo menos se determina una frecuencia de eliminación aparente. Si la muestra comprende células con una supresión del gen de interés se determina en función de si la  
30 frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefacto. La frecuencia de eliminación de artefactos con la cual la frecuencia de eliminación aparente se compara debe coincidir en términos de si las frecuencias de eliminación son hemicigotas u homocigotas, y que sitios de hibridación de sonda son afectados por la supresión.

### 35 1. Muestras

Las muestras utilizadas en los métodos para ensayar para eliminación de por lo menos un gen de interés mediante FISH, son muestras celulares. Las muestras se pueden fijar químicamente utilizando un conservante tal como formalina, etanol, formaldehído, paraformaldehído-glutaraldehído, o una combinación de cacodilato de sodio, formalina, y  
40 glutaraldehído y se embeben en un material sólido inerte tal como parafina o una matriz de tejido congelado, por ejemplo, compuesto de temperatura de corte óptimo (OCT). En algunas realizaciones, las muestras comprenden células de las cuales por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de las células son diferentes a metafase (por ejemplo, interfase). Véase, por ejemplo, Wick MR, Mills NC, Brix WK. Tissue Procurement, Processing, and Staining Techniques. Chapter 1. p. 1-10. Diagnostic Histochemistry edited by Wick MR. Cambridge University Press 2008.

45 De manera general, las muestras se proporcionan con un soporte sólido (por ejemplo, una matriz de parafina en la que se embebe la muestra, y/o un portaobjetos de vidrio o pared de un pozo de microtítulo).

### 50 2. Realización de FISH

Los métodos de ensayo de supresión descritos aquí involucran hibridación in situ con fluorescencia (FISH). El término "hibridación in situ" de manera general se refiere a hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico objetivo que es parte de una preparación citológica o histológica. Los métodos FISH típicos se discuten en la Sección F.2 anterior.

55 Ejemplos de procedimientos para preparar muestras y realizar FISH son bien conocidos en la técnica y se discuten en la sección F. Como se discute, las muestras se pueden preparar de muchas fuentes, dependiendo del tipo de las células cancerosas o precancerosas que se van a analizar; por ejemplo, la fuente se puede escoger de tumores de próstata, mama, melanoma, y otros tumores sólidos. Las muestras se pueden obtener de biopsias con aguja, biopsias aspiradas por aguja fina, prostatectomías radicales, muestras metastásicas (por ejemplo, de hueso o ganglio linfático), preparaciones de citología (de fluidos corporales tales como orina o ascitos), y células de tumor de circulación aisladas de sangre periférica utilizando preparaciones estándar para fijación de células en etanol o metanol: ácido acético combinado con citocentrifugación, métodos de depósito de capa delgada (por ejemplo ThinPrep, Cytec Corp.), frotis, o pipeteos sobre portaobjetos de microscopio.

65

Se pueden utilizar métodos de hibridación in-situ adecuados y se discuten en la Sección E2. Antes de hibridación in situ, los ADN cromosómicos contenidos dentro de las células se desnaturalizan, normalmente al incubar en la presencia de pH alto, calor (por ejemplo, temperaturas desde 70° C a 95° C), solventes orgánicos tal como formamida y haluros de tetraalquilamonio, o combinaciones de los mismos. Las condiciones de desnaturalización normalmente se establecen de tal manera que se conserva la morfología celular. Por ejemplo, se puede desnaturalizar el ADN cromosómico mediante una combinación de temperaturas por encima de 70° C (por ejemplo, 73 X) y un regulador de desnaturalización que contiene 70% de formamida y 2X SSC (cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03 M). Alternativamente, por ejemplo, el ADN cromosómico obtenido de muestras con biopsia de aguja fina se puede desnaturalizar a 83° C durante 5 minutos.

En algunos métodos, tales como cuando las sondas del conjunto de sondas se proporcionan en forma de hebras dobles, las sondas del conjunto de sondas también se pueden desnaturalizar antes de hibridación in situ. Se pueden utilizar las condiciones de desnaturalización tales como aquellas descritas anteriormente.

Después de eliminación de los productos químicos o condiciones de desnaturalización, se hibridan sondas al ADN cromosómico bajo condiciones de hibridación. "Condiciones de hibridación" son condiciones que facilitan la hibridación entre una sonda y ADN cromosómico objetivo. Las condiciones de hibridación varían, dependiendo de las concentraciones, de las composiciones base, de complejidades, y de las longitudes de las sondas, así como también concentraciones de sal, temperaturas, y longitud de incubación. Por ejemplo, hibridaciones in situ se pueden realizar en regulador de hibridación que contiene 1X a 2X SSC, 50-55% de formamida, un acelerante de hibridación (por ejemplo 10% de sulfato de dextrano), y ADN de bloqueo no marcado para suprimir la hibridación no específica. En general, las condiciones de hibridación, como se describió anteriormente, incluyen temperaturas de 25° C a 55° C, y longitudes de incubación de 0.5 horas a 96 horas. En algunas realizaciones, se puede realizar hibridación a una temperatura desde 32° C hasta aproximadamente 45° C durante 2 a 16 horas.

La unión no específica de sondas cromosómicas a ADN fuera de la región objetivo se puede eliminar mediante una serie de lavados con una solución de sal. La temperatura y concentración de sal en cada lavado depende de la rigurosidad deseada. Por ejemplo, para altas condiciones de rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo a aproximadamente 65° C a aproximadamente 80° C, utilizando 0.2X a 2X SSC, y 0.1 % a 1% de un detergente no iónico tal como NP-40. La rigurosidad se puede reducir al disminuir la temperatura de los lavados o al aumentar la concentración de sal en los lavados. La hibridación de las sondas a la muestra de tejido se puede realizar manualmente, o con la asistencia de instrumentos, tales como el horno de hibridación ThermoBrite, el Procesador VP 2000, o el instrumento de procesamiento XMatrix(TM) (todos disponibles comercialmente de Abbott Molecular, Inc.).

Se puede lograr la detección de señales FISH a partir de una muestra hibridada y lavada para permitir análisis posterior en tiempo real, tal como por un operador quien ve la fluorescencia directamente en un microscopio, o para permitir análisis posterior, al grabar imágenes. la detección de manera general involucra el uso de una fuente de luz de excitación adecuada para cada fluoróforo en uso en el ensayo (por ejemplo, luz que pasa a través de un filtro adecuado, o luz desde un láser de una longitud de onda adecuada); luego se pasa la luz emitida de forma fluorescente a través de un filtro adecuado, y puede ser vista directamente por un operador y/o fotografiar con una cámara, tal como una cámara digital o en función de película, que se puede conectar a un ordenador.

### 3. Enumeración

Las señales FISH de una pluralidad de núcleos en la muestra se enumeran. La pluralidad de núcleos puede comprender por lo menos 50, 75, o 100 núcleos. Se puede lograr la enumeración, por ejemplo, al hacer una lista que contiene una entrada para cada núcleo examinado y cuantas de cada una de las señales FISH están contenidas, y/o al contar el número de núcleos que tiene cada combinación observada de cantidades de señal FISH. Dicha lista también puede contener posibles combinaciones pero no observadas de cantidades de señal FISH. La lista puede ser reorganizada al hacer entradas para cada combinación de cantidades de señal FISH observada, acompañada por su frecuencia (véase, por ejemplo, Tabla 2 adelante). La información obtenida al enumerar las señales FISH debe ser interpretada en vista de por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto, discutida adelante.

### 3. Frecuencia de eliminación de artefacto

Los métodos de ensayo de supresión comprenden proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. Como se discute en la sección F.4 anterior, un núcleo para cualquier muestra puede carecer de señales FISH de una o varias sondas objetivo por razones diferentes a una supresión o redistribución; por ejemplo, en el caso de una muestra de biopsia de aspiración con aguja, que incluye muestras fijadas en formalina, embebidas en parafina, se pueden trincar algunos núcleos en la muestra. También es posible que el sitio de hibridación(s) objetivo en una fracción de los núcleos pueda no ser lo suficientemente accesible durante la etapa de hibridación del procedimiento FISH debido a la compresión de células u otro artefacto que surge de la técnica de biopsia con aguja fina. Adicionalmente, la frecuencia con la que se observan las señales FISH puede ser influenciada por la calidad de y afecta el envejecimiento en las preparaciones de tejido que se estudian. Por lo tanto, no todos los núcleos que carecen de una señal FISH de la sonda objetivo son indicadores de una supresión genética real.



Por lo tanto, con el fin de mitigar el potencial de falsos positivos (en los que una supresión se denomina erróneamente), por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos se proporciona con el fin de distinguir entre resultados de una muestra indicadora de células que tienen una supresión del objetivo del ensayo, y resulta de una muestra en la que las causas de señales de sonda objetivo ausentes son probabilidades diferentes al genotipo subyacente, tal como las fuentes técnicas de error discutidas anteriormente.

Se puede determinar una frecuencia de eliminación de artefactos en función de un ensayo de control, utilizando muestras de células conocidas que no tienen una supresión del gen objetivo o genes. La exactitud de la frecuencia de eliminación de artefactos determinada de las muestras de control se puede optimizar con relación a una muestra de prueba al utilizar muestras de control de células cercanamente coincidentes a la muestra de prueba de las células con respecto al método de preparación de muestra.

Por ejemplo, las muestras de tejido no neoplásico del mismo tipo de tejido como las muestras precancerosas/cancerosas/potencialmente cancerosas que se van a probar para detectar de un gen o genes de interés puede servir como controles. En el caso de ensayos en cánceres de próstata, las muestras de tejido no neoplásico se pueden obtener de pacientes sin cáncer quienes solo se sometieron a cirugía únicamente para hiperplasia de próstata benigna (BPH) para propósitos de control. En el caso de cánceres de mama, las muestras se pueden obtener de pacientes que experimentan solo cirugía para propósitos de reducción o profilácticos.

Como se discutió anteriormente, especialmente en las secciones B y E.4, la frecuencia de eliminación de artefactos también se ve influida por otras variables biológicas que afectan ambas señales FISH y el volumen nuclear relativo en secciones de tumor. La condensación del ADN, el tamaño y la geometría del núcleo, el grosor de las secciones de muestra, el diseño del ensayo (la distancia de la señal en el ensayo FISH de 3 o 4 colores depende parcialmente de la distancia genómica de las sondas), y el índice de crecimiento y el estado de ploidía (mayor probabilidad de mayores niveles de transmisión de ploidía de núcleos de mayor volumen). Adicionalmente a estas variables nucleares, la señal FISH real en sí misma (el "tamaño de punto") puede ocupar más espacio tridimensional en la cromatina nuclear descondensada (paquete de ADN de abertura típica de los genes expresados) en comparación con las regiones condensadas del genoma (ADN de genes reprimidos, por ejemplo). Más aún, las señales FISH individuales pueden ser más difíciles de interpretar si la replicación del ADN ya ha tenido lugar, ya que presentan núcleos G2 "doblete" o conteos de puntos emparejados debido a la duplicación del ADN de la célula. Estos dobletes son puntos físicamente unidos emparejados tocados o ligados, es decir tocados o ligados por una hebra, o adyacentes (con una separación menor que el diámetro de la señal más grande o punto). En algunas realizaciones, los criterios de puntuación se pueden ajustar para asegurar que este efecto no distorsione los resultados de los ensayos (véase Varella-Garcia M et al., EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer, J Clin Pathol. 2009; 62:970-977). Esto puede incluir contar físicamente puntos emparejados ligados y/o puntos adyacentes como una sola señal. Los puntos que están adyacentes pero separados mediante por lo menos el diámetro de la señal más grande se pueden contar como señales separadas. Por otra parte, antes de la replicación del ADN cada señal muestra una señal de un solo punto como hibridación ("singulete") y estos también se cuentan como una sola señal. Varias de estas variables como la ploidía, tamaño nuclear, y condensación de cromatina pueden variar entre muestras de control normales y muestras de tumor. Por lo tanto, estos factores pueden ser difíciles de contar completamente en los controles negativos utilizados para establecer una frecuencia de eliminación de artefactos para ensayos FISH de interfase; esto puede ser de particular importancia en las muestras con bajo contenido de células de tumor o cambios genómicos subclonales adicionales. Por lo tanto, puede ser aconsejable utilizar un umbral estadístico relativamente estricto para denominar eliminaciones, como se discute adicionalmente adelante.

En algunos métodos, por lo menos dos, o más, frecuencias de eliminación de artefactos se proporcionan. Por ejemplo, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos para supresiones hemicigotas y homocigotas. También, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos separadas para supresiones que llevan a la ausencia de señales FISH a partir de diferentes combinaciones de sondas, por ejemplo, supresiones que solo afectan la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, supresiones que afectan la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, y supresiones que afectan la sonda objetivo, la sonda de flanqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo. En los métodos en los que se utiliza un conjunto de sondas que comprenden más de dos sondas de flanqueo, se pueden proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos para cada sonda dentro de un conjunto dado de tal manera que las supresiones que afectan las sondas de flanqueo más distantes de la sonda objetivo se pueden considerar como pozos.

Una ventaja de proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos separadas es que las señales FISH que se pierden debido a fuentes de error, tal como eventos de truncamiento, pueden ser más variables desde el núcleo hasta el núcleo que el genotipo de una población clónica, de tal manera que la frecuencia de eliminación de artefactos para cualquier tipo dado de supresión (por ejemplo, una supresión hemicigota que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo) es menor de lo que sería si por lo menos una sonda de flanqueo centromérica tampoco se utiliza en el ensayo, debido a que algunas de las fuentes de error tal como eventos de truncamiento también pueden afectar por lo menos una sonda de flanqueo centromérica.

La reducción de la frecuencia de eliminación de artefactos puede ser útil dependiendo del tipo de célula bajo análisis, en que algunos tipos de células son especialmente propensos a artefactos de truncamiento. Por ejemplo, en un estudio reciente de las pérdidas de truncamiento de señales por interfase FISH en secciones histológicas de 5 micras, se encontró que alrededor del 20% de los núcleos de médula ósea normales exhiben pérdidas de señal debido a truncamientos. En contraste, ~60% de los núcleos en secciones hepáticas normales exhiben pérdidas de truncamiento (Wilkens L et al. 2005. Standardised fluorescent in situ hybridisation in cytological and histological specimens. *Virchows Arch* 2005; 447: 586-592). Se considera que esta variación de los índices de falsos positivos para detectar pérdidas es debido a los artefactos de corte de truncamiento que tienen una influencia creciente cuando los núcleos de células de hígado mucho más grandes, de forma irregular se truncan con más frecuencia durante la preparación de secciones de 5 micras.

#### 5. Determinación de por lo menos una frecuencia de eliminación aparente

La información obtenida al enumerar las señales FISH se analiza para determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente. Una frecuencia aparente es una observación de cómo a menudo la sonda objetivo se pierde en una muestra. Se debe observar que esta etapa puede ocurrir con cualquier temporizador relacionado con la etapa de proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. También es el caso de que otras redistribuciones, tales como inversiones, resulten en supresiones. Así como con frecuencias de eliminación de artefacto, en algunas realizaciones, por lo menos dos, o más, se determinan frecuencias de eliminación aparentes. En aras de eficiencia, de manera general se aconseja determinar frecuencias de eliminación aparentes y proporcionar frecuencias de eliminación de artefactos en pares susceptibles de comparación (por ejemplo, frecuencias de artefactos y de supresión aparentes para una supresión hemicigota que afecta la sonda objetivo y la sonda de flanco telomérica más cercana a la sonda objetivo). En cualquier evento, con el fin de realizar la siguiente etapa, por lo menos una frecuencia de eliminación aparente debe ser para el mismo tipo de evento de supresión como por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto.

#### 6. Detección de supresiones o redistribuciones de genes de interés

Si la muestra comprende células con una supresión o redistribución (que resulta en supresión) se determina en función de si por lo menos una frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefacto. Como se discutió anteriormente, se puede seleccionar el umbral de importancia de acuerdo con el nivel deseado de especificidad versus sensibilidad utilizando una serie de métodos estadísticos. Por lo tanto, se pueden proporcionar múltiples frecuencias de eliminación de artefactos, y se pueden determinar múltiples frecuencias de eliminación aparentes. Esta etapa adicionalmente puede comprender determinar si múltiples tipos de supresión están presentes. Por ejemplo, la presencia de dos conjuntos completos de señales FISH desde las sondas de flanco y objetivo (2 conjuntos de 3 en el caso de un único gen objetivo) indica que un núcleo no tiene una eliminación del supresor de tumor objetivo (esquemático en la Figura 2B, diagrama izquierdo). La ausencia de una o ambas de las señales FISH de sonda objetivo para objetivos únicos, indica una supresión hemicigota aparente (Figura 2B, centro) o homicigota (Figura 2B, derecha), respectivamente. La información acerca del tamaño de la supresión aparente se puede obtener de ya sea una o más de las sondas de flanco que también están ausentes. Los ejemplos de la Figura 2B derecha y centro son indicadores de supresiones relativamente pequeñas en las que solo se afecta la sonda objetivo.

