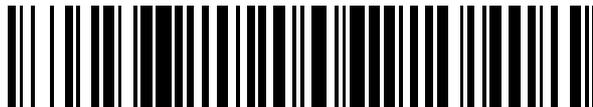


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 858**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 11188387 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2458016**

54 Título: **Métodos y combinaciones de pruebas para detectar melanoma**

30 Prioridad:

02.09.2005 US 713799 P

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US y
ABBOTT LABORATORIES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BASTIAN, BORIS;
MORRISON, LARRY E. y
JEWELL, SUSAN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 618 858 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).

Métodos y combinaciones de pruebas para detectar melanoma

Descripción

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] El melanoma es un problema clínico importante. La incidencia y la mortalidad del melanoma se ha aumentando más rápidamente que cualquier otra malignidad salvo el cáncer de pulmón en mujeres. La patología es el estándar de oro para establecer el diagnóstico de melanoma. Aunque muchos casos pueden clasificarse
10 confiablemente con los criterios patológicos actuales, hay un subconjunto significativo de casos en los que no se puede llegar a un consenso, incluso entre los expertos patólogos. El efecto de la ambigüedad sobre la práctica clínica estándar se ilustra en un estudio reciente de los Países Bajos. Un panel de expertos examinó 1069 lesiones melanocíticas consecutivas que habían sido sometidas a revisión por patólogos clínicos para identificar los problemas diagnósticos más comunes. En el 14% (22/158) de los casos que habían sido inicialmente clasificados
15 como melanoma invasivo, el panel consideró benignas las lesiones y en el 16,6% (85/513) el panel consideró maligno lo que había sido diagnosticado como benigno (Veenhuizen et al., J. Pathol, 182: 266 - 72, 1997).

[0002] La ambigüedad de diagnóstico tiene consecuencias adversas significativas para los pacientes. La clasificación errónea de un melanoma como benigno puede ser fatal y diagnosticar una lesión benigna como maligna puede resultar en una morbilidad significativa. La práctica médica actual con casos equívocos suele considerarse
20 como malignos. Sin embargo, la morbilidad de las opciones terapéuticas - reexcisión amplia, biopsia de ganglio linfático centinela y adyuvante alfa-interferón - junto con la incertidumbre diagnóstica con frecuencia lleva a seguir un régimen de tratamiento menos agresivo. Típicamente, esto incluye una reexcisión limitada y un seguimiento clínico estrecho. Así, los pacientes con lesiones benignas sufren los efectos secundarios de una cirugía todavía significativa y la tensión emocional del diagnóstico, mientras que los pacientes que de hecho tienen un melanoma pueden no recibir el tratamiento óptimo. Actualmente no existe un método para resolver definitivamente estas ambigüedades. Una prueba diagnóstica que podría reducir estas incertidumbres tendría un impacto clínico positivo significativo. Esta invención satisface esta necesidad.

[0003] Estudios anteriores han demostrado que los melanomas difieren de nevos por la presencia de frecuentes ganancias o pérdidas de regiones cromosómicas particulares. La hibridación genómica comparativa (CGH) de
30 melanomas primarios ha identificado pérdidas a 6q, 8p, 9p y 10q y las ganancias en 1q, 6p, cromosoma 7, 8q, 17q y 20q son los cambios más comunes en el número de copias de ADN en melanoma (Bastian Et al., Am J Pathol., 163: 1765 - 70, 2003). Sin embargo, tales estudios no proporcionan información sobre una combinación de sondas que tengan un alto nivel de sensibilidad y especificidad para detectar selectivamente melanoma. La presente invención se basa en una evaluación de la capacidad de las combinaciones de sondas utilizando una prueba de hibridación
35 fluorescente multicolor *in situ* (FISH) para detectar cambios en el número de copias de las regiones cromosómicas encontradas comúnmente para ser aberrante en melanoma.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención se basa en el descubrimiento de combinaciones de sondas que proporcionan una detección altamente sensible y específica de melanoma y por lo tanto se puede distinguir el melanoma maligno de las lesiones melanocíticas benignas. Los métodos para la detección de melanoma comprenden la evaluación de una muestra biológica de una lesión melanocítica, típicamente por *hibridación in situ*, utilizando un conjunto de al menos
40 cuatro sondas. Las sondas útiles para detectar el melanoma descrito en la presente invención pueden seleccionarse de entre las siguientes: una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 7, una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región cromosómica 17q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 9p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 8p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 8q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 1q, una sonda que apunta a la región cromosómica 7q, una sonda que apunta a la región cromosómica 20q y una sonda que se dirige a la región cromosómica 11q. Un grupo de sondas de la presente invención comprende sondas para regiones cromosómicas 6p, 6q, 11q y una sonda enumeradora cromosómica en el cromosoma 6. A menudo, el conjunto útil de la sonda comprende al menos una sonda a una subregión cromosómica, *p.ej.*, 6p25, 6q23, o 11q13.

[0005] En un aspecto, la invención proporciona una combinación de sondas que comprenden al menos cuatro sondas, en la que dicha combinación de sondas comprende una sonda enumeradora de cromosoma 6, sonda que a la región cromosómica 6p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6q y una sonda que se dirige cromosoma región 11q, en donde la combinación de al menos cuatro sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de 0,29 para el melanoma, en el que DFI se calcula como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$. La invención también proporciona un método para detectar la presencia de células de melanoma en una muestra biológica de un paciente, comprendiendo el método:

- a) poner en contacto la muestra con una combinación de al menos cuatro sondas, en la que dicha combinación de sondas comprende una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6p (*p.ej.*, 6p25), una sonda que se dirige a región del cromosoma 6q (*p.ej.*, 6q23), y una sonda que

se dirige a la región del cromosoma 11q (*p.ej.*, 11q13)

b) incubar cada sonda de la combinación con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia polinucleotídica en su cromosoma diana o región cromosómica para formar un complejo de hibridación estable; y

5 c) detectar el patrón de hibridación de la combinación de sondas, en la que un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia o pérdida o desequilibrio en una región cromosómica dirigida por las sondas es indicativa de melanoma. La combinación de sondas tiene una diferencia del valor ideal (DFI) de menos de 0,29.

10 **[0006]** En algunas realizaciones. Los valores de DFI son aproximadamente 0,20 o menos. Las combinaciones de sondas para uso en los métodos de la descripción incluyen combinaciones de 2, 3 y 4 sondas enumeradas en la Tabla 6 que tienen un valor DFI de aproximadamente 0,29 o menos.

15 **[0007]** A menudo, una de las sondas en la combinación de sondas es una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25. En algunas realizaciones, una combinación de sondas comprende una sonda que se dirige a la subregión 6p25 de cromosomas y una segunda sonda seleccionada del grupo que consiste en una sonda que apunta a la subregión 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión 6q23 de cromosomas.

20 **[0008]** Los métodos de la descripción también pueden emplear un conjunto de sonda que tiene tres sondas seleccionadas del grupo que consiste de una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6p (*p.ej.*, 6p25), una sonda que se dirige a región del cromosoma 6q (*p.ej.*, 6q23), una sonda que se dirige a la región del cromosoma 7q (*p.ej.*, 7q34), una sonda que se dirige a la región del cromosoma 11q (*p.ej.*, 11q13), una sonda que se dirige a la región del cromosoma 17q (*p.ej.*, 17q25), una sonda que se dirige a la región del cromosoma 1q (*p.ej.*, 1q31), y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 20q (*p.ej.*, 20q13). En algunas realizaciones de la descripción, una de las tres sondas en la combinación de tres sondas se dirige a la subregión del cromosoma 6p25. De este modo, una combinación de tres sondas para detectar melanoma se selecciona a menudo del grupo de:

25 a) una sonda que se dirige a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda que se dirige a la subregión 6q23 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 6;

30 b) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 1q31 y una sonda que apunta a la subregión cromosómica 17q25;

c) una sonda que se dirige a la subregión 6p25 del cromosoma, una sonda que se dirige a la subregión 11q13 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;

35 d) una sonda que apunta a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que apunta a la subregión 11q13 del cromosoma y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 17q25;

40 e) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 17q25 ya una sonda enumeradora del cromosoma 10;

f) una sonda que se dirige a la subregión 6p25 del cromosoma, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 1q31 y a una sonda enumeradora del cromosoma 10;

45 g) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 11q13;

h) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 1q31, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 17q25;

50 i) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión 7q34 del cromosoma y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 17q25;

j) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 17q25;

55 k) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 11q13;

60 l) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6q23;

m) una sonda que se dirige a la subregión 6p25 del cromosoma, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 11q13 y a una sonda enumeradora del cromosoma 10;

65 n) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión 7q34 del

cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10; y

o) una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13 y a una sonda enumeradora del cromosoma 10.

[0009] En algunas realizaciones de la invención, una combinación de al menos cuatro sondas se pueden utilizar para detectar melanoma, donde las sondas se seleccionan del grupo que consiste de una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6p (e. g, 6p25), una sonda que se dirige a región del cromosoma 6q (p.ej., 6q23) y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 11q (p.ej., 11q13). En algunas realizaciones, una de las cuatro sondas en la combinación se dirige a la subregión de cromosomas 6p25. De este modo, una combinación de cuatro sondas para uso en la detección de melanoma puede comprender una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25; Una sonda a la subregión cromosómica 6q23, una sonda a la subregión cromosómica 11q13 y una sonda enumeradora del cromosoma 6. También se describe aquí una combinación de cuatro sondas para uso en la detección de melanoma seleccionado del siguiente grupo:

- a) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25; una sonda a la subregión cromosómica 6q23, una sonda enumeradora del cromosoma 6 y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- b) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25; una sonda a la subregión cromosómica 1q31, una sonda a la subregión cromosómica 11q13, y una sonda a la subregión cromosómica 17q25;
- c) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25; una sonda de la subregión cromosómica 6q23, una sonda de la subregión cromosómica 11q13 y una sonda enumeradora del cromosoma 10; y
- d) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25; una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma, una sonda a la subregión cromosómica 1q31 y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- e) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 1q31, una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- f) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma, una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 6;
- g) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 6;
- h) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 6;
- i) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión cromosómica 1q31, y una sonda a la subregión cromosómica 17q25;
- j) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión cromosómica 1q31 y una sonda a la subregión cromosómica 17q25;
- k) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma y una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma;
- l) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión cromosómica 6q23, y una sonda a la subregión cromosómica 17q25;
- m) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión 11q13 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- n) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión 11q13 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- o) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma y una sonda a la subregión 11q13 del cromosoma;
- p) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión cromosómica 17q25 y una sonda a la subregión cromosómica 11q13;
- q) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- r) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 20q13, una sonda a la subregión cromosómica 17q25 y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- s) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 7q34 de los cromosomas, una sonda a la subregión cromosómica 20q13 y una sonda a la subregión cromosómica 17q25;
- t) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión 6q23 del cromosoma, una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma y una sonda enumeradora del cromosoma 10;
- u) una sonda a las subregiones cromosómicas 6p25, una sonda a la subregión cromosómica 17q25, una sonda a la subregión cromosómica 11q13 y una sonda enumeradora del cromosoma 10; y
- v) una sonda a la subregión 17q25 del cromosoma, una sonda a la subregión 7q34 del cromosoma, una sonda a la subregión cromosómica 6q23, y una sonda enumeradora del cromosoma 6.

[0010] Combinaciones de sonda no se limitan a las que comprenden sondas que se dirigen a las subregiones a modo de ejemplo, *supra*. Se puede usar cualquier sonda que se dirija a la región cromosómica de interés.

[0011] En formas de realización típicas, los métodos de detección de melanoma de la invención emplean una muestra de piel, tal como una muestra de biopsia de la piel. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede ser una muestra fijada en formalina, embebida en parafina. La muestra biológica se hibrida en condiciones en las

que los miembros del conjunto de sondas se hibridan selectivamente al cromosoma o región o subregión cromosómica diana. Las sondas a menudo se marcan con etiquetas fluorescentes. En algunas realizaciones, la hibridación del conjunto de sonda se lleva a cabo al mismo tiempo, es decir, las sondas se hibridan al mismo tiempo para la misma muestra. El patrón de hibridación del conjunto de sondas se evalúa para determinar si las células de melanoma maligno están presentes en la lesión.

[0012] La invención también proporciona combinaciones de sondas (combinaciones de cuatro sondas) para el diagnóstico de melanoma y kits que contienen tales combinaciones de sondas. Las sondas que son miembros de las combinaciones incluyen una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6p (*p.ej.*, 6p25), una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6q (*p.ej.*, 6q23) y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 11q (*p.ej.*, 11q13). Una combinación de sondas de la invención tiene un valor de DFI inferior a 0,29 para el melanoma.

[0013] A menudo, la combinación de sondas tiene DFI de menos de aproximadamente 0,2. Un conjunto de sondas de la invención es, por lo tanto, cualquiera de las combinaciones de cuatro sondas especificadas específicamente anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

Las Figuras 1A, 1B y 1C muestran el análisis de los datos de melanoma CGH para la sensibilidad de loci individuales para detectar melanoma. Las parcelas muestran todo el genoma desde el brazo p del cromosoma 1 al brazo q del cromosoma 22 almacenado por la posición de la banda cromosómica a lo largo del eje x. El eje muestra la especificidad. La Figura 1A muestra la sensibilidad para las pérdidas de número de copias de ADN. La Figura 1B muestra la sensibilidad para las ganancias de las pérdidas de número de copias de ADN. La Figura 1C muestra la sensibilidad para las amplificaciones del número de copias de ADN. Las figuras 2A, 2B y 2C proporcionan curvas ROC ejemplares para varias combinaciones de sondas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0015] Los términos "melanoma" o "melanoma cutáneo" o "melanoma maligno" se refieren a neoplasias malignas de los melanocitos, que son las células de pigmento presentes normalmente en la epidermis, en las estructuras anexas incluyendo los folículos pilosos, y algunas veces en la dermis, así como sitios extracutáneos tales como la mucosa, meninx, conjuntiva y uvea. Existen al menos cuatro tipos de melanoma cutáneo: melanoma lentigo maligno, melanoma superficial de extensión (SSM), melanoma nodular y melanoma acral lentiginoso (AM). El melanoma cutáneo comienza típicamente como una proliferación de los melanocitos individuales, *p.ej.*, en la unión de la epidermis y la dermis. Las células crecen primero de forma horizontal y establecen un área de la piel que puede variar de unos pocos milímetros a varios centímetros. Como se ha indicado anteriormente, en la mayoría de los casos los melanocitos transformados producen cantidades crecientes de pigmento de manera que el área afectada puede ser fácilmente vista por el clínico.