En otro ejemplo, la presencia de dos conjuntos de señales FISH desde las sondas de flanco y objetivo (2 conjuntos de 4 en el caso de primer y segundo genes objetivo) indica que un núcleo no tiene una eliminación del supresor de tumor objetivo, oncogén, u otros genes objetivo. En este ejemplo, la ausencia de una o dos de las señales FISH de sonda objetivo indica una supresión hemicigota aparente u homicigota, respectivamente. La información acerca del tamaño de la supresión aparente se puede obtener de las cuales las sondas de flanco o genes objetivos que también están ausentes.

Por lo tanto, algunos métodos comprenden determinar si la muestra comprende células con una supresión escogida de supresiones que solo afectan sondas objetivo(s), supresiones que afectan una o dos sondas objetivo y la sonda de flanco centromérica más cercana a una primera sonda objetivo, supresiones que afectan una o dos sondas objetivo y la sonda de flanco telomérica más cercana a una segunda sonda objetivo, y supresiones que afectan ambas sondas objetivo, la sonda de flanco centromérica más cercana a la primera sonda objetivo, y la sonda de flanco telomérica más cercana a la segunda sonda objetivo.

Además de las configuraciones de supresión simples mostradas en la Figura 2B, los patrones más complejos que implican ganancia o pérdida de las señales pueden verse debido a redistribuciones adicionales cerca de las regiones que contienen las sondas de control flanqueantes. Por ejemplo, otras configuraciones de señales complejas que llevan puntos adicionales también pueden surgir de ganancias cromosómicas complejas debido a translocaciones desequilibradas, polisomías o poliploidía, como en trisomía 21. Cualquier patrón que difiere de los patrones simples observados en núcleos normales también se considera usualmente anormal si aparece en una proporción significativa de células. Como con PTEN y otros genes, la evaluación cuidadosa del número y localización de las señales en los patrones aberrantes puede proporcionar información valiosa del cambio cromosómico subyacente.

7. Zonas límite

Una o más de las sondas de flanqueo utilizadas en ensayos de más de un gen objetivo pueden tener un sitio de hibridación en una zona límite o distal al gen de interés relacionado con una zona límite. En algunas realizaciones, por lo menos una primera sonda de flanqueo se hibrida con una posición dentro o centromérica a una primera zona límite centromérica a uno de los genes de interés, y/o por lo menos una segunda sonda de flanqueo se hibrida con una posición dentro o telomérica a una segunda zona límite telomérica al mismo o un gen diferente de interés. En el caso de dos genes objetivo, un gen objetivo se denomina como el primer gen objetivo, y el otro se denomina como el segundo gen objetivo. Como para el ejemplo de PTEN, el uso de sondas de flanqueo con sitios de hibridación colocadas en tal una forma pueden ser útiles debido a que el sitio de hibridación de una sonda de flanqueo posicionada en esta forma debe ser menos propensa a ser suprimida que si estuviera próxima al gen de interés relacionado con la zona límite. El uso de dicho conjunto de sondas puede elevar la frecuencia de supresiones que dan patrones como en el centro y derecha de la Figura 2B. Estos patrones tienen señales de sondas de flanqueo que se hibridan centroméricamente y teloméricamente al (presumiblemente parcial o completamente suprimido) gen de interés, y es menos probable que estos patrones surjan repetidamente a través de artefactos de truncamiento en los cuales se extirpa una sección del volumen del núcleo, debido a que sería necesario para el cromosoma estar dispuesto de tal manera que un bucle de cromatina que contiene el gen de interés pero ningún sitio de hibridación de sonda de flanqueo extendido en el volumen nuclear extirpado. Las zonas límite y posiciones de los sitios de hibridación de hibridación relacionados con estas se discuten en mayor detalle anteriormente; esa discusión también es relevante aquí.

I. Ensayos para detectar de forma distinguible supresiones pequeñas y grandes

Es posible que las células en las que ambas copias de por lo menos dos genes de interés se han eliminado hayan experimentado uno o más eventos de supresión separados de diferentes tamaños. Se describen aquí métodos para detectar de forma distinguible eventos de supresión de diferentes tamaños.

1. Conjuntos de sondas

En los métodos que pertenecen a una disposición más compleja, que existe para la región de ~2MB cromosómica 21q22-23, que contiene no menos de trece genes de acuerdo con el presente proyecto de la secuencia de genomas humanos, se utilizan conjuntos de sondas de por lo menos cuatro sondas, de tal manera que puede ocurrir un nivel más fino de detección de eliminación. El conjunto de sondas comprende por lo menos dos sondas objetivo que se hibridan con los genes de interés (por ejemplo, el gen HMGN1 y el gen DSCAM), por lo menos una primera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen de interés (por ejemplo, ERG), por lo menos una segunda sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica al gen de interés (por ejemplo, TMPRSS2), y opcionalmente por lo menos una cualquiera de por lo menos una tercera sonda de flanqueo que se hibrida con una posición centromérica para el sitio de hibridación de la primera sonda de flanqueo (por ejemplo, DYRK1A), o por lo menos una cuarta sonda de flanqueo que se hibrida con una posición telomérica para el sitio de hibridación de la segunda sonda de flanqueo (por ejemplo, U2AF1). Véase Amono, K, et al. "Association study between the Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) gene and bipolar disorder" (2008) *Psychiatric Genetics* 18 (1) 1-10; Cuddapah, S, et al. "Genomic profiling of HMGN1 Reveals and Association with Chromatin at Regulatory Regions" (2011) *Molecular and Cellular Biology* 31, 700-709. El conjunto de sondas puede comprender adicionalmente una sonda centromérica o pericentromérica.

El conjunto de sondas puede comprender dos subconjuntos que comprenden sondas parcialmente superpuestas. Los dos subconjuntos se pueden utilizar en un ensayo de dos partes en los que por lo menos una sonda de flanqueo posicionada de forma diferente se utiliza en la segunda parte o reflejo del ensayo. Por ejemplo, Figura 22 proporciona una ilustración de una posible configuración de sondas se describió anteriormente para un ensayo de dos partes para supresiones DSCAM pequeñas y grandes en las que una sonda centromérica, una sonda TMPRSS2, una sonda DSCAM, y una sonda ERG se utilizan en la primera parte, y una sonda centromérica, una sonda DYRK1A, una sonda DSCAM, y una sonda U2AF1 se utilizan en la segunda parte. Si una supresión excede la región unida por las líneas de puntos verticales en la Figura 22, se deben afectar una o más de las sondas de flanqueo; supresiones muy grandes pueden ser indicadas cuando se afectan las sondas TMPRSS2 o ERG. Por ejemplo, es posible para una supresión resultar en la pérdida de la región completa de DSCAM al telómero, que puede afectar las sondas DSCAM, TMPRSS2, y U2AF1.

2. Enumeración; frecuencias de artefactos y de supresión aparentes

Las etapas de enumeración de las señales FISH, que proporcionan frecuencias de eliminación de artefacto, y que determinan frecuencias de eliminación aparentes para los ejemplos anteriores son relativamente complejas debido a que existen múltiples sondas para enumerar, y frecuencias de artefactos y aparentes para múltiples tipos de supresiones se pueden proporcionar y determinar, respectivamente.

Por ejemplo, por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para supresiones de DSCAM o HMGN1 con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de

- 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
- flanqueo (es decir, las sondas de flanqueo más cercanas a la sondas objetivo en las direcciones centromérica y telomérica), y por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para supresiones del gen de interés con criterios de valoración entre las dos sondas de flanqueo más distales, en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo. Es decir, la primera frecuencia de eliminación de artefactos corresponde a supresiones que abarcan uno o ambos de DSCAM o HMGN1 pero no los sitios de unión de la primera y segunda sondas de flanqueo, y la segunda frecuencia de eliminación de artefactos corresponde a supresiones más grandes que abarcan un sitio de unión de sonda de flanqueo.
- Alternativamente o adicionalmente, por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para supresiones de DSCAM o HMGN1 con criterios de valoración entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flanqueo en las que uno de los criterios de valoración está entre DSCAM y HMGN1, y por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos se puede proporcionar para supresiones de los genes de interés en los que los criterios de valoración no están entre DSCAM y HMGN1. Es decir, la primera frecuencia de eliminación de artefactos corresponde a supresiones que abarcan uno de DSCAM o HMGN1 pero no el otro, y la segunda frecuencia de eliminación de artefactos corresponde a supresiones que abarcan ambas (debido a que tampoco el criterio de valoración está entre los genes).
- La discusión anterior es aplicable independientemente de si las sondas de flanqueo se hibridan a las muestras juntas o en un ensayo de dos partes.
3. Determinación de si la muestra comprende células con una eliminación grande o pequeña
- La determinación de si la muestra comprende células con una supresión del gen de interés que afecta el sitio de hibridación de cualquiera de las sondas de flanqueo utilizadas es en función de si la frecuencia de eliminación aparente relevante es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos relevante, como se describió anteriormente.
- Una muestra en la que la sonda objetivo tiene una frecuencia de eliminación hemicigota u homocigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada se determina que comprende solo eliminaciones o eliminaciones pequeñas (que no afectan ninguna de las sondas de flanqueo) si ninguna de las sondas de flanqueo tienen frecuencias de eliminación aparentes significativamente mayores que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada.
- Si la sonda objetivo y por lo menos una sonda de flanqueo tienen frecuencias de eliminación aparentes significativamente mayores que la frecuencia de eliminación de artefactos adecuada, entonces es probable que esté presente una supresión grande.
- Se debe observar que la posibilidad de un par inusual de supresiones pequeñas en las que, por ejemplo, solo la hibridación de una sonda de flanqueo se elimina en una copia del cromosoma 21 y solo el sitio de hibridación de la sonda objetivo se elimina en la otra copia del cromosoma 21 de manera general se pueden descartar en función de la tendencia de señales FISH del mismo cromosoma que está más cerca al otro; por lo tanto, en el caso de una eliminación grande hemicigota, las señales FISH del cromosoma no afectado deben estar cercanas entre sí.
- Es posible para ambas supresiones pequeñas y grandes estar presentes; en estos casos, la sonda objetivo tiene una frecuencia de eliminación homocigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefacto correspondiente, y por lo menos una sonda de flanqueo tiene una frecuencia de eliminación hemicigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto correspondiente. En los casos en los que la eliminación grande ha resultado en la pérdida de dos sitios de hibridación de sonda de flanqueo (por ejemplo, una pérdida de la región completa de un gen de interés al telómero que afecta dos sondas de flanqueo con sitios de hibridación telomérica al gen de interés), entonces dos sondas de flanqueo tendrían una frecuencia de eliminación hemicigota aparente significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefacto correspondiente.
- La eliminación homocigota del gen de interés en donde existe por lo menos una eliminación grande puede ser indicadora de un tumor metastásico o metastásico; un tumor metastásico es capaz de hacer surgir por lo menos un segundo tumor en otra ubicación en el cuerpo, y el segundo tumor es un tumor metastásico. En alguna de dichas realizaciones, una copia del el gen de interés se pierde debido a una supresión pequeña y una copia se pierde debido a una supresión grande. En algunos métodos, ambas copias del gen de interés se pierden debido a eliminaciones grandes. Pueden existir por lo menos una eliminación grande que afecta por lo menos dos sitios de hibridación de sonda de flanqueo localizados teloméricos al gen de interés. El más distal (con respecto al gen de interés) de dicho por lo menos dos sitios de hibridación de sonda de flanqueo puede ser por lo menos 5, 7.5, 10, o 12.5 Mb del gen de interés.
- El método para detectar supresiones pequeñas y grandes puede comprender realizar FISH sobre una primera muestra celular que comprende una pluralidad de células con un primer subconjunto de sondas compuesto por el conjunto de sondas y realizar FISH sobre una segunda muestra celular del mismo individuo como la primera muestra celular que

comprende una pluralidad de células con un segundo subconjunto de sondas compuesto por el conjunto de sondas; los genes de interés son DSCAM y HMG1; el primer subconjunto de sondas comprende una sonda de flanqueo que se hibrida con TMPRSS2 y una sonda de flanqueo que se hibrida con ERG; y el segundo subconjunto de sondas comprende una sonda de flanqueo que se hibrida con DYRK1A y una sonda de flanqueo que se hibrida con U2AF1. Cuando se detectan supresiones DSCAM y/o HMG1 en este método, el análisis de si por lo menos uno de los sitios de hibridación de las sondas de flanqueo se elimina junto con DSCAM y/o HMG1 se puede utilizar para determinar si la supresión es una supresión grande.

#### 4. Zonas límite

Como en los métodos de la sección H, por lo menos una primera sonda de flanqueo se puede hibridar a una posición dentro o centromérica a una primera zona límite centromérica al gen de interés, y/o por lo menos una segunda sonda de flanqueo se hibrida con una posición dentro o telomérica a una segunda zona límite telomérica al gen de interés.

También es posible para la tercera y/o cuarta sondas de flanqueo ser posicionadas dentro de una zona límite o distal al gen de interés relacionado con una zona límite. Es decir, por lo menos una tercera sonda de flanqueo se puede hibridar a una posición centromérica para una primera zona límite centromérica distal al sitio de hibridación de por lo menos una primera sonda de flanqueo, y/o por lo menos una cuarta sonda de flanqueo se hibrida con una posición telomérica para una segunda zona límite telomérica distal al sitio de hibridación de por lo menos una segunda sonda de flanqueo.

Las zonas límite y posiciones de sitios de hibridación relacionados con estas se discuten en mayor detalle en las secciones anteriores; esa discusión también es relevante aquí.

#### J. Conjuntos de sondas y equipos

Se pueden preparar conjuntos de sondas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Se describen aquí conjuntos de sondas que comprenden por lo menos una sonda que se hibrida con DSCAM o HMG1, por lo menos una sonda que se hibrida con TMPRSS2 o U2AF1, y por lo menos una sonda que se hibrida con ERG. En dichos conjuntos de sondas, por lo menos una sonda que se hibrida con DSCAM o HMG1 sirven como una sonda objetivo, y por lo menos una sonda que se hibrida con TMPRSS2 o U2AF1 y por lo menos una sonda que se hibrida con ERG sirve como sondas de flanqueo. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda de flanqueo adicional que se hibrida con DYRK1A.

El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con DSCAM derivado de por lo menos uno de los BAC RP11-139D12, RP11-907P24, RP11-280017, RP11-183112, RP11-281F3, RP11-1113M13, y RP11-123A7. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con HMG1 derivado de por lo menos uno de los BAC RP11-137J13 y RP11-348C15. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con TMPRSS2 derivado de por lo menos uno de los BAC RP11-35C4, CTD-3095D11 y RP11-671L10. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con ERG derivado de por lo menos uno de los BAC RP11-476D17 y RP11-951121. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con DYRK1A derivado de por lo menos uno de RP11-105024, RP11-777J19 y CTD-3140L2. El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda que se hibrida con U2AF1 derivado de por lo menos uno de RP11-446L19 y CTD-2601A22. Estos y todos los otros BAC mencionados aquí están disponibles en el Instituto del Cáncer Roswell Park, Buffalo, Nueva York, y el Centro de Recursos BACPAC del Hospital de Niños y Centro de Investigación en Oakland, California. La información de secuencia está disponible, por ejemplo, del Registro NCBL Clone (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/clone/>).

Adelante se proporciona una tabla que proporciona información acerca de las ubicaciones del sitio de hibridación en el cromosoma 21 (las coordenadas son como en la versión GRCh37/h19, Febrero 2009) para los BAC seleccionados, que se pueden utilizar en conjuntos de sondas de acuerdo con la descripción.