[0016] El término "lesión de melanocíticos" se refiere a una acumulación de melanocitos que puede someterse a un curso benigno, localmente agresivo, o maligno. La "lesión melanocítica" abarca tanto neoplasias melanocíticas benignas, tales como "nevos" y "lentigos" y "melanocitomas"; neoplasmas melanocíticos malignos, y "melanoma" y "nevo azul maligno".

[0017] Los términos "tumor" o "cáncer" en un animal se refiere a la presencia de células que poseen características tales como el crecimiento o la morfología atípica, incluyendo la proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, rápido crecimiento y velocidad de proliferación, y ciertas características morfológicas características. A menudo, las células cancerosas estarán en la forma de un tumor, pero estas células pueden existir solas dentro de un animal. "Tumor" incluye tanto neoplasmas benignos como malignos. El término "neoplásico" se refiere tanto al crecimiento atípico benigno como maligno.

[0018] Los términos "hibridar específicamente con", "hibridación específica", y "hibridar selectivamente a", como se usa en este documento se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará preferentemente a su subsecuencia diana, y en menor grado a, o no, a otras secuencias. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado rigurosas de hibridación" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (*p.ej.*, como en ensayo, hibridaciones Southern o Northern) son dependientes de secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Una guía extensiva para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en, *p.ej.*, Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I, cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY ("Tijssen"). Generalmente, la hibridación y las condiciones de lavado se seleccionan para ser aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean igual a T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en una matriz o en un filtro en una transferencia Southern o Northern es 42°C usando soluciones

de hibridación estándar (véase, *p.ej.*, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, y discusión detallada, más adelante).

5 [0019] El término "ácido nucleico" tal como se utiliza aquí se refiere a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma mono- o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos, es *decir*, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares o mejoradas, para los propósitos deseados, como el ácido nucleico de referencia. El término también incluye ácidos nucleicos que son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos naturales o a velocidades que se mejoran para los fines deseados. El término abarca también estructuras de ácido nucleico con estructuras sintéticas. Los análogos del esqueleto de ADN proporcionados por la invención incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosfotriéster de alquilo, sulfamato, 3'-tioacetil, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfolino y ácidos nucleicos de péptidos PNAs); Véase *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36: 1923 - 1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los PNAs contienen columnas no iónicas, tales como unidades de glicina N-(2-aminoetilo). Los enlaces de fosforotioato se describen en el documento WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197. Otras cadenas principales sintéticas abarcadas por el término incluyen enlaces metilfosfonato o enlaces alternantes de metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698), y enlaces de bencilfosfonatos (Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 153-156). El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, cebador oligonucleotídico, sonda y producto de amplificación.

10 [0020] El término "muestra biológica" o "muestra" se entiende que significa una muestra obtenida de un paciente sospechoso de tener o que tiene melanoma. Típicamente, la muestra comprende una biopsia de piel embebida en parafina fijada con formalina de una región corporal sospechosa de contener células de melanoma. Además de los pacientes sospechosos de tener melanoma, la muestra biológica puede derivar además de un sujeto que ha sido diagnosticado con melanoma para confirmar el diagnóstico o establecer que todo el tumor se retiró ("margen claro"). Además, la muestra biológica puede derivarse de tejido no cutáneo tal como nódulos linfáticos para establecer si cualquier melanocito presente en este tejido representa melanoma o nevo. La muestra biológica puede derivarse de un sujeto con un diagnóstico ambiguo para aclarar el diagnóstico. La muestra puede derivarse de un "punch", "afeitado", curetaje, aspiración con aguja fina, ganglio linfático centinela o biopsia excisional u otra excisión de la región incluyendo la lesión sospechosa o periférica a la lesión sospechada o conocida para establecer un margen claro.

Introducción

35 [0021] La presente invención se basa, en parte, en la identificación de conjuntos de sonda cromosómica altamente sensibles y específicos que se pueden utilizar para detectar selectivamente el melanoma. Los conjuntos de sondas proporcionan mayor sensibilidad y especificidad que las sondas individuales. La invención proporciona así métodos y composiciones para el uso de tales conjuntos de sondas. Las sondas abarcan sondas específicas de locus así como sondas de enumeración de cromosomas, que típicamente se hibridan a regiones centroméricas.

Sondas cromosómicas

45 [0022] Las sondas para uso en la invención se utilizan para la hibridación a los ácidos nucleicos que están presentes en muestras biológicas de pacientes que tienen un tumor melanocítico para el que existe un cierto grado de sospecha de que podría ser melanoma. La hibridación *in situ* se emplea habitualmente en los métodos de la invención. En realizaciones típicas, las sondas están marcadas con marcadores fluorescentes.

50 [0023] Una "sonda cromosómica" o "composición de la sonda cromosómica" se refiere a uno o más polinucleótidos que específicamente hibridan con una región de un cromosoma. Las secuencias diana a las que puede unirse la sonda varían en longitud, típicamente desde aproximadamente 70.000 nucleótidos hasta aproximadamente 800.000 nucleótidos. Sondeos más pequeños, por ejemplo, que hibridan con una región de menos de 100.000 nucleótidos; o también a una región de menos de 10.000 nucleótidos.

[0024] Una sonda en una región cromosómica particular puede comprender múltiples fragmentos de polinucleótido, *p.ej.*, que van en tamaño desde aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud.

Sonda de enumeración cromosómica

60 [0025] Una sonda de enumeración de cromosoma es cualquier sonda capaz de enumerar el número de cromosomas específicos en una célula. Una sonda de enumeración de cromosomas típicamente reconoce y se une a una región cercana (denominada "peri-centromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitiva. El centrómero de un cromosoma se considera típicamente que representa esa entidad cromosómica ya que el centrómero se requiere para la segregación fiel durante la división celular. La supresión o amplificación de una región cromosómica particular puede diferenciarse de la pérdida o ganancia de todo el cromosoma (aneusomía), dentro de la cual reside normalmente, comparando el número de señales FISH correspondientes al locus particular (número de copias) con el número de señales para el centrómero

correspondiente. Un método para realizar esta comparación consiste en dividir el número de señales que representan el lugar por el número de señales que representan el centrómero. Las proporciones de menos de uno indican pérdida o deleción relativa del locus, y relaciones mayores que una indican ganancia relativa o amplificación del locus. De manera similar, se puede hacer una comparación entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma.

[0026] En lugar de una sonda centromérica de un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que una sonda de brazo cromosómico alternativamente se puede usar para aproximar la pérdida cromosómica total o ganancia. Sin embargo, tales sondas no son tan exactas al enumerar los cromosomas ya que la pérdida de señales para tales sondas puede no siempre indicar una pérdida de los cromosomas enteros. Ejemplos de sondas de enumeración del cromosoma incluyen sondas CEP® (*p.ej.*, CEP® 12 y sondas X/Y) disponibles comercialmente de Abbott Molecular, DesPlaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

[0027] Sondas enumeradoras de cromosoma y sondas específicas de locus que se dirigen a una región del cromosoma o subregión se pueden preparar fácilmente por aquellos en la técnica o se pueden obtener comercialmente, *p.ej.*, de Abbott Molecular, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Tales sondas se preparan utilizando técnicas estándar. Las sondas cromosómicas pueden prepararse, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos proteicos, ADN humano clonado tales como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales P1 (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Una región de interés puede obtenerse mediante amplificación por PCR o clonación. Alternativamente, las sondas cromosómicas pueden prepararse sintéticamente.

Sondas específicas de locus

[0028] Las sondas que se pueden utilizar en la invención incluyen sondas que se hibridan selectivamente a regiones cromosómicas (*p.ej.*, 1q, 6p, 6q, 7Q, 11q, 17q, y 20q) o subregiones de las regiones cromosómicas (*p.ej.*, 1q23, 1q31, 6p25, 6q23, 7q34, 11q13, 17q25 o 20q13). Tales sondas también se denominan sondas específicas de locus. Las dianas de sondas específicas de locus comprenden preferiblemente al menos 100.000 nucleótidos. Una sonda específica de locus se une selectivamente a un locus específico en una región cromosómica que se sabe que experimenta una ganancia o pérdida en el melanoma. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes, o ambas, incluyendo exones, intrones y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.

[0029] Cuando se desea orientarse a un locus genético particular, se prefieren sondas que hibridan a lo largo de toda la longitud del gen diana aunque no es necesario. Para las células de una muestra dada, con respecto a las de un control, los incrementos o disminuciones en el número de señales para una sonda indican una ganancia o pérdida, respectivamente, para la región correspondiente. En algunas realizaciones, se puede diseñar una sonda específica de locus para hibridarse con un gen oncogén o supresor de tumores, cuya aberración genética está correlacionada con melanoma. Las sondas específicas de locus pueden hibridar a loci en regiones cromosómicas incluyendo, por ejemplo, 8q24, 9p21, 17q y 20q13. Ejemplos de sondas específicas de locus que dirigen estas regiones son sondas a C-MYC, P16, HER2 y ZNF217, respectivamente.

[0030] Las sondas para uso en la región diana invención sobre los brazos cromosómicos (también denominado en este documento como una región cromosómica) que se someten a la ganancia o pérdida en el melanoma, *p.ej.*, 17q, 10q, 6p, 6q, 1q, 7q, 11q y 20q. La ganancia o pérdida se puede determinar usando cualquier sonda que se dirige al brazo del cromosoma de interés. A menudo, las sondas que se dirigen a las subregiones, *p.ej.*, 17q25, 10q23, 6p25, 6q23, 1q23, 1q31, 7q34, 11q13 o 20q13, se emplean. En el contexto de esta invención, las sondas a las subregiones cromosómicas aquí indicadas son representativas del brazo cromosómico de interés. Además, las designaciones de la subregión como se usan aquí incluyen la banda designada y típicamente aproximadamente 10 megabases de secuencia genómica a cada lado.

Métodos de selección de sondas

[0031] Conjuntos de sondas pueden seleccionarse por su capacidad de detectar simplemente melanoma, pero se seleccionan típicamente para la capacidad de discriminar entre el melanoma y otras lesiones melanocíticas benignas. Por lo tanto, los análisis de conjuntos de sondas se realizan típicamente para determinar los valores DFI de diferentes conjuntos de sondas para discriminar entre melanoma y nevos benignos.

[0032] Conjuntos de sonda para su uso en los métodos de la presente invención se pueden seleccionar utilizando los principios descritos en los ejemplos. Las combinaciones de sondas cromosómicas dentro de un conjunto de sondas se eligen por sensibilidad y detectabilidad con respecto al melanoma. La sensibilidad se refiere a la capacidad de una prueba (por ejemplo, FISH) para detectar la enfermedad (por ejemplo, melanoma) cuando esté presente. Más precisamente, la sensibilidad se define como Positivos Verdaderos/(Positivos Verdaderos + Negativos Falsos). Una prueba con alta sensibilidad tiene pocos resultados negativos falsos, mientras que una prueba con baja sensibilidad tiene muchos resultados negativos falsos. La especificidad, por otra parte, se refiere a la capacidad de la prueba (por ejemplo, FISH) para dar un resultado negativo cuando la enfermedad no está presente. Más precisamente, la especificidad se define como Negativos Verdaderos/(Negativos Verdaderos + Positivos Falsos). Una prueba con alta especificidad tiene pocos resultados de falsos positivos, mientras que una prueba con una especificidad baja tiene muchos resultados positivos falsos.

[0033] En general, la sonda cromosómica establece con la más alta sensibilidad y especificidad combinada para la detección de melanoma han de elegirse. La sensibilidad y especificidad combinada de un conjunto de sonda pueden representarse por la distancia de parámetro del ideal (DFI), definida como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$. Valores DFI van de 0 a 1.414, donde 0 representa un conjunto de sondas que tienen una sensibilidad del 100% y el 100% de especificidad y 1.414 lo que representa un conjunto de sonda con la sensibilidad 0% y la especificidad 0%. En esta invención, conjuntos de sonda elegidos para la identificación de melanoma tendrán valores DFI que son menos de 0,29. Conjuntos de sondas que tienen valores DFI de menos de 0,2 por lo general proporcionan mejores resultados.

[0034] No hay límite en el número de sondas que se pueden emplear en un conjunto, sin embargo, en algunas realizaciones, el número de sondas en un conjunto que ha de verse por un observador humano (y no con las técnicas de imagen asistida por ordenador) puede limitarse por motivos prácticos, *p.ej.* por el número de fluoróforos únicos que proporcionan señales distinguibles visualmente tras la hibridación. Por ejemplo, típicamente cuatro o cinco fluoróforos únicos (*p.ej.* que aparecen como señales de oro rojo, verde, aqua, y el ojo humano) se pueden emplear convenientemente en un único conjunto de sonda. En general, la sensibilidad de un ensayo aumenta a medida que el número de sondas en un conjunto aumenta. Sin embargo, los incrementos en la sensibilidad se hacen más pequeños y más pequeños con la adición de más sondas y en algún momento la inclusión de sondas adicionales a un conjunto de sondas no se asocia con un aumento significativo en la sensibilidad del ensayo ("rendimientos decrecientes"). El aumento del número de sondas en un conjunto de sonda puede disminuir la especificidad del ensayo. De acuerdo con ello, un conjunto de sonda de la presente invención comprende típicamente cuatro sondas cromosómicas, como sea necesario para proporcionar un equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad.