	Inicio	Fin
<b>HMG1(21q22.2)</b>		
RP11-137J13	40705310	40858474
RP11-348C15	40598841	40764635
<b>DSCAM (21q22.2)</b>		
RP11-139D12	41318920	41468615
RP11-907P24	41464872	41657742
RP11-280O17	41558372	41699925
RP11-183I12	41671029	41831863
RP11-281F3	41782687	41975589
RP11-1113M13	41860823	42000124
RP11-123A7	42002863	42168411
<b>ERG (21q22.2)</b>		
RP11-476D17	39682968	39863671
RP11-951I21	39899621	40089103
<b>TMPRSS2 (21q22.3)</b>		
RP11-35C4	43254164	43420344
CTD-3095D11	43051013	43079214
RP11-671L10	42787192	42954776
<b>U2AF1</b>		
RP11-446L19	44237045	44550450
CTD-2601A22	44456262	44606970
<b>DYRK1A(21q22.13)</b>		
RP11-105O24	38795458	38951057
RP11-777J19	38719389	38887895
CTD-3140L2	38881424	38942365

5 El conjunto de sondas puede comprender sondas que se hibridan con DSCAM, HMG1, TMPRSS2, y ERG, en donde la sonda(s) que se hibrida a DSCAM se deriva/n de los BAC RP11-846G17, RP11-907P24, RP11-280O17, o una combinación de los mismos; y la sonda(s) que se hibridan a HMG1 se deriva/n de los BAC RP11-8137J13, RP11-348C15, o ambos; la sonda(s) que se hibrida a TMPRSS2 se deriva/n de los BAC RP11-35C4, CTD- 3095D11, o ambos; y la sonda(s) que se hibrida a ERG se derivan de los BAC RP11-476D17, RP11-951I21, o ambos.

10 El conjunto de sondas puede comprender por lo menos una sonda centromérica o pericentromérica. Esta se puede utilizar para enumeración de cromosomas. Ejemplos de sondas pericentroméricas incluyen sondas derivadas de los BAC CTD-2251K12, RP11-47B13, CTD-2314J10 o una combinación de los mismos.

15 El conjunto de sondas puede consistir de sondas derivadas de RP11-139D12, por lo menos uno de RP11-476D17 y RP11-951I21, y por lo menos uno de RP11-35C4 y CTD-3095D11.

K. Breve descripción de los dibujos

Los dibujos acompañantes, que se incorporan en y constituyen una parte de esta especificación, ilustran varias realizaciones de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

5 Figura 1. Representación esquemática de supresión intersticial grande de parte de un brazo de cromosoma. En este ejemplo se pierden diversas citobandas después de que tiene lugar la supresión.

10 Figura 2. Representación esquemática de configuraciones de conjuntos de sondas (panel A) e interpretaciones típicas (panel B) utilizando análisis FISH interfase de tres colores de núcleos. El panel A muestra la configuración de los sitios de hibridación de las sondas en un cromosoma esquemático. La sonda A se marca con un primer color, representado como eclosión (en microscopía de fluorescencia, este color puede ser rojo, por ejemplo); la sonda objetivo ("Tum Sup") se marca con un segundo color, representado como blanco (en microscopía de fluorescencia, este color puede ser verde, por ejemplo); y la sonda B se marca con un tercer color, representado como negro (en microscopía de fluorescencia, este color puede ser azul, por ejemplo). En el panel B un núcleo normal (izquierda) tendrá tres pares de cada señal de color. Para la pérdida de hemigigoto simple (núcleo central) del gen Tum Sup, se pierde una señal FISH "blanca" (es decir, solo está presente una señal), pero sondas A y B que flanquean el gen supresor de tumor permanecen presentes en duplicado. Para la pérdida homocigota (núcleo derecho) ambas señales FISH "blancas" se eliminan mientras que se retienen sondas de flanco.

20 Figura 3. Posibles señales FISH de células que han experimentado redistribuciones complejas. Las señales FISH en esta ilustración esquemática se generan por el mismo conjunto de sondas como en la Figura 2. El patrón a la izquierda se pueden generar por una célula en la que dos duplicaciones de una región que comprende el sitio de hibridación de la sonda de flanco A y ha ocurrido una duplicación de una región que comprende el sitio de hibridación de la sonda de flanco B. El patrón a la derecha se puede generar por una célula en la que el supresor de tumor se ha eliminado de forma hemigigota y han resultado tres copias extra de una región que comprende el sitio de hibridación de la sonda B de los eventos de duplicación.

30 Figura 4. Ilustración de umbrales para puntuar las supresiones utilizando células de próstata normales de control y detección de eliminación PTEN utilizando un conjunto de sondas de dos colores (Vysis Inc.) en las que una sonda se hibrida con PTEN y la otra sonda es una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 10 con un sitio de hibridación centromérico.

35 Figura 5. Diseño de ensayo FISH utilizando sondas que se hibridan a TSPAN75, PTEN, y FAS. El panel A es una ilustración de sitios de hibridación de sondas que se pueden utilizar para detectar eventos de supresión PTEN. Los tres conjuntos de sondas comprenden una sonda PTEN roja que se flanquea por el TSPAN75 violeta en el lado centromérico, y por el gen FAS verde el lado telomérico. El panel B es una representación esquemática tridimensional de FISH de interfase de cuatro colores utilizando células normales que se esperará tenga dos puntos rojos (PTEN; representados como blanco), verde (FAS; representado como eclosión diagonal), azul (sonda de enumeración de cromosoma 10; eclosión transversal) y violeta (TSPANIS; representado como negro) por núcleo. La sonda de centrómero azul se utiliza para determinar si la monosomía 10 puede estar presente. Debido al uso de la proximidad cercana de los sitios de hibridación de las sondas de flanco a aquellos de la sonda objetivo, los truncamientos tienden a impactar las sondas de flanco y la sonda objetivo; los algoritmos de puntuación para la supresión se pueden diseñar con discriminación mejorada entre eventos de supresión reales que no afectan las sondas de flanco y la sonda objetivo y los truncamientos provocados mediante seccionamiento. En el análisis de ensayo de núcleos normales tales como en la sección esquemática mostrada aquí se pueden utilizar para proporcionar niveles de umbral de frecuencia de eliminación de artefactos para cada sonda debido a exclusión de truncamiento durante seccionamiento.

50 Figura 6. Representación esquemática tridimensional de FISH de interfase de cuatro colores utilizando células eliminadas de forma hemigigota para PTEN que se esperará tenga un punto rojo (PTEN; representado como blanco), dos verdes (FAS; representado como eclosión diagonal), dos azules (sonda de enumeración de cromosoma 10; eclosión transversal) y dos violetas (TSPANIS; representado como negro) por núcleo.

55 Figura 7. Representación esquemática tridimensional de FISH de interfase de cuatro colores utilizando células eliminadas de forma hemigigota una región que comprende PTEN y FAS que se esperará tenga un punto rojo (PTEN; representado como blanco), uno verde (FAS; representado como eclosión diagonal), dos azules (sonda de enumeración de cromosoma 10; eclosión transversal) y dos violetas (TSPANIS; representado como negro) por núcleo.

60 Figura 8. FISH de Metafase con tres sondas en los cromosomas de una célula con una supresión PTEN homocigoto pequeño. Figura 8A. Señales FISH de una sonda de flanco centromérica derivada de RP11-420K10, con un sitio de hibridación en 10q23.2. Se observan dos señales FISH de doblete para esta sonda. Figura 8B. Señales FISH de una sonda de flanco telomérica derivada de RP11-246B13, con un sitio de hibridación en 10q25.1. Se observan también dos señales FISH de dobletes para esta sonda. La Figura 8C. Ausencia de señales FISH de RP11-846617, que se pueden hibridar a PTEN si está presente. Solo es visible alguna purga a través de teñido de ADN no específico. Figura 8D. Superposición de tres canales mostrados en los paneles A-C y el canal DAPI.

65 Figura 9. Se muestran dos núcleos que comprenden múltiples señales FISH de sondas centroméricas de BMPR1A, PTEN, FAS, y cromosoma 10. El núcleo superior muestra dos señales centroméricas (C) y dos agrupaciones de señales

BMPR1A/PTEN/FAS (B/P/F). El núcleo inferior parece ser un núcleo de post-replicación en el que existen dos agrupaciones de BMPR1A/PTEN/FAS más señales centroméricas (B/P/F/C), y dos agrupaciones B/P/F, una de las cuales está cerca de una señal centromérica. Es posible que dos señales centroméricas no se resuelvan, o que una se pierda debido a un evento de truncamiento.

5  
Figura 10. Perfil de número de copias para muestras de cánceres de próstata versus ADN de referencia normal a partir de datos CGH. El perfil a la izquierda indica el grado de pérdida en las muestras de cáncer, mientras que el perfil a la derecha indica el grado de ganancia. La cabeza de flecha indica un pico en el perfil de pérdida que corresponde a la posición de PTEN. Véase Ejemplo 1 para discusión adicional.

10  
Figura 11. Resultados de FISH para 82 muestras de cánceres de próstata con una eliminación de PTEN hemicigota. Las sondas con 1 pérdida de señal FISH se indican mediante sombreado; así una muestra que pierde solo 1 señal de PTEN solo se ha sombreado en la fila de PTEN, mientras que una muestra en la que se pierden ambas sondas de flanco también se han sombreado en todas las tres flechas. Véase Ejemplo 3 para discusión adicional.

15  
Figura 12. Resultados de FISH para 50 muestras de cánceres de próstata con una eliminación de PTEN homocigota. El trazado es como en la Figura 11 excepto que el sombreado indica pérdida homocigota y la eclosión diagonal indica pérdida hemicigota. Véase Ejemplo 3 para discusión adicional.

20  
Figura 13. Imágenes de microscopía FISH representativas para varios estados de eliminación de PTEN. Las cabezas de flecha blancas indican señales FISH de PTEN. Adicionalmente a PTEN, las sondas utilizadas con como en la Figura 9. Las células en el panel A tienen 2 de cada señal FISH (normal). Las células en el panel B carecen frecuentemente de una señal FISH de PTEN (eliminación de PTEN hemicigota pequeña). Las células en el panel C frecuentemente carecen de una señal FISH de PTEN y una señal FISH de sonda A (eliminación de PTEN hemicigota grande). Las células en el panel D frecuentemente carecen de ambas señales FISH para PTEN y sonda B (eliminación homocigota). Las células en el panel E frecuentemente carecen dos señales FISH de PTEN (eliminación homocigota pequeña).

25  
Figura 14. Ideograma circular de cromosoma 10q en el que los duplicados de segmento se conectan por las líneas curvas en el interior del círculo. Las tres cabezas de flecha fuera del círculo indican, de abajo hacia arriba, los sitios de hibridación de la sonda A, la sonda PTEN, y sonda B, respectivamente.

30  
Figura 15. El cromosoma 10 se muestra con la ubicación del PTEN en círculo. Una gráfica de pérdidas y ganancias generadas desde los datos de número de copias CGH del Ejemplo 1 se muestran adelante en el esquema del cromosoma. En la parte inferior dos flechas son CNV y sitios de duplicado de segmentos.

35  
Figura 16. Se muestra una ampliación de los datos de la Figura 15 en la vecindad de PTEN. Se indican las ubicaciones de la sonda A y Sonda B de la Figura 13 et al. CNV y los duplicados de segmento se muestran en la 3ª y 5ª filas por debajo de los datos CGH. Debajo hay una representación de áreas eliminadas en muestras de cáncer de próstata individuales (las líneas gruesas indican eliminaciones).

40  
Figura 17. Subconjuntos de sondas para un método de 2 partes para distinguir pequeñas y grandes eliminaciones PTEN. En la primera parte del método, la FISH se puede realizar con una sonda de flanco que se hibrida a TSPAN15, una sonda objetivo que se hibrida a PTEN, y una sonda de flanco que se hibrida a FAS. También se puede utilizar una sonda centromérica. Las zonas de límite, en los puntos de ruptura de pequeñas eliminaciones que parecen ocurrir con más frecuencia, se indican con líneas de puntos. También se indica la posición de una agrupación de duplicados de segmentos (SD). En la segunda parte ("ensayo de reflejo"), la sonda de flanco se hibrida a BMPR1A y SUFU. Cada parte del ensayo interroga si una región relativamente cerca de PTEN en un lado se ve afectada por una gran eliminación y proporciona una sonda más distante en el otro lado que se vería afectada en eliminaciones aún más grandes; en el caso de SUFU, las pérdidas pueden ser provocadas por eliminaciones que se extienden desde PTEN todo el camino hasta el telómero.

45  
Figura 18. Representación esquemática de señales FISH a partir de sondas como en la Figura 17 unido a un cromosoma intacto para las dos partes del ensayo para distinguir eliminaciones PTEN grandes y pequeñas.

50  
Figura 19. Representación esquemática de sitios de hibridación de sonda para las sondas de los ensayo de dos partes como en la Figura 17 a lo largo del cromosoma 10 y BAC de los cuales se pueden derivar las sondas. El panel A muestra las sondas del primer subconjunto y el Panel B muestra las sondas del segundo subconjunto (para el ensayo de reflejo).

55  
Figura 20. Posiciones relativas de CNV y locus de duplicado de segmentos cercanos a PTEN, BMPR1A, SUFU, TSPAN75, y FAS.

60  
Figura 21. Código fuente de lenguaje de programación Python para extracción de aciertos de un archivo Blast, con un 95% de identidad y longitud > 10.000 pb.

65



Figura 22. Representación esquemática de configuraciones de conjuntos de sondas utilizando FISH de cuatro colores para detectar eliminaciones más grandes y más pequeñas. Esto muestra los sitios de hibridación de sondas sobre una sección de explosión de la región 21q22.2. La sonda objetivo A mostrada con líneas verticales (DSCAM) se marca a todo color (aguamarina, por ejemplo). La Sonda objetivo B se muestra con rayas horizontales (HMGN1) se marca en un segundo color (Dorado, por ejemplo). La sonda de flanqueo C mostrada a cuadros (ERG) se marca en un tercer color (por ejemplo, naranja). La sonda de flanqueo D, se muestra en sólido (5' TMRSS2) se marca en un cuarto color (por ejemplo, verde). El diagrama también muestra la sonda de flanqueo centromérica E en puntos (DYRK1A, marcado en flúor verde, por ejemplo) y sonda de flanqueo telomérica F en líneas cruzadas (U2AF1-marcado en flúor dorado, por ejemplo) que se utilizan en los casos donde se pierden 3 señales de las primeras cuatro sondas, y un límite de eliminación grande es un efecto. En una prueba de cuatro colores, si se pierden las sondas A y B, pueden permanecer las Sondas C y D (compuesto fluorescente Naranja y verde). Si se pierden las Sondas A, B, y C, permanece la sonda D (compuesto fluorescente verde), y se puede utilizar una prueba de 3 colores de seguimiento con cualquiera de las sondas de flanqueo adicionales para determinar el límite de eliminación.

Figura 23. Mapa de la región 21q22.13-21q22.3 que muestra ubicaciones de gen y sondas de ejemplo y una indicación de una zona dentro de la cual pueden ocurrir eliminaciones.

#### Ejemplos

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la invención, aspectos y resultados los cuales se ilustran en los dibujos acompañantes.

Ejemplo 1. Análisis de la variación del número de copias, duplicado de segmentos, y datos de hibridación genómica comparativa para el cromosoma 10; selección del sitio de sonda

Los datos de CGH de Liu et al., Nat. Med. 2009; 15:559-65 se analizan in silico. El análisis de número de copias in silico de la región del cromosoma 10q en 58 muestras Cap metastásicas de 14 pacientes (Liu W et al. Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer, Nat. Med. 2009; 15:559-65) se realiza aplicando segmentación de rango, con un umbral de significación de  $1.0 \times 10^{-6}$  y un mínimo de 5 sondas por segmento (Número de Copias Nexus v.4 Número; BioDiscovery, El Segundo, CA). Se asignan desequilibrios genómicos ya sea ganancia [ $\log(3/2)$  o umbral de 0.2] o pérdida [ $\log(1/2)$  o umbral de -0.3], cada uno determinado por dos Transiciones de Número de Copia (CNT), como se define por Ferreira BI et al., Array CGH and geneexpression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma, Oncogene 2008; 27:12084-2090.

Los datos que muestran las áreas de pérdida cercanas a PTEN se muestran en la Figura 16. La abundancia promedio de locus en la población de muestras CaP metastásicas relacionadas con la referencia también se determinan y grafican (Figuras 15 y 16; Véase también Figura 10). Se determina que la abundancia se reduce en más del 20% en la región de 81.5 Mb a 89.67 Mb (es decir, la ~8 Mb centromérica a PTEN), lo que representa una transición de número de copias en la población.