[0035] Sondas individuales se eligen para su inclusión en un conjunto de sondas de la presente invención en base a su capacidad para complementar otras sondas dentro del conjunto. En concreto, se orientan a los cromosomas o subregiones cromosómicas que no se alteran con frecuencia simultáneamente dentro de un melanoma dado. Por lo tanto, cada sonda en un conjunto de sondas complementa a la otra, es decir, identifica melanoma donde las otras sondas en el conjunto en algún momento no logran identificarse. Un método para determinar qué sondas se complementan entre sí consiste en identificar sondas individuales con los valores más bajos DFI para un grupo de muestras de tumor. Entonces sondas adicionales pueden probarse en las muestras tumorales que la sonda inicial no logró identificar, y se añade la sonda con el valor DFI más bajo medido en combinación con la sonda inicial para el conjunto. Esto se puede repetir hasta que se logre un conjunto completo de sondas cromosómicas con el valor DFI deseado.

[0036] El análisis de discriminación es un método que se puede utilizar para determinar qué sondas son más capaces de detectar melanoma. Este método evalúa si las sondas individuales son capaces de detectar un porcentaje estadísticamente diferente de células anormales en muestras de ensayo (por ejemplo, melanoma) en comparación con los especímenes normales. La detección de células con ganancias cromosómicas (o locus) o pérdidas cromosómicas (o locus) pueden usarse para identificar células neoplásicas en pacientes con melanoma con lesiones melanocíticas. Sin embargo, las pérdidas cromosómicas a veces se producen como un artefacto en las células normales, debido a la superposición de la señal aleatoria y/o pobre hibridación. En secciones de material incluido en parafina y fijado en formalina, comúnmente utilizada para evaluar las biopsias de piel, el truncamiento de los núcleos en el proceso de seccionamiento también puede producir la pérdida de artefactos de material cromosómico. En consecuencia, las ganancias cromosómicas son a menudo un indicador más fiable de la presencia de células neoplásicas.

[0037] Los valores de corte para las ganancias y pérdidas cromosómicas individuales deben determinarse a la hora de elegir un conjunto de sonda. El término "valor de corte" se entiende que significa el valor de un parámetro asociado con la aberración cromosómica que divide una población de muestras en dos grupos -aquellas muestras por encima del valor de corte y las muestras por debajo del valor de corte. Por ejemplo, el parámetro puede ser el número absoluto o porcentaje de células en una población que tiene aberraciones genéticas (*p.ej.*, las pérdidas o ganancias de las regiones de destino). Si el número o porcentaje de células en la muestra que alberga las pérdidas o ganancias para una sonda particular es mayor que el valor de corte, la muestra se determina que es positiva para melanoma.

[0038] Un conjunto de sonda útil a menudo comprende una sonda en una región cromosómica seleccionada del grupo que consiste en 1q23, 1q31, 6p25, 6q23, 7q34, 11q13, 17q25 y 20q13, y/o sondas de cromosoma de enumeración para los cromosomas 6 y 10, *por ejemplo*, CEP® 6, y CEP® 10, disponible de Abbott Molecular Inc. Tales conjuntos de sonda detectan la presencia de melanoma y pueden discriminar melanoma a partir de muestras benignas.

[0039] Un conjunto de sondas capaces de detectar melanoma y/o discriminar melanoma a partir de muestras benignas puede comprender dos o más sondas seleccionadas del grupo de sondas dirigidas a 1q23, 1q31, 6p25, 6q23, 7q34, 11q13, 17q25, 20q13, o una sonda enumeradora de cromosoma, *por ejemplo*, a las regiones pericentroméricas de los cromosomas 6 o 10. En algunas realizaciones, el conjunto de sonda comprende sondas para: a) 6p25 y un enumerador de cromosoma 10, b) 6p25 y 11q13, c) 6p25 y 6q23, d) 6p25 y 20q13, e) un enumerador de cromosoma 10 y 1q31, f) 6p25 y 1q31, g) 6q23 y 1q31, h) 7q34 y 6p25, i) 6q23 y 1q23, j) 6q23, 6p25 y un enumerador de cromosoma 6, k) 6p25, 1q31 y 17q25, l) 11q13, 6p25 y un enumerador de cromosoma 10, m) 6p25, 11q13, 17q25 y, n) 6p25, 1q31, y un enumerador de cromosoma 10, o) 6p25, 1q31, 11q13 y, p) 1q31, 11q13 y 17q25, q) 6q23, 6p25 y 11q13, R) 20q13, 7q34 y 6p25 s) 6p25, 6q23, un enumerador de cromosoma 6, y un enumerador de cromosoma 10, u) 6p25, 1q31, 11q13, y 17q25, v) 6p25, 1q31, un enumerador de cromosoma 10, y

17q25, w) 11q13, un enumerador de cromosoma 10, 6q23 y 6p25, x) 6q23, 6p25, 1q31, y un enumerador de cromosoma 10, o Y) 6q23, un enumerador de cromosoma 6, 6p25 y 11q13.

Hibridación de sonda

5 **[0040]** Condiciones para hibridar específicamente las sondas a sus dianas de ácido nucleico generalmente incluyen las combinaciones de condiciones que son empleables en un procedimiento de hibridación dado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones fácilmente pueden ser determinadas por un experto en la técnica. Tales condiciones suelen incluir temperatura controlada, fase líquida, y el contacto entre una sonda cromosómica y un objetivo. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores, incluyendo la concentración de sonda, longitud de objetivo, objetivo y contenido de sonda GC, composición del disolvente, la temperatura y duración de la incubación. Al menos un paso de desnaturalización debe preceder contacto de las sondas con los objetivos. Alternativamente, tanto la sonda y diana de ácido nucleico pueden someterse a condiciones de desnaturalización juntas mientras están en contacto unos con otros, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. 10 La hibridación puede conseguirse con incubación subsiguiente de la sonda/muestra en, por ejemplo, una fase líquida de aproximadamente una mezcla con una relación 50:50 de volumen de 2-4 X SSC y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55°C durante un tiempo que es ilustrativamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 40°C durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, el uso de un agente de bloqueo tal como el ácido nucleico de bloqueo no marcado como se describe en la patente de los Estados Unidos. Nº 5.756.696, se puede utilizar en conjunción con los métodos de la presente invención. Otras condiciones se pueden emplear fácilmente para hibridar específicamente las sondas a sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como sería fácilmente evidente para un experto en la técnica.

15 **[0041]** Al término de un período de incubación adecuado, la unión no específica de sondas cromosómicas de la muestra de ADN se puede eliminar mediante una serie de lavados. Temperatura y concentraciones de sal se eligen convenientemente para una rigurosidad deseada. El nivel de rigor requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y puede determinarse mediante la hibridación sistemática de sondas a las muestras de la composición genética conocida. En general, los lavados de alta rigurosidad pueden llevarse a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 0,2 X a aproximadamente 2 X SSC y aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados más bajos de rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura inferior con un aumento de la concentración de sal. 20 25 30 35

Detección de los patrones de hibridación de la sonda

[0042] Las sondas de hibridación se pueden detectar usando cualquier medio conocido en la técnica. Restos que contienen la etiqueta pueden asociarse directa o indirectamente con sondas cromosómicas. El término "etiqueta de resto que contiene" o "resto de detección" se refiere generalmente a un grupo o grupos moleculares asociados con una sonda cromosómica, ya sea directa o indirectamente, que permite la detección de la sonda en la hibridación con su diana. La etiqueta diferente que contiene restos se selecciona para cada sonda individual dentro de un conjunto particular de modo que cada sonda hibridada es visualmente distinta de los demás tras la detección. Preferiblemente, hibridación in situ fluorescente (FISH) se emplea y las sondas cromosómicas están etiquetadas con restos que contienen etiquetas fluorescentes distintas. Los fluoróforos, moléculas orgánicas que emiten fluorescencia tras la irradiación a una longitud de onda particular, están típicamente unidos directamente a las sondas cromosómicas. Un gran número de fluoróforos están disponibles comercialmente en formas reactivas adecuadas para el ADN. 40 45

[0043] La unión de fluoróforos a sondas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y puede llevarse a cabo por cualquier medio disponible. Los fluoróforos pueden estar unidos covalentemente a un nucleótido en particular, por ejemplo, y el nucleótido marcado incorporado en la sonda utilizando técnicas estándar tales como la traducción nick, cebado aleatorio, etiquetado PCR, y similares. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente a través de un enlazador a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los métodos para marcar sondas se describen en la patente de los Estados Unidos. Nº 5.491.224 y Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (2002), Y.-S. Fan, Ed., capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," L. Morrison et al., p. 21-40, Humana Press. 50 55

[0044] Los fluoróforos ejemplares que pueden utilizarse para marcar sondas incluyen TEXAS RED (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), CASCADE azul acetilazida (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), SpectrumOrange™ (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) y SpectrumGold™ (Abbott Molecular). 60

[0045] Un experto en la técnica reconocerá que otros agentes o colorantes se pueden utilizar en lugar de fluoróforos como restos que contienen etiquetas. Agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, restos que contienen etiqueta luminiscentes radio, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Alternativamente, restos de detección que se visualizan por medios indirectos pueden ser utilizados. Por ejemplo, las sondas pueden marcarse con biotina o digoxigenina usando métodos de rutina conocidos en la técnica, y procesarse adicionalmente para la detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr a través de la posterior unión de avidina conjugada 65

con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso visualización y discriminación de sondas puede lograrse como se describe anteriormente para FISH.

[0046] Las sondas cromosómicas hibridadas para apuntar regiones pueden, alternativamente, visualizarse por reacciones enzimáticas de restos de etiquetas con sustratos adecuados para la producción de productos de color insolubles. Cada sonda puede ser discriminada de otras sondas dentro del conjunto de elección de un resto de etiqueta distinta. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar a través de la posterior incubación con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitro azul tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que diaminobencidina sirve como un sustrato para HRP.

[0047] En realizaciones en las que se utilizan sondas marcadas con fluoróforo o composiciones de la sonda, el método de detección puede implicar la microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Cualquier método de imagen microscópica adecuado puede utilizarse en conjunción con los métodos de la presente invención para la observación de múltiples fluoróforos. En el caso en que se emplea la microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas pueden ser vistas bajo luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiados. Sistemas de imágenes digitales automatizados, como los MetaSystems, bioView o sistemas aplicados por imágenes se pueden utilizar alternativamente.

20 Detección y diagnóstico de los pacientes de melanoma

[0048] Los métodos de detección de la invención comprenden obtener una muestra biológica de un sujeto que tiene melanoma o se sospecha que tiene melanoma. La muestra biológica es típicamente una muestra de tejido que comprende la lesión melanocítica. A menudo, la muestra biológica es fijada con formalina y embebida en parafina. La muestra se pone en contacto con sondas cromosómicas para detectar selectivamente melanoma en la muestra, si hubiera, en las condiciones para la hibridación específica de las sondas a sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra. Las sondas de la serie pueden hibridarse simultáneamente o secuencialmente con los resultados de cada hibridación fotografiada digitalmente, la sonda o sondas despojadas, y la muestra a partir de entonces se hibridaron con la sonda o sondas restantes. Múltiples conjuntos de sonda también pueden hibridar la muestra de esta manera.

[0049] La muestra biológica puede ser de un paciente sospechoso de tener melanoma o de un paciente con diagnóstico de melanoma, *por ejemplo*, para la confirmación del diagnóstico o el establecimiento de un margen claro, o para la detección de células de melanoma en otros tejidos tales como ganglios linfáticos. La muestra biológica puede también ser de un sujeto con un diagnóstico ambiguo con el fin de aclarar el diagnóstico. La muestra biológica puede también ser de un sujeto con una lesión histopatológicamente benigna para confirmar el diagnóstico. Las muestras biológicas pueden obtenerse utilizando cualquiera de una serie de métodos en la técnica. Los ejemplos de muestras biológicas que comprenden lesiones melanocíticas potenciales incluyen los obtenidos a partir de biopsias de piel extirpada, tales como biopsias por punción, biopsias de afeitado, aspirados con aguja fina, o extirpaciones quirúrgicas; o biopsia de tejidos no tejidos cutáneos, tales como los ganglios linfáticos, mucosa, meninge, conjuntiva, o úvea. En otras realizaciones, la muestra biológica puede ser obtenida por el afeitado, depilación con cera, o el pelado de la región de interés en la piel.

[0050] Como se ha indicado, una muestra biológica puede tratarse con un fijador tal como formaldehído y embebidos en parafina y se seccionaron para el uso en los métodos de la invención. Alternativamente, el tejido fresco o congelado puede ser presionado contra el portaobjetos de vidrio para formar monocapas de células conocidas como preparaciones de contacto, que contienen los núcleos intactos y no sufren el artefacto de truncamiento de la sección. Estas células pueden ser fijas, *p.ej.*, en soluciones alcohólicas como el 100% de etanol o 3:1 metanol: ácido acético. Los núcleos también pueden ser extraídos de secciones gruesas de las muestras incluidas en parafina para reducir los artefactos de truncamiento y eliminar el material incrustado extraño. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se cosechan y se procesan antes de la hibridación utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Tal procesamiento incluye típicamente el tratamiento con proteasa y una fijación adicional en una solución de aldehído tal como formaldehído.