Se obtienen los datos de Variación de Número de Copias (CNV) a partir del Proyecto CNV del Instituto Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>) en formato de texto ASCII. Los datos disponibles corresponden a 269 muestras distintas recogidas por el consorcio internacional HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los archivos descargados luego se filtran y sólo las regiones que pertenecen al cromosoma 10 se transfieren a una hoja de cálculo. Las regiones de superposición se seleccionan manualmente en Microsoft Excel. Los datos de duplicados de segmentos se obtienen al emplear alineaciones BLAST (Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 1990; 21 5: 403 -410) utilizando el cromosoma 10 montado como la base de datos de referencia.

Los duplicados de segmento individuales obtenidos de la base de datos de duplicados de segmentos (She X et al., Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome, Nature 2004; 431:927-930, <http://humanparalogy.gs.washington.edu/>) luego se alinean al cromosoma de forma automática y los aciertos resultantes tabulados para cada segmento en la base de datos. Las Tablas para las más de 9000 secuencias en la bases de datos de duplicados de segmento se filtran, y sólo los aciertos (alineaciones) con más del 95% de homología y más de 10 kilobases se seleccionan automáticamente mediante programación de ordenador (Figura 21). Las regiones contiguas luego se seleccionan manualmente en la misma manera que los segmentos de CNV. El valor de corte considerado para agrupar alineaciones contiguas (aciertos) es de 50 kilobases de distancia. Otro valor de corte de 100 kilobases de distancia se emplea con el fin de agrupar las agrupaciones resultantes.

Se determina que el cromosoma 10 contiene grupos de duplicados de segmentos (SDS) y CNV en las regiones que se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Duplicados de segmentos del cromosoma 10 y CNVs

Regiones de alta densidad	Inicio (bp)	fin (bp)	Longitud (bp)
CNV1	42,004,899	42,760,575	755,676
CNV2	45,341,719	49,121,538	3,779,819
CNV3	50,641,980	51,595,172	953,192
CNV4	76,904,943	77,440,455	535,512
CNV5	80,945,468	81,722,592	777,124
CNV6	88,505,038	89,299,742	794,704
CNV7	90,825,044	91,007,466	182,422
CNV8	98,779,953	98,952,462	172,509
CNV9	102,141,840	102,555,726	413,886
CNV10	107,519,652	107,743,529	223,877
CNV11	110,448,977	110,633,486	184,509
CNV12	122,625,702	122,891,863	266,161
CNV13	124,253,065	124,444,805	191,740
CNV14	125,047,207	125,259,149	211,942
CNV15	127,443,890	127,776,692	332,802
CNV16	134,076,220	135,240,498	1,164,278
Regiones de alta densidad	Inicio (bp)	fin (bp)	Longitud (bp)
SD1	41,991,393	42,173,845	182,452
SD2	42,531,265	42,689,258	157,993
SD3	45,492,329	46,843,228	1,350,899
SD4	47,023,808	47,533,536	509,728
SD5	47,731,989	47,900,982	168,993
SD6	48,376,799	48,697,638	320,839
SD7	48,865,543	49,055,736	190,193
SD8	50,735,042	51,157,549	422,507
SD9	51,275,627	51,628,828	353,201
SD10	52,104,752	52,214,149	109,397
SD11	57,043,647	57,055,423	11,776
SD12	75,091,834	75,143,840	52,006
SD13	80,936,173	80,980,415	44,242
SD14	81,081,817	81,275,000	193,183
SD15	81,379,701	81,625,517	245,816
SD16	81,959,635	82,002,788	43,153
SD17	88,743,560	88,770,949	27,389
SD18	88,890,157	89,250,617	360,460
SD19	127,598,385	127,609,227	10,842
SD20	135,233,079	135,363,669	130,590

5 Las coordenadas en la Tabla 1 se refieren a las posiciones en el cromosoma 10 de la versión UCSC NCB136hg18 (marzo 2006) del genoma humano.

10 En función de las ubicaciones de los duplicados de segmento, CNV, y transición de número de copias de población, los locus TSPAN1 5 y BMPR1A se seleccionan como sitios de hibridación para sondas centroméricas de flanqueo. Los locus FAS y SUFU se seleccionan como sitios de hibridación para sondas de flanqueo teloméricas.

Ejemplo 2. FISH de tres colores con una muestra que tiene una eliminación de PTEN homocigota.

Los cromosomas de metafase de células de la estirpe celular PC3 (Beheshti B et al., Evidence of chromosomal instability in prostate cancer determined by spectral karyotyping (SKY) and interphase fish analysis, Neoplasia 2001 ;

3:62-9) se fijan y hibridan con tres sondas distinguiblemente marcadas preparadas utilizando el RP11- 420K10 BAC, con un sitio de hibridación a 10q23.2 (etiqueta verde); el RP11-246B13 BAC, con un sitio de hibridación en 10q25.1 (marcado en rojo); y RP11-846G17, con un sitio de hibridación en PTEN (marcado aguamarina). Los cromosomas también se contratiñen con DAPI (azul). Las imágenes en los canales rojo, verde, aguamarina y azul fueron obtenidas por microscopía fluorescente. Las imágenes de un conjunto representativo de cromosomas se muestran en la Figura 8, en la que cuatro señales de FISH eran visibles en los canales verde y rojo (paneles A y B). Se presentan 4 señales FISH ya que el genoma diploide se ha replicado, pero aún no se segrega en metafase. No se observaron señales FISH aguamarinas para la sonda PTEN (panel C) aunque es visible la fluorescencia DAPI ligera en este canal. El Panel D muestra una superposición de las tres imágenes de los paneles A-C y la fluorescencia DAPI del canal azul.

Ejemplo 3. Mapeo de eliminación de FISH de interfase cuatro colores

Se realiza FISH interfase de cuatro colores en 132 muestras de tejido de próstata canceroso eliminados para por lo menos una copia de PTEN. Las 132 muestras son un subgrupo de 330 muestras de tejido de próstata cancerosos clínicos tomados en la Universidad McGill y la Universidad de Toronto. Los detalles sobre estas muestras aparecen en las siguientes tablas.

Desglose del total de 330 pacientes

Prostatectomías Radicales	134 (41%)
tumores metastáticos/ resistentes a hormonas	196 (59%)
Total	330

Desglose de las 132 muestras con una eliminación PTEN hemi u homocigota

Prostatectomías Radicales	86
tumores metastáticos/ resistentes a hormonas	46
Total	132

Las sondas utilizadas son sondas derivadas de los BAC RP11-141D8 y RP11-52G13 (“sonda A”; sitio de hibridación centromérico para PTEN); una sonda PTEN derivada de BAC RP11-846G17, y una sonda derivada de los BACs RP11-399O19 y RP11-360H20 (“sonda B”; sitio de hibridación telomérico a PTEN). Las sondas se marcan con fluoróforos distinguibles por traducción nick. La información de posición para los clones BAC se puede obtener de la asamblea Human marzo 2006 del UCSC Genome Browser 1. También se utiliza la sonda centromérica del cromosoma 10 SpectrumAqua marcada CEPA 10, Vysis Abbott Molecular, Des Plaines, IL, EE.UU.

El análisis de las 132 muestras indica que 82 de las mismas tienen eliminaciones PTEN hemicigotas y 50 tienen eliminaciones PTEN homocigotas, en función de la presencia de 1 o 0 señales FISH de sonda PTEN en por lo menos 30% de las células. Adicionalmente, la presencia o ausencia de sondas A y B se enumera para determinar si las eliminaciones también se abarcan en los sitios de hibridación de estas sondas. Los resultados se enumeran en la Tabla 2 adelante y se muestran en las Figuras 11-13.

Tabla 2. Grados de eliminaciones

Eliminaciones de PTEN hemicigotas		Eliminaciones de PTEN homocigotas	
Sondas afectadas	Frecuencia	Sondas afectadas	Frecuencia
PTEN	37%	PTEN (0)	48%
PTEN y Sonda B	32%	Sonda A (1),PTEN (0), Sonda B (1)	22%
Sonda A y PTEN	3%	PTEN (0) y Sonda B (0)	12%
Sonda A, PTEN, y Sonda B	28%	PTEN (0) y Sonda B (1)	10%
		Sonda A (A), PTEN (0), Sonda B (0)	4%
		Sonda A (1) y PTEN (0)	4%

En la columna de eliminaciones PTEN homocigotas, los números entre paréntesis indican el número de señales FISH de una sonda dada que estaban presentes; así, por ejemplo, “la sonda A (1), PTEN (0), Sonda B (1)” indica que ya sea un cromosoma se elimina para solo para PTEN y el otro cromosoma se elimina para toda la región de la sonda A Sonda B, o un cromosoma se elimina para PTEN y Sonda B, y el otro cromosoma se elimina para la sonda A y PTEN.

El tamaño mínimo de las eliminaciones que afectan solo a PTEN se estima que es 176 kb. El rango de tamaño de las eliminaciones más grandes, que afectan la sonda A, PTEN, y sonda B, se estima como por lo menos 2.5 Mb.

Ejemplo 4. Resolución del estado de PTEN en muestras difíciles de interpretar por dos FISH de colores

5 Se analiza un conjunto de 91 muestras embebidas fijadas en formalina de prostatectomías radicales con resultados clínicos desconocidos en el momento del estudio utilizando FISH de interfase bicolor con el PTEN disponible comercialmente y sondas centroméricas de Abbott Inc., y mediante FISH de cuatro colores, utilizando un conjunto de sondas en el que la sonda A se prepara a partir de los BAC RP11-141D8 y RP11-52G13 y las sonda PTEN y la sonda B son como en el Ejemplo 3. Se identifican seis muestras en las que los resultados fueron diferentes entre los dos ensayos. Estos resultados se listan en la Tabla 3 adelante.

10 Los criterios de análisis para el ensayo de dos colores son: por lo menos el 70% de los núcleos con 2 señales de PTEN y dos sondas centroméricas de cromosomas 10: sin cambio de copia 25% -30% de los núcleos con pérdida simultánea de una señal de PTEN que falta pero la presencia de dos sondas centroméricas es: inconclusa. Mayor de 30% de los núcleos con una señal de PTEN que falta y ambas sondas centroméricas retenidas: eliminación hemicigota. 30% -100% de núcleos con dos señales de PTEN que faltan y sondas centroméricas retenidas: eliminación homocigota.

15 Se establecieron criterios de análisis para el ensayo de cuatro colores después se establecieron artefactos de truncamiento para cada sonda en un conjunto dado. Tienen: por lo menos 80% de los núcleos con 2 señales de PTEN y sondas de flanqueo de retención: sin cambio de copia. 18% -20% de los núcleos con una sola señal PTEN que falta conservando al mismo tiempo las dos sondas de flanqueo: inconclusas. Más del 20% con una sola señal PTEN que falta pero conservando al mismo tiempo las dos sondas de flanqueo: eliminación hemicigota. 20% -100% de núcleos con dos señales de PTEN que falta que puede estar acompañadas por las pérdidas simultáneas de uno, ambas o ninguna sondas de flanqueo: eliminación homocigota.

20 Estos criterios se basan en la exigencia de que, para llamar a una eliminación, la frecuencia aparente debe haber sido mayor que la frecuencia de eliminación de artefactos más tres desviaciones estándar; estos valores son 30% para el ensayo de dos colores y 20% para el ensayo de cuatro colores; véase las siguientes tablas que muestran los resultados de los conjuntos de sonda de dos colores y cuatro colores. Las frecuencias de eliminación de artefactos se miden utilizando muestras de control a partir de muestras de próstata no cancerosas de biopsias y/o prostatectomías radicales realizadas en pacientes con hiperplasia benigna de próstata. El uso de tres desviaciones estándar para establecer un umbral de significación en los ensayos de FISH se discute en Ventura et al., J. Mol. Diagn. 2006; 8: 141-151.

30 Tabla 3. Resultados de control - frecuencia de eliminación de artefactos con conjunto de sonda de 4 colores

Muestras de próstata	2 CEP10/ 2 BMPR1A/ 1 PTEN/ 2 FAS
control 1	12
control 2	5
control 3	4
control 4	10
control 5	12
control 6	8
control 7	2
control 8	8
control 9	4
control 10	13
Promedio	7.8
Desv. Est.	3.9
3 desv. Est.	11.7
Promedio + 3 desv. Est.	19.5

Tabla 4. Resultados de control - frecuencia de eliminación de artefactos con conjunto de e sonda de 2 colores

Muestras de próstata	2 CEP10/ 1 PTEN (Vysis)
control 1	18
control 2	17
control 3	14
control 4	20
control 5	15
control 6	10
control 7	5
control 8	16
control 9	18
control 10	6
Promedio	13.9
Desv. Est.	5.2
3 desv. Est.	15.6
Promedio + 3 desv. Est.	29.5

Tabla 5. Detección de eliminación PTEN utilizando conjuntos de sondas PTEN de dos y cuatro colores

Muestra	Ensayo de dos colores	Ensayo de tres colores con sondas de Ejemplo. 3
Cap-1	Sin cambio de copia	Hemicigoto del
Cap-2	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-3	Sin cambio de copia	Hemicigoto del
Cap-4	Sin cambio de copia	Homocigoto del
Cap-5	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-6	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-7	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-8	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-9	Inconcluso	Hemi y homocigoto del
Cap-10	Inconcluso	Hemicigoto del
Cap-11	Inconcluso	Hemicigoto del
Cap-12	inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-1 3	Inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-14	Inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-1 5	Inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-16	Inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-17	Inconcluso	Sin cambio de copia
Cap-18	Hemicigoto del	Sin cambio de copia
Cap-1 9	Inconcluso	Hemicigoto del
Cap-20	Hemicigoto del	Sin cambio de copia

5

“Hemi y homocigotos del” indica que un número significativo de células están presentes con ambos tipos de eliminación, en consonancia con una eliminación inicial de una copia de PTEN, seguido por la expansión clónica, con un segundo evento de eliminación resulta en una subpoblación eliminada de forma homocigótica.

10

Por lo tanto, el ensayo de cuatro colores es capaz de resolver las muestras 9-17 y 19 que no eran concluyentes de acuerdo con el ensayo de dos colores. Adicionalmente, varias muestras parecen haber dado un resultado falso positivo en el ensayo de dos colores (presumiblemente debido a una serie de efectos de truncamiento por encima del promedio), y las muestras 1, 3 y 4 parecen haber dado un resultado falso negativo. Por último, en la muestra 9, el ensayo de dos colores aparentemente no detecta la población eliminada de forma hemicigota de las células.

15

Se considera que la especificidad mejorada y sensibilidad del ensayo de cuatro sondas resulta de la frecuencia de eliminación de artefactos más baja que resulta de tener las sondas de flaqueo A y B posicionadas más cercanas al objetivo del ensayo (PTEN) pero aún en las ubicaciones donde muchas eliminaciones no deben afectar las señales FISH de las sondas de flaqueo.

20

Ejemplo 5. Identificación de zona límite y preparación de sonda FISH para p16.

25

Los datos CGH que comparan el número promedio de copias genómicas de muestras de células de melanoma para hacer referencia a las células se obtuvieron de [<http://www.broadinstitute.org/tumorscape/pages/porta/Home.jsf>] descrita en [Beroukhim R et al., The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, Nature 2010; 463:899-905]. La zona de transición de número de copias más cercana en el que el número de copias relativo promedio de locus

en la población de 111 muestras de melanoma disminuye en por lo menos 20% durante un intervalo de como máximo 15 Mb se identifica en el lado centromérico del gen p16 (también conocido como CDKN2A) en 9p21.

Se obtienen anotaciones del genoma del Instituto Wellcome Trust Sanger [<http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/>] para la variación de número de copias de locus polimórficos (CNV) [Casci T. Genome evolution: CNV evolution revisited, Nature Reviews Genetics 2008; 9:814-815], y del Departamento de Ciencias del Genoma de la Universidad de Washington [<http://humanparalogy.gs.washington.edu/>] para duplicados de segmentos [Rudd MK et al., Segmental duplications mediate novel, clinically relevant chromosome rearrangements, Hum. Mol. Genet. 2009; 18:2957-62] en el área de la zona de transición de número de copias y la vecindad circundante.

Por lo menos se identifica una CNV en la zona de transición de número de copias o dentro de los 5 Mb centroméricos. Los criterios de valoración anotados de la más cercana de la por lo menos una CNV a p16 se hace referencia a continuación como los criterios de valoración de CNV distales y próximos (con respecto a la proximidad a p16).