Preselección de muestras

[0051] Antes de la detección, muestras de células pueden estar opcionalmente pre-seleccionadas sobre la base de las anomalías citológicas evidentes como se describe en la patente de los Estados Unidos. Nº 6.174.681. Pre-selección identifica células sospechosas, lo que permite que la proyección se centre en esas células. La preselección permite la detección rápida y aumenta la probabilidad de que un resultado positivo no se pueda perder. Durante la pre-selección, las células de una muestra biológica se colocan en un portaobjetos de microscopio y se exploraron visualmente para detectar anomalías citológicas comúnmente asociadas con displásicas y células neoplásicas. Tales anomalías incluyen anomalías en el tamaño nuclear, la forma nuclear, y la tinción nuclear, según la evaluación de la contratinción de núcleos con manchas de ácido nucleico o colorantes tales como yoduro de propidio o 4,6-dihidrocloruro diamidino-2-fenilindol (DAPI) por lo general después de hibridación de sondas a sus ADN diana. Típicamente, las células neoplásicas albergan los núcleos que se agrandan, de forma irregular, y/o muestran un patrón de tinción moteada. El yoduro de propidio, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 0,4 m g/ml a aproximadamente 5 m g/ml, es un colorante de ADN específico-fluorescente rojo que

se puede observar en un pico de longitud de onda de emisión de 614 nm. DAPI, que se utiliza típicamente a una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, es una mancha-ADN específica azul fluorescente que puede observarse en un pico de longitud de onda de emisión de 452 nm. En este caso, sólo aquellas células pre-seleccionadas para la detección se someten a recuento por pérdidas cromosómicas y/o ganancias. Preferiblemente, las células pre-seleccionadas en el orden de al menos 20, y más preferiblemente al menos 30 a 40, en número son elegidas para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Preselección de una región sospechosa en una sección de tejido se puede realizar en una sección en serie manchada por medios convencionales, tales como H&E o tinción de PAP, y la región sospechosa marcada por un patólogo o técnico entrenado de otro modo. La misma región se encuentra entonces en la sección de serie manchada por FISH y los núcleos se enumeran dentro de esa región. Dentro de la región marcada, la enumeración puede estar limitada a los núcleos que posean características anormales como se describe anteriormente.

[0052] Alternativamente, las células de detección se pueden elegir independientemente de características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se solapan en una zona determinada o áreas en un portaobjetos de microscopio se pueden evaluar por pérdidas cromosómicas y/o ganancias. Como un ejemplo adicional, las células en el portaobjetos, *p.ej.* las células que muestran morfología alterada, del orden de al menos aproximadamente 50, y más preferiblemente al menos aproximadamente 100, en número que aparecen en orden consecutivo en un portaobjetos de microscopio se puede elegir para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

20 *Patrón de hibridación*

[0053] El término "región diana" o "ácido nucleico diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en una localización cromosómica específica cuya pérdida y/o ganancia es indicativa de la presencia de melanoma. La "región diana" o "ácido nucleico diana" es para ser reconocido específicamente por una sonda de la presente invención e hibridan con la misma en el método de la presente invención.

[0054] El patrón de hibridación del conjunto de sondas cromosómicas a las regiones diana se detecta y se registra para las células elegidas para la evaluación de las pérdidas cromosómicas y/o ganancias. La hibridación se detecta por la presencia o ausencia de las señales particulares generadas por cada una de las sondas cromosómicas. El término "patrón de hibridación" pretende referirse a la cuantificación de las pérdidas cromosómicas/ganancias para las células elegidas para dicha evaluación, en relación con el número de la misma en una muestra de control igualada, para cada sonda a lo largo de una muestra de células elegida. La cuantificación de las pérdidas/ganancias puede incluir determinaciones que evalúan la relación de un locus a otro en el mismo o un cromosoma diferente. Una vez que se determina el número de regiones diana dentro de cada célula, según lo evaluado por el número de regiones que muestran la hibridación de cada sonda, las ganancias y/o pérdidas cromosómicas relativas pueden ser cuantificadas. Una ganancia relativa o pérdida para cada sonda se determina comparando el número de señales de la sonda distintas en cada célula para el número esperado en una célula normal, *es decir*, en el que el número de copias debe ser de dos. Las células no neoplásicas en la muestra, tales como queratinocitos, fibroblastos, y linfocitos, se pueden utilizar como células normales de referencia. Más que el número normal de señales de la sonda se considera una ganancia, y menos de la cantidad normal se considera una pérdida. Alternativamente, un número mínimo de señales por sonda por célula puede ser necesario para considerar la célula anormal (*p.ej.* 5 o más señales). De la misma manera para la pérdida, un número máximo de señales por sonda puede ser necesario para considerar la célula anormal (*p.ej.* 0 señales, o una o menos señales).

[0055] Los porcentajes de células con al menos una ganancia y/o pérdida se deben registrar para cada locus. Una célula se considera anormal si al menos una de las aberraciones genéticas identificadas por un conjunto de sonda de la presente invención se encuentra en esa célula. Una muestra puede considerarse positiva para una ganancia o pérdida si el porcentaje de células con la ganancia o pérdida correspondiente es superior al valor de corte para las sondas utilizadas en un ensayo. Alternativamente, dos o más aberraciones genéticas pueden ser necesarias con el fin de tener en cuenta la célula anormal con el efecto de aumentar la especificidad. Por ejemplo, en el que las ganancias son indicativas de una lesión maligna de melanoma o precursor, una muestra se considera positiva si contiene, por ejemplo, al menos cuatro células que muestran las ganancias de al menos dos o más regiones que contienen la sonda.

Las combinaciones de sondas y kits para uso diagnóstico y/o aplicaciones de pronóstico

[0056] La invención incluye combinaciones muy específicas y sensibles de las sondas que se pueden utilizar para detectar el melanoma y kits para su uso en el diagnóstico, la investigación y las aplicaciones de pronóstico. Estas combinaciones de sondas tienen una DFI de menos de 0,29 y, a menudo menos de aproximadamente 0,20. Los kits incluyen conjuntos de sonda y también pueden incluir reactivos tales como tampones y similares. Los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen direcciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Mientras que los materiales de instrucción comprenden típicamente materiales escritos o impresos que no se limitan a los mismos. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final está contemplado por esta invención. Tales medios incluyen, pero no se limitan a los medios electrónicos de almacenamiento (*p.ej.* discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (*p.ej.* CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan estos materiales de instrucción.

EJEMPLOS

SELECCIÓN DE SONDA

5 **[0057]** *Base de datos CGH.* Los datos de CGH en que se basa la selección de la sonda se habían adquirido en la Universidad de California, San Francisco y ha sido publicada previamente (Bastian et al., Am J Pathol 163: 1765-1770, 2003). Los datos fueron de 136 muestras primarias cutáneas de melanoma (63 melanomas de extensión superficial (SSM), 30 lentigo maligno melanoma, (LMM), 23 acral-lentiginoso (ALM), 4 melanomas nodulares (NM), 10 no clasificable (NC), y 6 melanomas surgen dentro de un nevo) y 53 muestras de nevos benignos (19 nevos azules, 7 nevos congénitos, 27 nevos Spitz). El genoma de la 1p de los telómeros al telómero 22q (cromosomas X e Y se omite) se dividió en 571 'contenedores' de acuerdo con el patrón de bandas Giemsa de los cromosomas y la relación de CGH correspondiente a cada contenedor fue interpretado en el sentido de reflejar la ganancia cromosómica (tumor para hacer referencia a relación de intensidad de fluorescencia) (relación >1,2), y la pérdida (relación <0,8). Estos umbrales se basan en hibridaciones de ADN normales frente a ADN normal como se publicó anteriormente (Bastian et al, Cancer Res; 58: 2170-5, 1998). Las sensibilidades, especificidades y valores DFI para discriminar entre nevos y melanomas se calcularon en cada bandeja para identificar el melanoma por las pérdidas o ganancias. Para determinar la mejor combinación de contenedores para discriminar los nevos de melanoma, los contenedores fueron examinados en combinaciones de hasta 4, el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valor DFI para cada combinación.