Por lo menos un grupo que contiene por lo menos cuatro duplicados de segmentos anotados dentro un rango de 1 Mb de duplicados de segmentos anotados en la zona de transición de número de copias o dentro de los 5 Mb centroméricos que se identifican. Los criterios de valoración de la agrupación duplicados de segmentos más cercanos a p16 se definen ya sea por los criterios de valoración anotados de una región de duplicado de segmentos de alta densidad en la base de datos de duplicado de segmentos (She X et al., Shotgun sequence assembly and recent segmental duplications within the human genome, Nature 2004; 431:927-930, <http://humanparalogy.gs.washington.edu/>) o por la ubicación de los locus de dos duplicados de segmentos dentro del rango 1 Mb más próximo y distal a p16.

La región unida por (1) la más distal de p16 de los criterios de valoración distales de la CNV y la agrupación de duplicados de segmentos y (2) la más próxima de p16 de los criterios de valoración próximos de la CNV y la agrupación de duplicados de segmentos se identifica como una zona límite.

Una sonda centromérica de flanqueo se prepara, que tiene un sitio de hibridación cuyo centro está dentro de los 1 Mb extendidos en la dirección centromérica desde el borde de la zona límite distal a p16.

En el lado telomérico de p16, por lo menos una CNV y/o por lo menos una agrupación de duplicado de segmentos se identifica dentro de 2 Mb del extremo telomérico del locus p16. Una sonda de flanqueo telomérica está preparada, que tiene un sitio de hibridación cuyo centro está dentro de los 1 Mb extendidos en la dirección telomérica desde el extremo telomérico de cualquiera de la CNV o agrupación de duplicados de segmentos

Una sonda objetivo se prepara, que tiene un sitio de hibridación cuyo centro está dentro del locus p16 o dentro de 100 kb de cualquiera de los extremos del locus p16.

Un conjunto de sondas FISH que comprende la sonda de flanqueo centromérica, la sonda de flanqueo telomérica, y la sonda objetivo se puede utilizar para ensayo para eliminaciones de p16 a través de la interfase FISH. Los ensayos tienen alta precisión con muestras embebidas en parafina fijadas con formalina, porque los artefactos de truncamiento que afectan a las señales de FISH de sonda de flanqueo centromérica, sonda de flanqueo telomérica, y sonda de flanqueo objetivo son fácilmente distinguibles de las células afectadas por eliminaciones genéticas que tienen por lo menos un criterio de valoración entre las sondas de flanqueo telomérica y centromérica flanqueando sondas.

Ejemplo 6. Mapeo de Eliminación de región 21q22.13-21q22.3 mediante FISH de interfase cuatro colores.

Se realiza FISH de interfase de Cuatro colores en (FFPE-FNA) muestras de tejido de próstata:

1. Células normales
2. eliminaciones de PTEN hemicigotas y
3. eliminaciones de PTEN homocigotos

utilizando los métodos descritos anteriormente.

La región 21 q22.13-21q22.3 (específicamente, 21 q22.2) comprende varios genes, que incluyen Tmprss2, HMGN1, DSCAM y ERG1. Las sondas que se van a utilizar se derivan de BAC RP11-476.D17 (Sonda A: centromérica a HMGN1); una sonda HMGN1 derivada de BAC RP11-137J13 y RP11-348C15; una sonda DSCAM derivada de BAC RP11-139D12, RP11-907P24, RP11-280.O17, RP11- 183I12, RP11-281F3, RP11-1113M13, y RP11-123A7 y una sonda derivada de RP11-35C4 (sonda B; telomérica a DSCAM). Las sondas se marcan de forma distinguible (por ejemplo con fluoróforos rojo, verde, aguamarina, y dorado) por traducción nick. La información de posición de la BAC se puede obtener de los conjuntos Human (febrero de 2009) del UCSC Genoma Browser. También se puede utilizar una sonda centromérica o pericéntrica del cromosoma 21.

El análisis de las muestras indica que un subconjunto de las células que tienen eliminación de PTEN hemicigota también tienen eliminación de HMGN1 o una eliminación de DSCAM, o ambas, como se muestra por la presencia de señales de hibridación de la sonda A y sonda B pero una o ambas de las sondas HMGN1 y DSCAM. Otro subconjunto

de las células que muestran eliminaciones de PTEN homocigotos muestran eliminaciones adicionales o únicas. Las células normales muestran la presencia de todos los genes.

Reivindicaciones

1. Un método para realizar un ensayo en función de hibridación in situ con fluorescencia para eliminación de un gen supresor de tumor que comprende:

5 (a) realizar hibridación in situ con fluorescencia (FISH) con un conjunto de sondas sobre una muestra celular que comprende una pluralidad de células,

en donde el conjunto de sondas comprende por lo menos una primera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el gen supresor de tumor, por lo menos una segunda sonda de flaqueo que se hibrida en una posición telomérica para el gen supresor de tumor, y por lo menos una sonda objetivo que se hibrida al gen supresor de tumor;

10 (b) enumerar las señales FISH desde por lo menos una primera y por lo menos una segunda sondas de flaqueo y por lo menos una sonda objetivo en la pluralidad de células;

15 (c) proporcionar por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos desde una muestra de control para (1) una eliminación que afecta solo la sonda objetivo, (2) una eliminación que afecta la sonda objetivo y la sonda de flaqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, (3) una eliminación que afecta la sonda objetivo y la sonda de flaqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo, o (4) una eliminación que afecta la sonda objetivo, la sonda de flaqueo centromérica más cercana a la sonda objetivo, y la sonda de flaqueo telomérica más cercana a la sonda objetivo,

la frecuencia de eliminación de artefactos se selecciona de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota de artefactos y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota de artefactos;

20 (d) determinar por lo menos una frecuencia de eliminación aparente a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (b), para el mismo tipo de evento de eliminación que por lo menos una frecuencia de eliminación de artefactos de la etapa (c),

la frecuencia de eliminación aparente se selecciona de (i) una frecuencia de eliminación hemicigota aparente y (ii) una frecuencia de eliminación homocigota aparente,

25 en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación hemicigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación homocigota de artefactos en la etapa (c), y en donde por lo menos una frecuencia de eliminación aparente comprende una frecuencia de eliminación homocigota aparente si no se proporciona una frecuencia de eliminación hemicigota de artefactos en la etapa (c); y

30 (e) determinar si la muestra comprende células con una eliminación hemicigota del gen supresor de tumor en función de si la frecuencia de eliminación hemicigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación hemicigota de artefactos, o determinar si la muestra comprende células con una eliminación homocigota del gen supresor de tumor en función de si la frecuencia de eliminación homocigota aparente es significativamente mayor que la frecuencia de eliminación homocigota de artefactos.

35 2. El método de la reivindicación 1, en donde el conjunto de sondas comprende adicionalmente por lo menos una tercera sonda de flaqueo que se hibrida con una posición centromérica para el sitio de hibridación de la primera sonda de flaqueo y por lo menos una cuarta sonda de flaqueo que se hibrida en una posición telomérica para el sitio de hibridación de la segunda sonda de flaqueo;

y en donde el método adicionalmente comprende:

(i) enumerar las señales FISH desde por lo menos una tercera y por lo menos una cuarta sondas de flaqueo en la pluralidad de células;

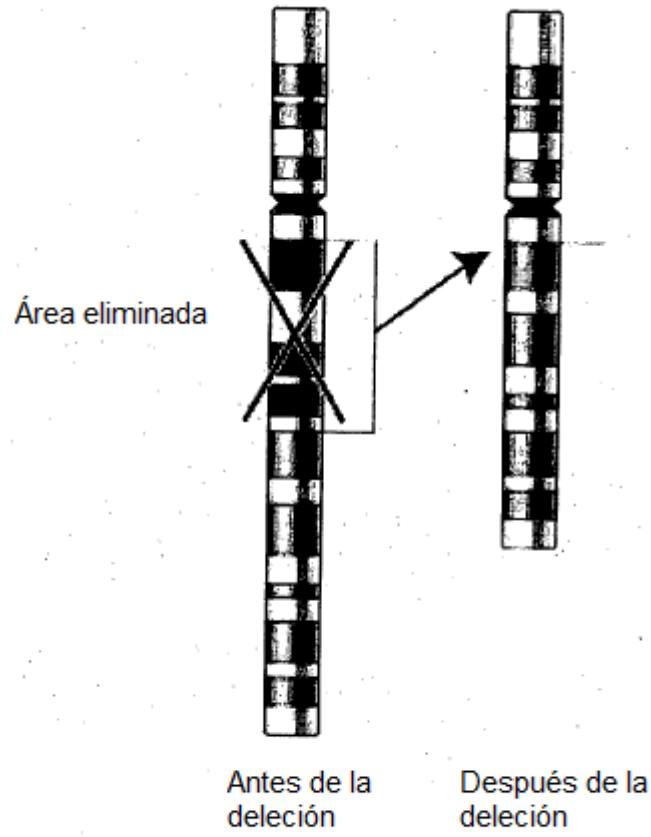
40 (ii) proporcionar por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos una primera y por lo menos una segunda sondas de flaqueo;

(iii) proporcionar por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos para eliminaciones del gen supresor de tumor en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos primera y por lo menos segunda sondas de flaqueo;

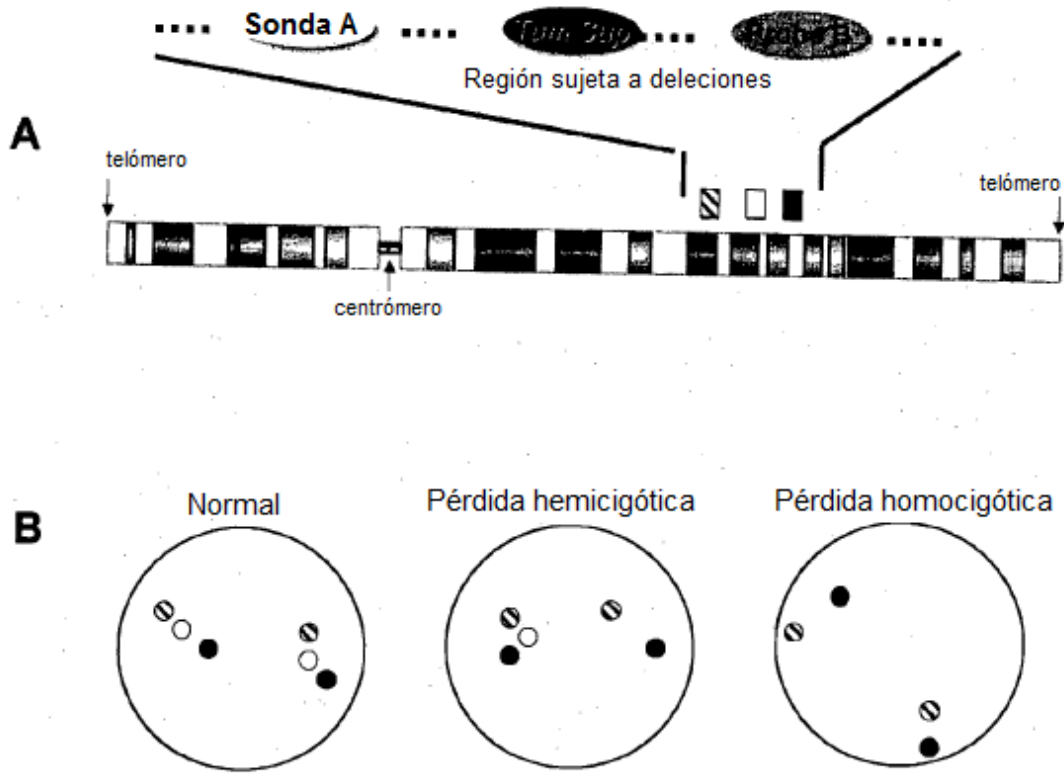
45 (iv) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (i), por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente para eliminaciones del gen supresor de tumor con criterios de valoración entre por lo menos una primera y por lo menos una segunda sondas de flaqueo;



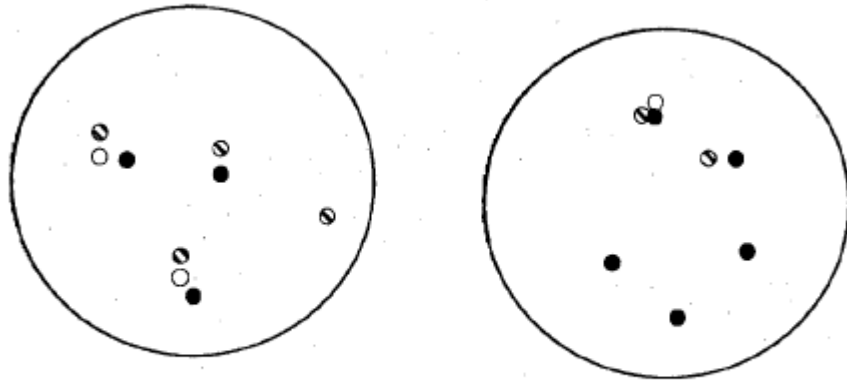
- (v) determinar, a partir de las señales FISH enumeradas de la etapa (i), por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente para eliminaciones del gen supresor de tumor en donde por lo menos uno de los criterios de valoración no está entre por lo menos una primera y por lo menos una segunda sondas de flaqueo; y
- 5 (vi) determinar si la muestra comprende células con una eliminación pequeña del gen supresor de tumor en función de si por lo menos una primera frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una primera frecuencia de eliminación de artefactos, y determinar si la muestra comprende células con una eliminación grande del gen supresor de tumor en función de si por lo menos una segunda frecuencia de eliminación aparente es significativamente mayor que por lo menos una segunda frecuencia de eliminación de artefactos.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde (i) el gen supresor de tumor es PTEN, p16, RB1, p53, un gen supresor de tumor ubicado sobre un cromosoma humano en una banda cromosómica seleccionada de 10q23, 17p13, 13q14, 9q24, y 9p21, o un gen supresor de tumor ubicado sobre un brazo de cromosoma humano seleccionado de 10q, 17p, 13q, 9p, 1p, 5q, 19q, 20q, 8p, 12p, y 16q, o en donde (ii) el gen supresor de tumor es PTEN y por lo menos una primera sonda de flaqueo comprende una sonda que se hibrida con TSPAN15, BMPR1A, o WAPAL y por lo menos una segunda sonda de flaqueo comprende una sonda que se hibrida con FAS.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 3, en donde la frecuencia aparente es significativamente mayor que la frecuencia de artefactos si p es menor que o igual a 0.05 de acuerdo con una prueba t, o la frecuencia aparente es significativamente mayor que la frecuencia de artefactos si la frecuencia aparente excede la frecuencia de artefactos por tres desviaciones estándar.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde por lo menos una primera sonda de flaqueo se hibrida con una posición dentro o centromérica a una zona límite centromérica al gen supresor de tumor, o por lo menos una segunda sonda de flaqueo se hibrida con una posición dentro o telomérica a una zona límite telomérica al gen supresor de tumor.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los sitios de hibridación de por lo menos una sonda objetivo y por lo menos primera y segunda sondas de flaqueo tienen tamaños que varían desde 50 hasta 200 kb, o el sitio de hibridación de por lo menos una sonda objetivo se separa de los sitios de hibridación de por lo menos primera y segunda sondas de flaqueo por una distancia que varía desde 500 kb hasta 20 Mb.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la muestra celular se fija y conserva, o es una muestra fijada en formalina embebida en parafina con un grosor que varía desde 3 hasta 6  $\mu\text{m}$ .
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la muestra celular se prepara mediante fijación con etanol o metanol: ácido acético combinados con citocentrifugación, depósito de capa delgada, un frotis, o pipeteo sobre un portaobjetos de microscopio.
- 35 9. Un conjunto de sondas adecuado para el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende por lo menos una sonda que se hibrida con PTEN, por lo menos una sonda que se hibrida con FAS o SUFU, y por lo menos una sonda que se hibrida con WAPAL, en donde la sonda que se hibrida con WAPAL se deriva de RP11-661D10, en donde cada sonda se etiqueta con un color diferente.
10. Un equipo para detectar una eliminación de un gen supresor de tumor que comprende el conjunto de sondas de la reivindicación 9.
11. El conjunto de sondas de la reivindicación 9 para uso en detectar una eliminación de un gen supresor de tumor en una muestra celular.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**

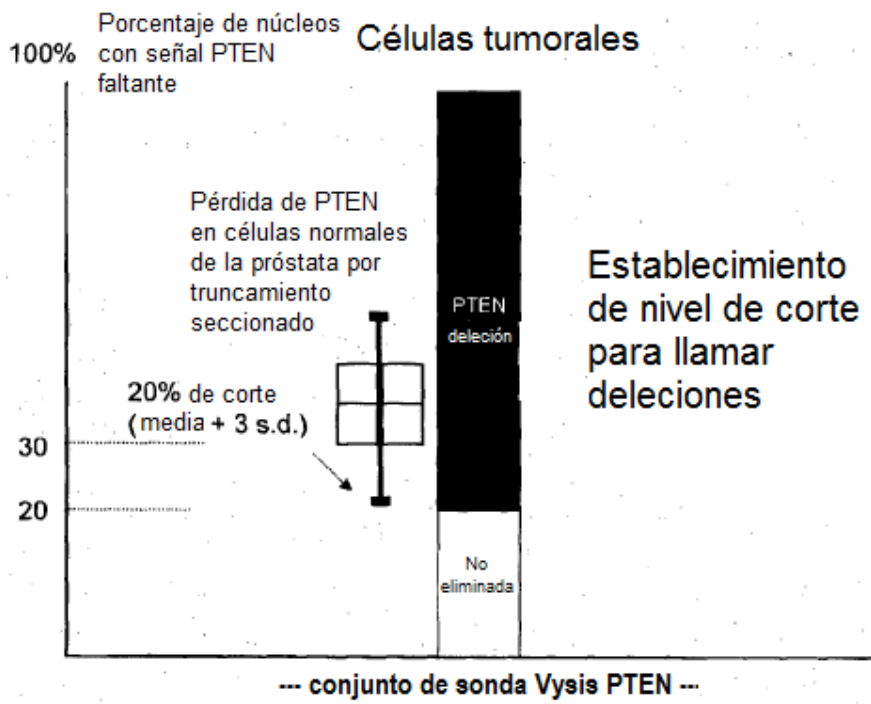
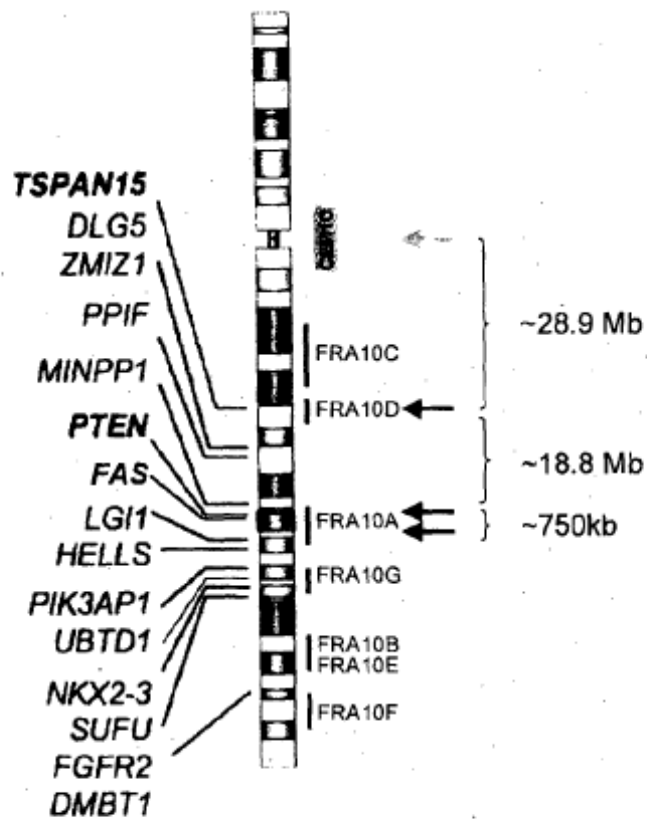
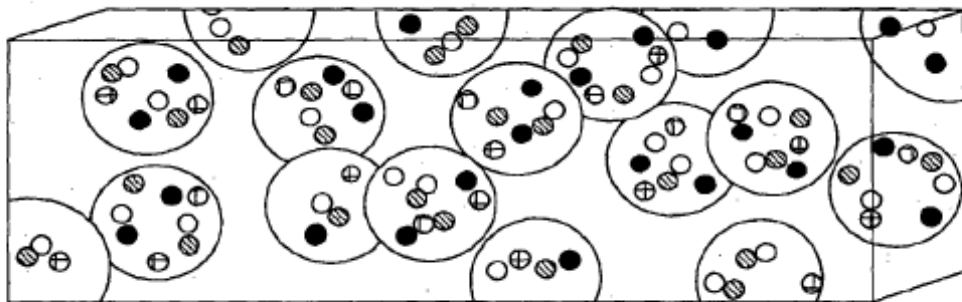


FIGURA 4

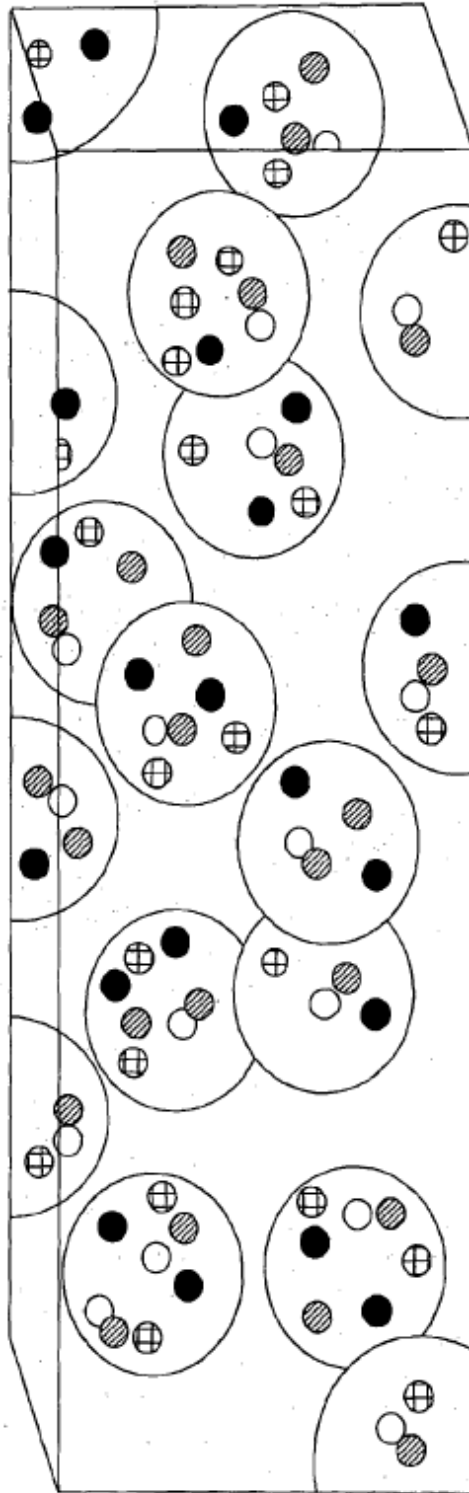


**Figura 5A**



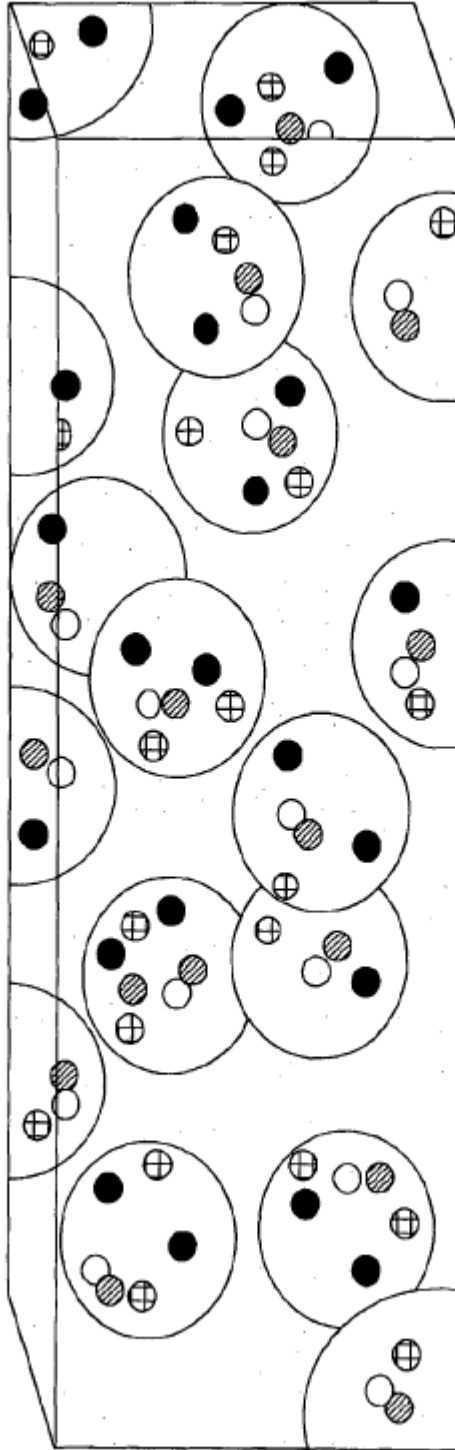
**Figura 5B**

**Delección hemigigótica de PTEN**



**Figura 6**

**Delección hemigigótica de *PTEN-FAS***



**Figura 7**



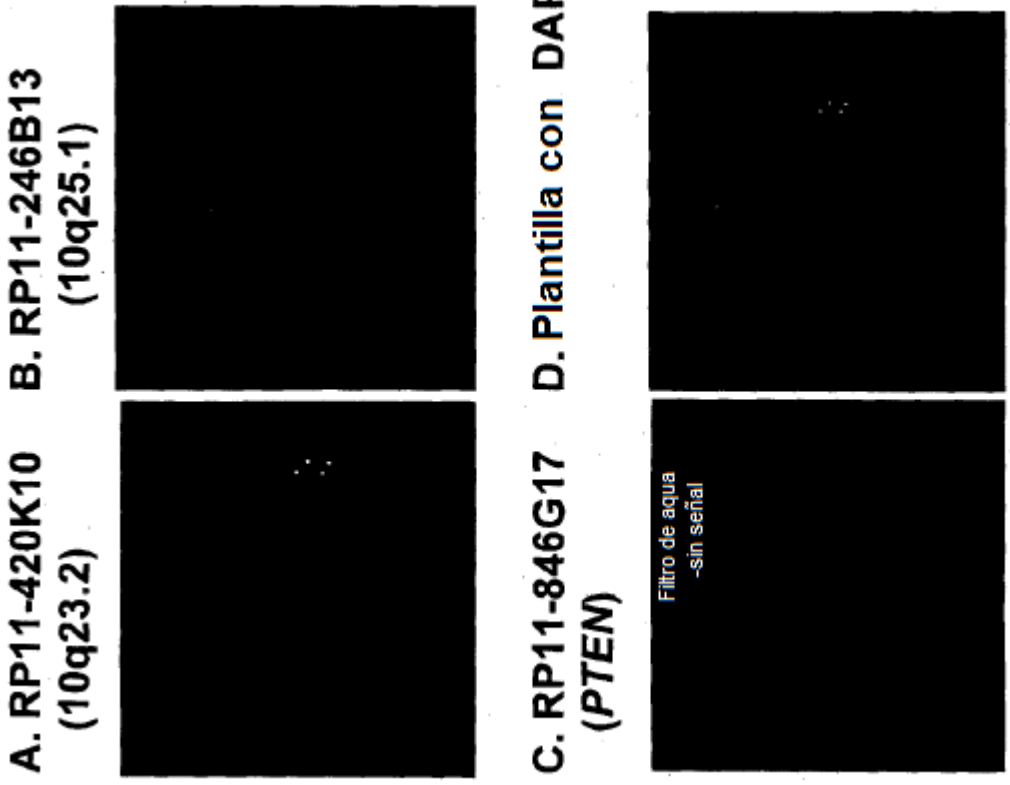


Figura 8

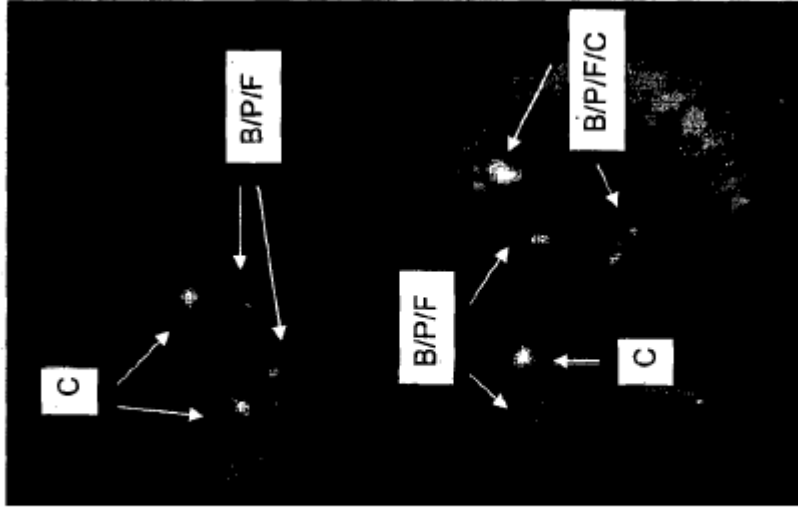


Figura 9

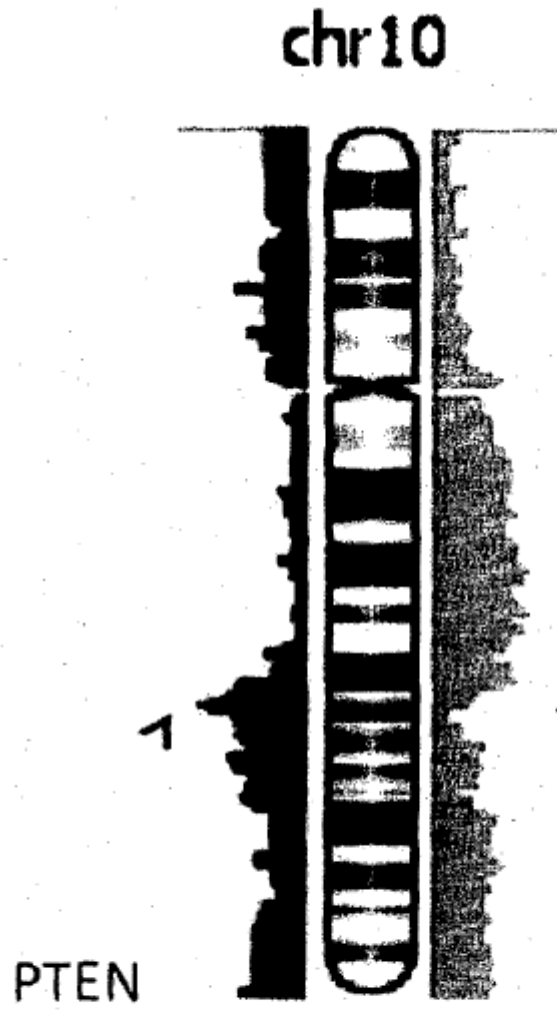


Figura 10

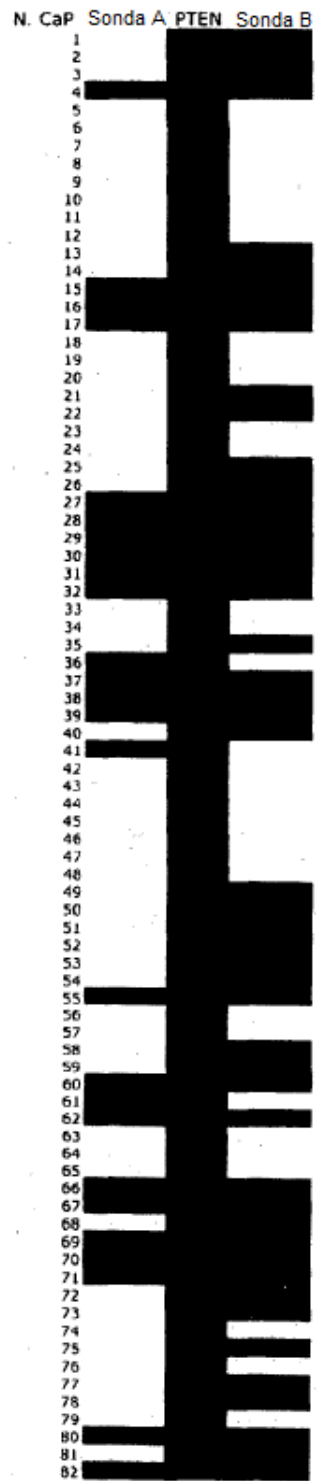


Figura 11

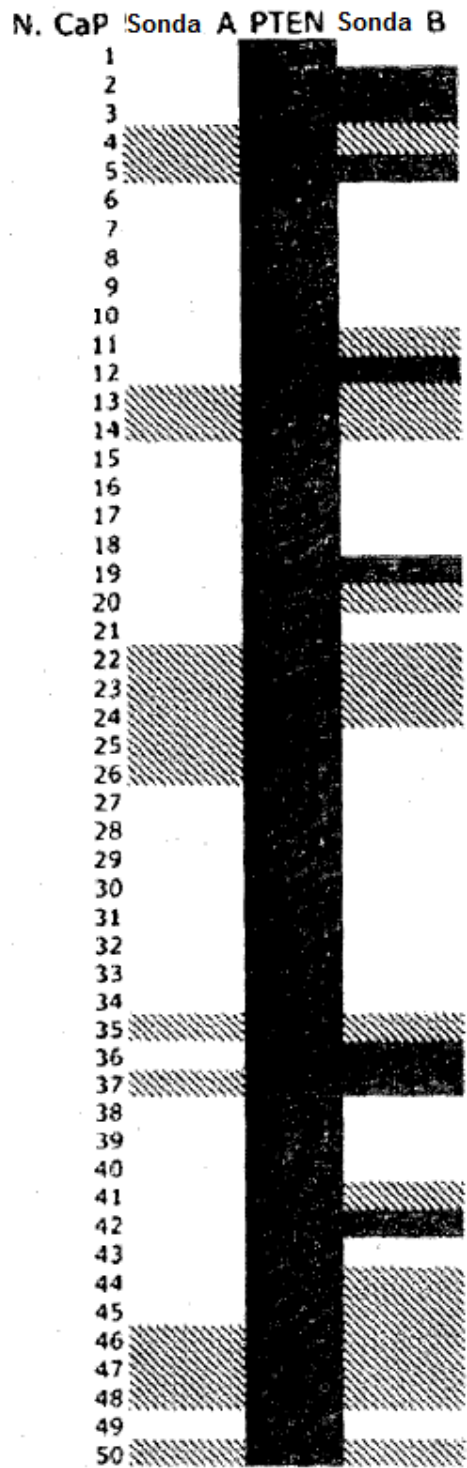


Figura 12

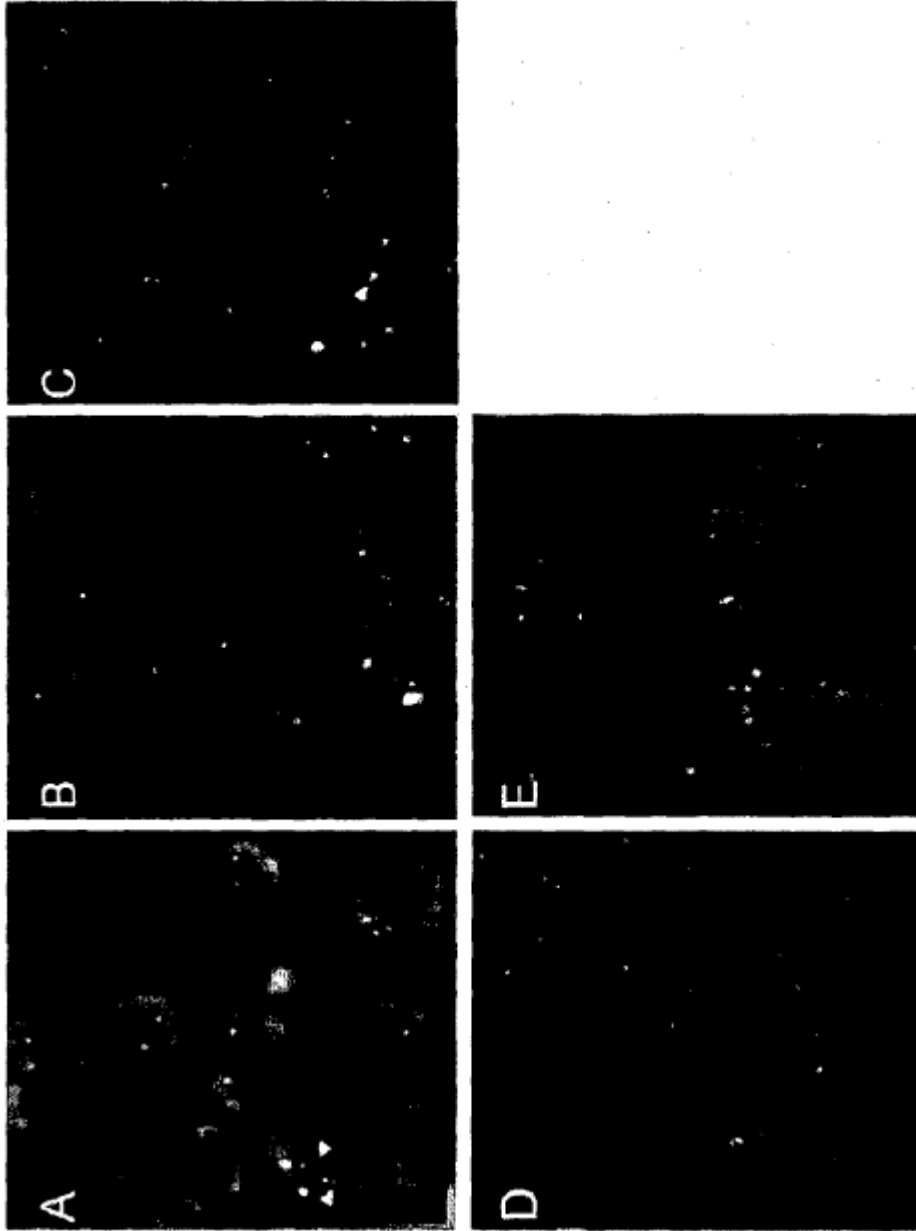
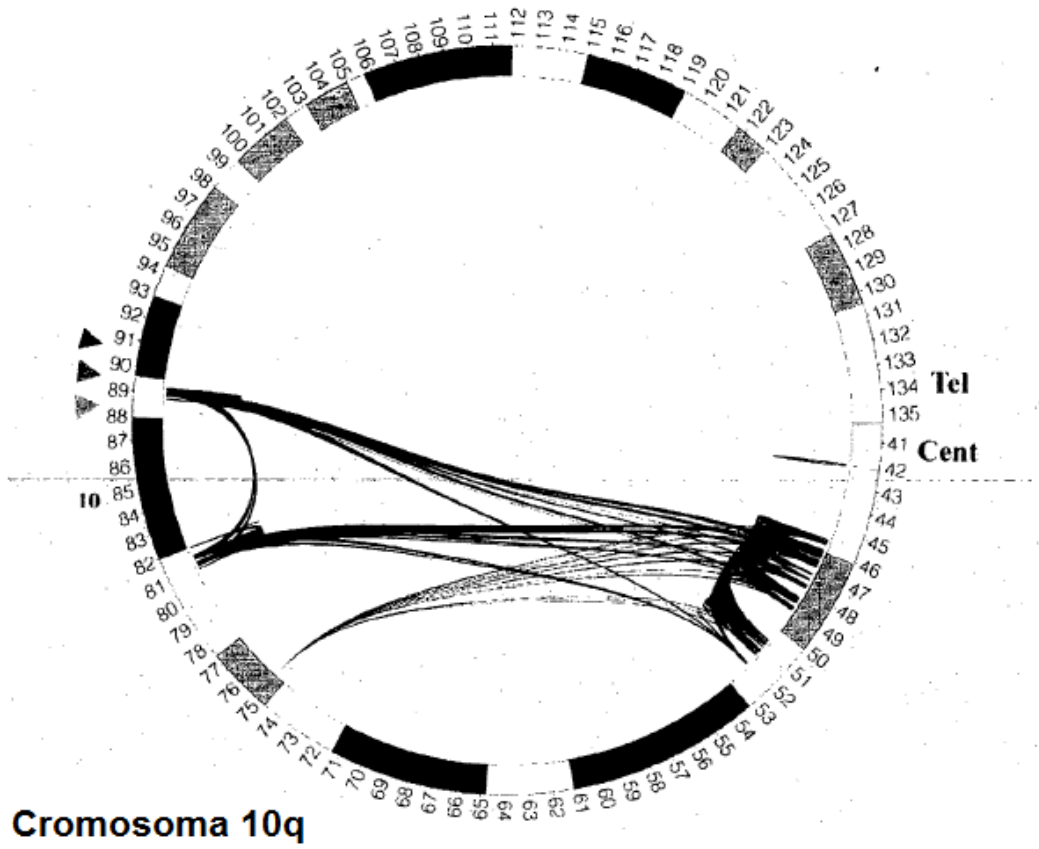


Figura 13



**Cromosoma 10q**

**Figura 14**

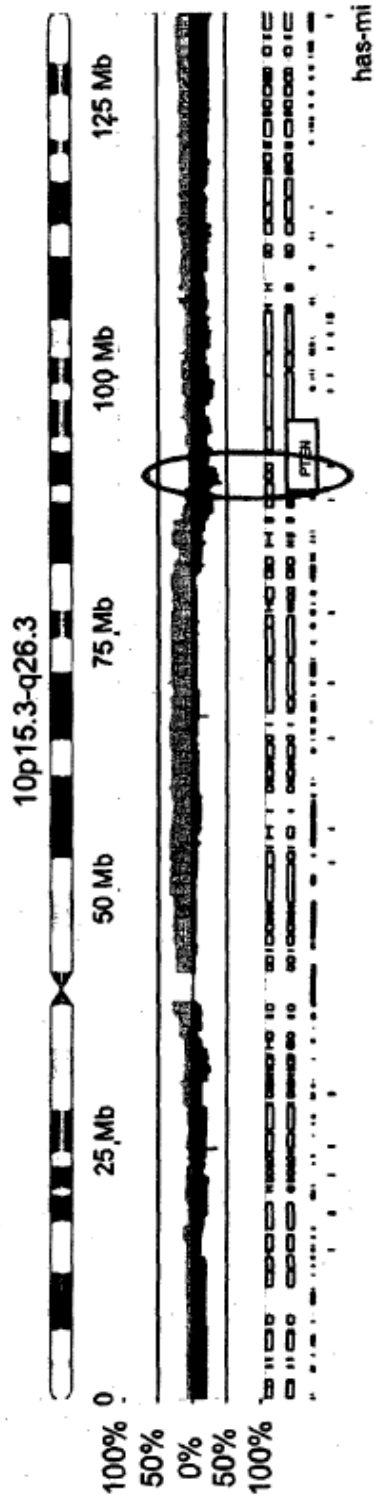


Figura 15



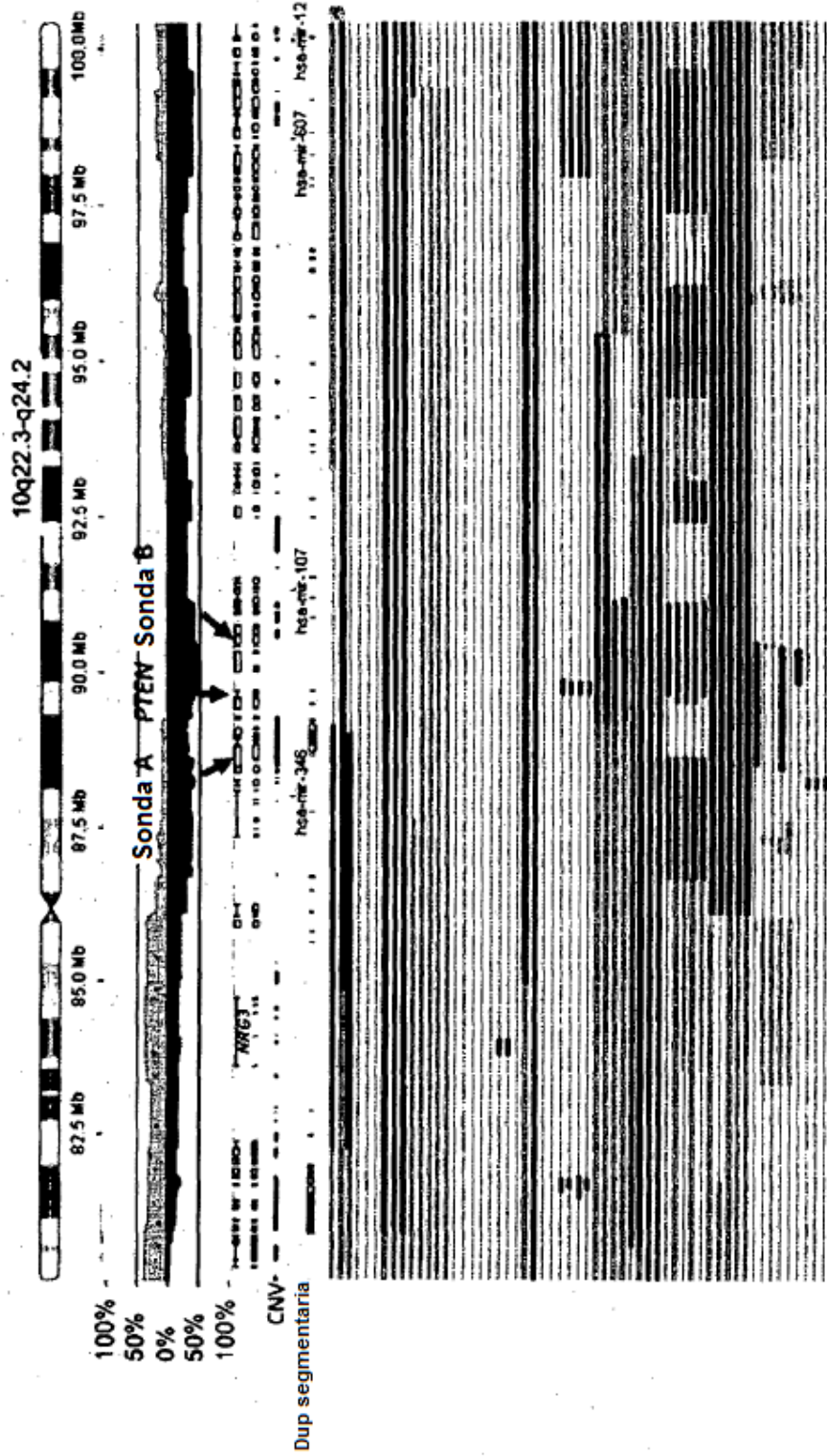


Figura 16

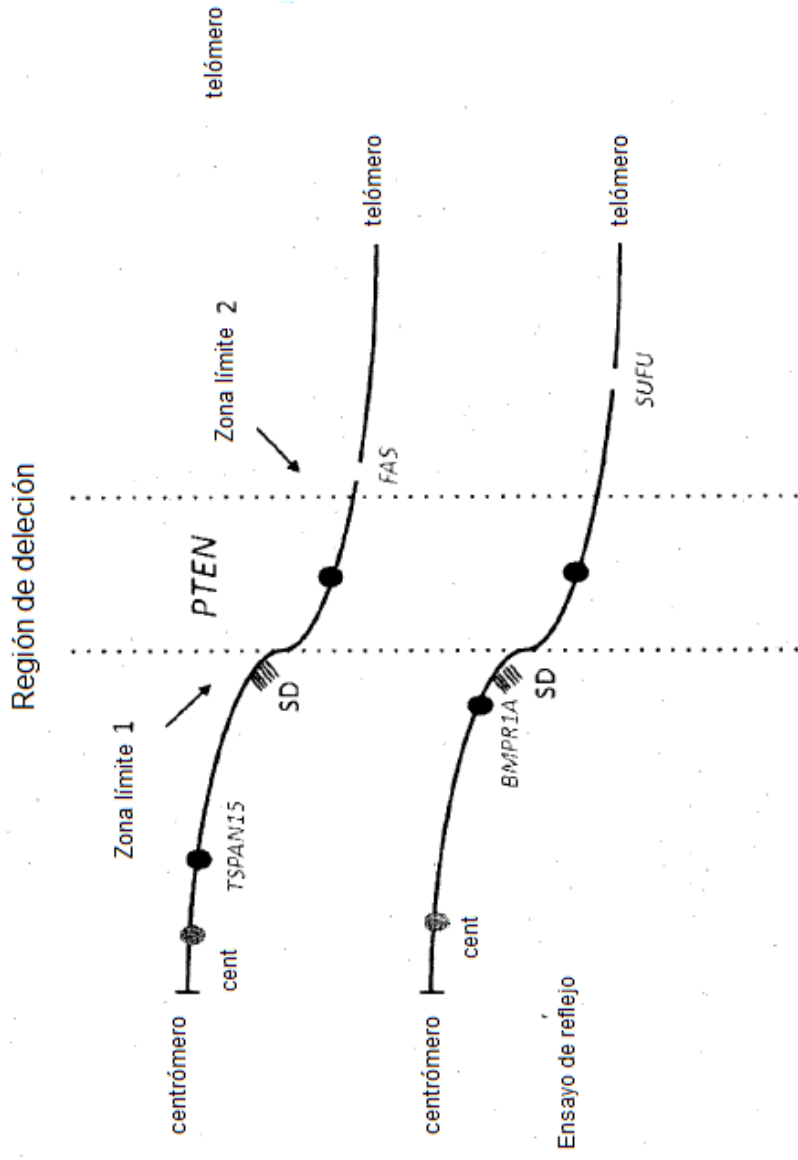


Figura 17

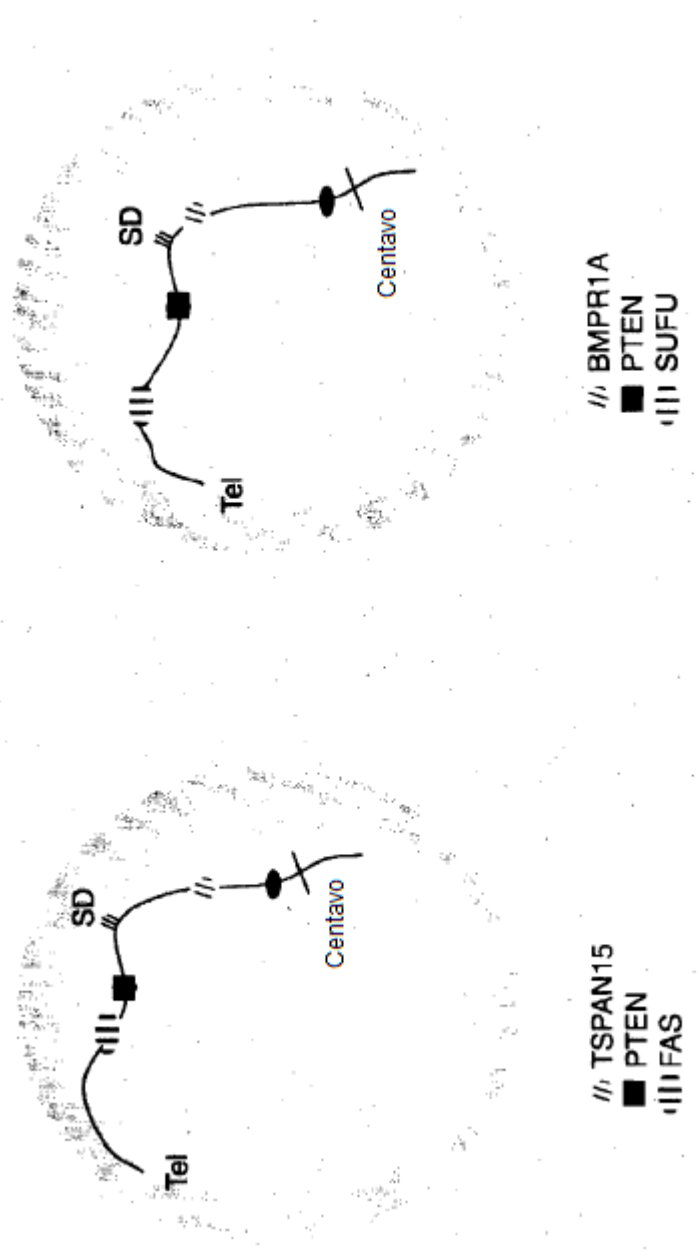


Figura 18

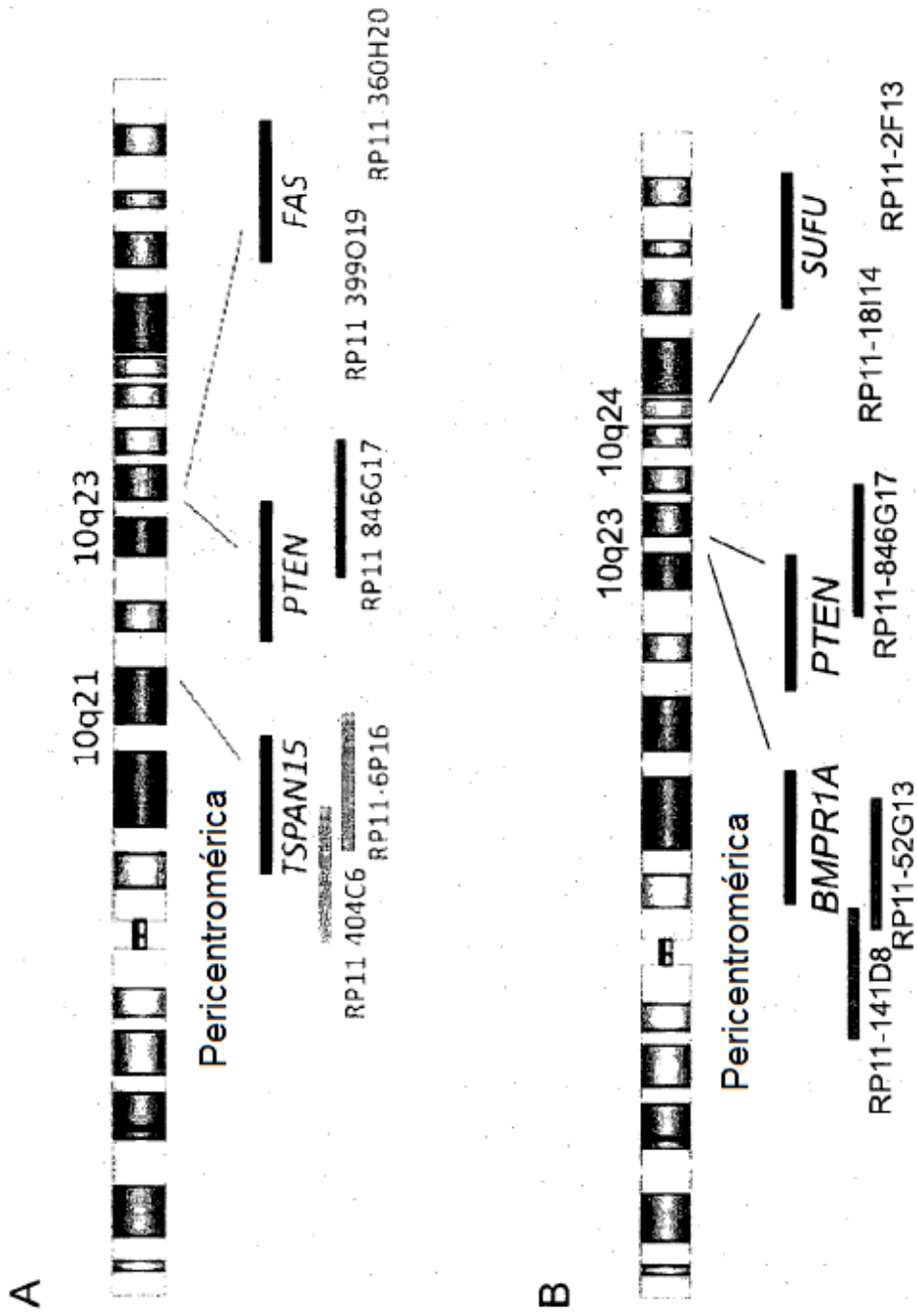
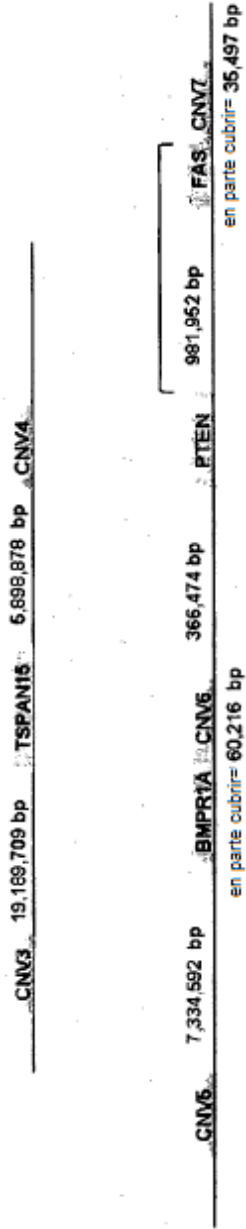


Figura 19

CNV



en parte cubrir= 60,216 bp



SD



Figura 20

```

#! /usr/bin/env python
'''
analiza un archivo de explosión en formato de tabla y extrae éxitos
que son aceptadas de acuerdo con los umbrales , que están codificadas
#qid sid E N Sprime S alignlen nident npos
nmism pident pcpes qgaps qgaplen sgaps sgaplen
qframe qstart qend sframe sstart enviar
'''

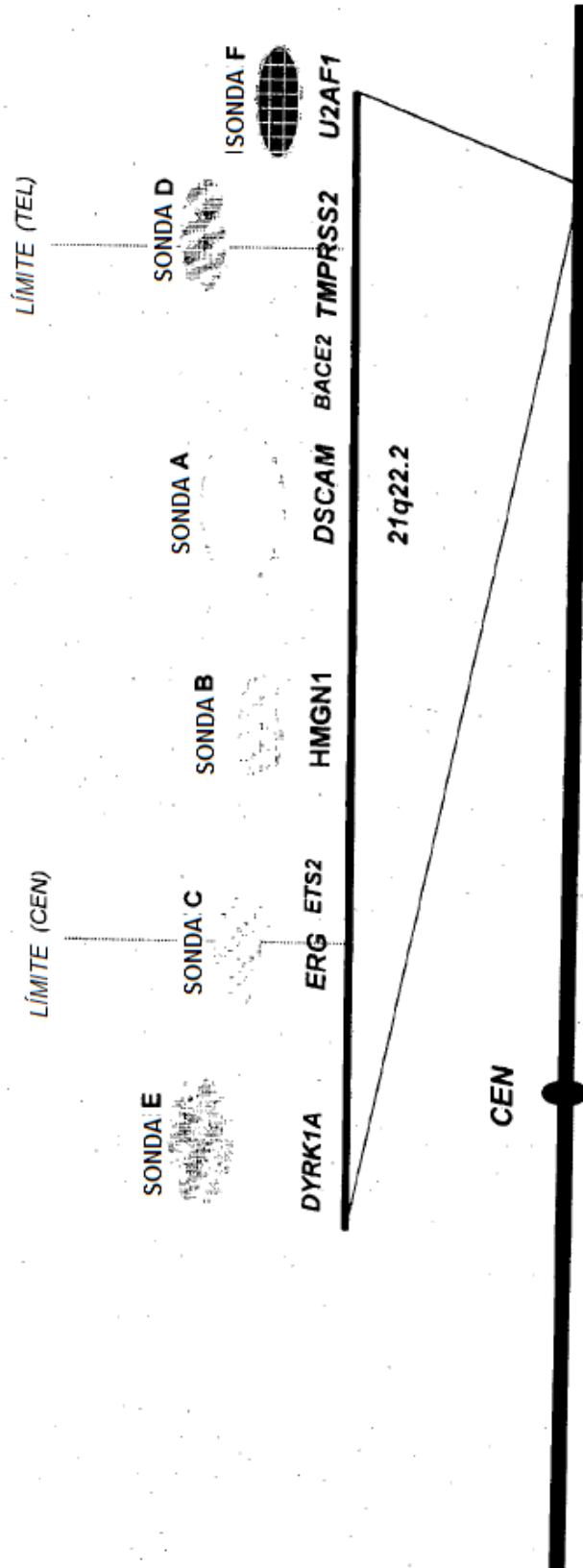
importar sys
importar glob
importar os
importar gzip

#salida de explosión
blast_files = glob.glob(sys.argv[1] + '/*.out.gz')

para res_file en blast_files:
    hits = gzip.open(res_file).readlines()
    print res_file
    para hit in hits:
        temp = hit.split()
        #print temp[2], temp[6], temp[10]
        if float(temp[10]) >= 95.0 and int(temp[6]) >= 10000:
            print hit,

```

Figura 21



Cromosoma 21

Figura 22

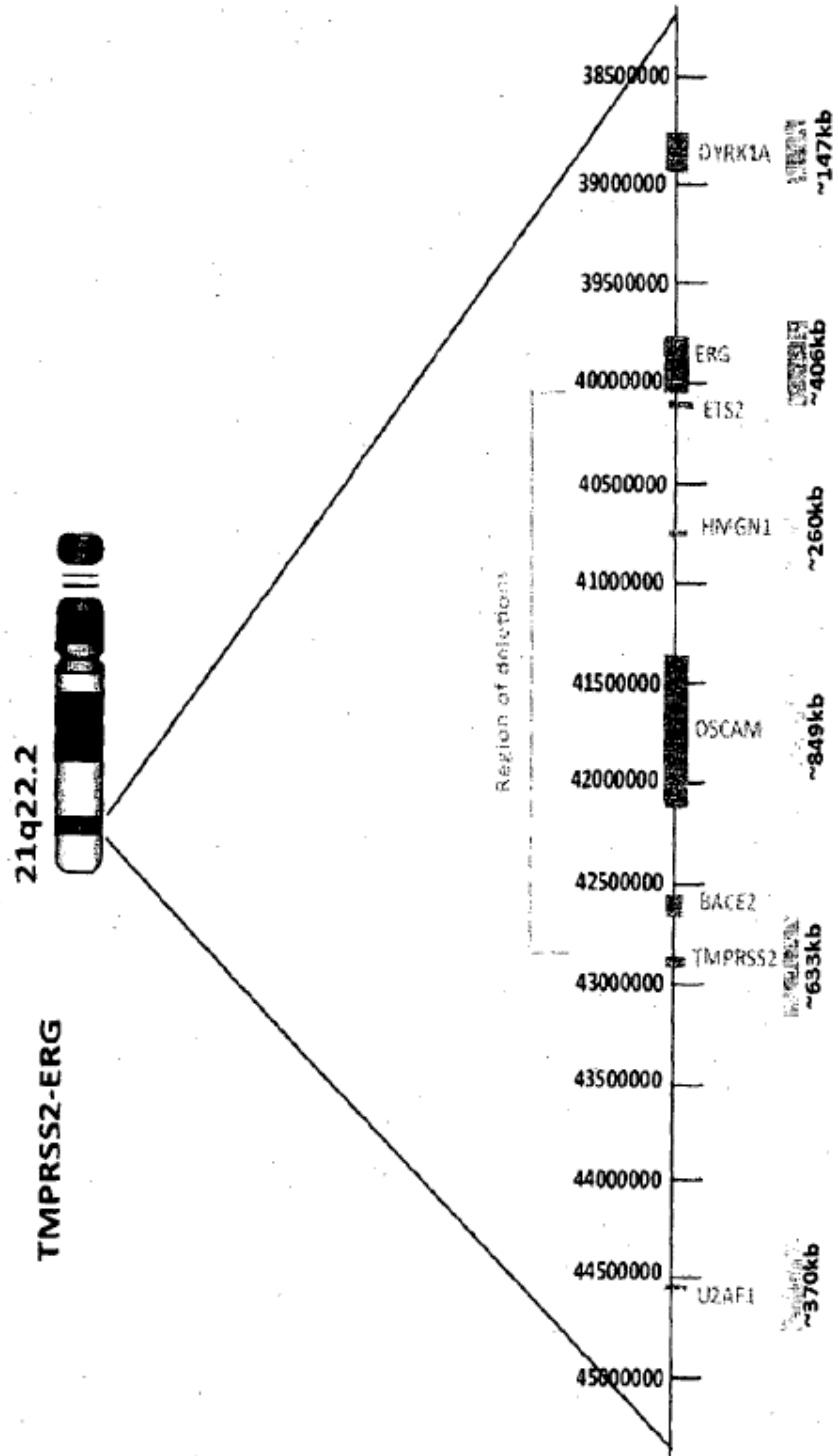


Figura 23