20 *Conjuntos de sonda FISH*

25 **[0058]** FISH se realizó con ocho conjuntos de sondas únicas. Cada conjunto de sondas contenía tres o cuatro sondas de enumeración cromosómica o identificadores específicos de locus a centrómeros o loci específicos de cromosomas (Tabla 1) que prevalecían en las combinaciones de sondas de mejor rendimiento (valores bajos DFI), determinado a partir del análisis de datos CGH (véase encima). Se incluyeron las sondas enumeradoras de cromosoma de determinar la ganancia o pérdida alélica de los identificadores específicos de locus correspondiente en esos cromosomas (p.ej. En el cromosoma 9p21 9) o aneumomía de los cromosomas.

30 Tabla 1: Sondas FISH y ubicaciones diana de genes utilizados para la selección de la sonda

Conjunto de sondas	Agua	Verde	naranja	Oro	Rojo
35 yo	CEP® 10	17q25 (TK1)	6p25 (RREB1)		9p21 (p16)
II	CEP®9	8q24 (MYC)		8p22 (LPL)	
III	CEP® 10	10q23 (PTEN)		1q23 (NTRK1)	
40 IV	CEP®6	CEP®7		7q34 (BRAF)	
V	CEP®8	CEP®9		20q13	
VI	7q34 (BRAF)	6p25 (RREB1)		20q13	9p21 (p16)
VII	6q23 (MYB)	6p25 (RREB1)	CEP®6		
45 VIII	CEP® 10	17q25 (TK1)		1q31 (COX2)	11q13 (CCND1)

50 **[0059]** Con la excepción de las sondas LSI® 17q25 (TK1), LSI® 6p25 (RREB1), LSI® 7q34 (BRAF), LSI® LPL (8p22), LSI® 1q31 (COX2), y LSI® 1q23 (NTRK1), las sondas LSI® y CEP® están disponibles comercialmente de Abbott Molecular Inc. (www.abbottmolecular.com) aunque p16 LSI® (9p21) y LSI® 20q13 están disponibles sólo marcadas con SpectrumOrange™. En lugar de la etiqueta SpectrumOrange™, el material de partida de ácido nucleico se transaminó y después se etiquetó químicamente usando Texas Red® (marca comercial de Molecular Probes, Eugene, OR) y 5-(y 6-)-carboxirodamina 6G (oro), respectivamente. El proceso de transaminación y etiquetado se describe en Bittner, et al.US Pat. N° 5.491.224.

55 **[0060]** La sonda LSI® 1q31 (COX2) se hizo a partir de cinco clones BAC (identificación núms. RPCI-11-70N10, RPCI-11-809F11, RPCI-11-104B23, RPCI-11-457L10, RPCI-11-339I2). La sonda 17q25 LSI® (TK1) se hizo a partir de dos clones BAC (identificación núms. RPCI11-219g17, RPCI11-153a23). LSI®6p25 (RREB1) se hizo a partir de dos clones BAC (identificación núms. RPCI11-405o10, RPCI11-61o1). LSI® 7q34 (BRAF) se hizo a partir de dos clones BAC (identificación RPCI11-837g3 núms., CDTI-2516j12). LSI® LPL (8p22) se hizo a partir de dos clones (Identificación núms. 67-O21, CTD-2286-L9). LSI® 1q23 (NTRK1) se hizo a partir de dos clones BAC (identificación núms. RPCI11-107d16, RPCI11-356j7). Los clones fueron obtenidos de BAC PAC Resources o Invitrogen. Las sondas se transaminaron y se etiquetaron con Texas Red (rojo), 6-[fluoresceína 5-(y-6)-carboxamido]ácido, éster de succinimidilo (verde), 5-(y 6-)-carboxirodamina 6G, éster de succinimidilo (oro) o 5-(y-6)-carboxitetrametilrodamina, éster de succinimidilo.

65

Población de estudio y preparación de muestras para análisis

[0061] El estudio incluyó muestras de 86 melanomas y 31 nevos benignos reunidos en matrices microtejidos así como secciones de 94 melanomas y 95 muestras de biopsia de piel FFPE nevos benignos.

[0062] Los bloques de parafina que contienen las muestras de biopsia de tejido se seccionaron a 5 µm de espesor y se montaron en portaobjetos cargados positivamente SuperFrost Plus® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA). Todos los portaobjetos se hornearon a 56°C durante la noche para fijar el tejido sobre los portaobjetos, y después se almacenaron a temperatura ambiente. En preparación para la hibridación in situ, portaobjetos de muestra de matriz se de-parafinó por inmersión en 3 cambios de agente de compensación y disolventes Hemo-De™ y (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) durante 5 minutos cada uno, seguido de dos lavados de 1 minuto en etanol absoluto. Después del secado, los especímenes se prepararon adicionalmente para la hibridación in situ por el tratamiento en ácido fórmico al 45%/0,3% H₂O₂ durante 15 minutos, seguido de un enjuague de 3 minutos en agua. Las muestras se sumergieron en solución de pretratamiento de vysis (Abbott Molecular Inc) a 80°C durante 10 minutos, y se enjuagaron en agua durante 3 minutos. Los portaobjetos se sumergieron en una solución de proteinasa K (35 µg de tampón K/ml de proteinasa; Abbott Molecular Inc.) a 37°C durante 10 minutos, inmersos en 0,01 N HCl durante 3 minutos, se enjuagaron en agua durante 3 minutos, se deshidrató en 70%, 85% y 100% de etanol durante 1 minuto cada uno, y se deja secar. En la preparación para la hibridación in situ, secciones de tejido se de-parafinaron por inmersión en 3 cambios de Hemo-De™ de agente de disolventes y compensación (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) durante 5 minutos cada uno, seguido de dos enjuagues de 1 minuto en etanol absoluto. Después del secado, las muestras se prepararon adicionalmente para la hibridación in situ por el tratamiento en 1XSSC pH 6,3 a 80°C durante 35 minutos, y se enjuagaron en agua durante 3 minutos. Los portaobjetos se sumergieron en una solución de proteasa (4 mg de proteasa/ml 0,2 N HCl) a 37°C durante 15 minutos, se enjuagaron en agua durante 3 minutos, se deshidrataron en 70%, 85% y 100% de etanol durante 1 minuto cada uno, y se dejaron secar.

Hibridación FISH

[0063] Los portaobjetos preparados se hibridan con las soluciones de sondas FISH en un horno de co-denaturación automatizada HYBrite™ (Abbott Molecular Inc). Las diapositivas fueron colocados en la superficie del horno, la solución de sonda se colocó sobre la sección de tejido (típicamente 10 µl), un cubreobjetos se aplica sobre la solución de la sonda, y los bordes del cubreobjetos se sellaron a la corredera con cemento de goma. El ciclo de horno de co-desnaturalización/hibridación se fijó para desnaturalización a 73°C durante 5 minutos, y la hibridación a 37°C durante 16-18 h. Después de la hibridación, los portaobjetos se retiraron de la HYBrite, y se eliminó el cemento de caucho. Los portaobjetos se colocaron en temperatura ambiente 2X SSC (SSC = 0,3 M NaCl, citrato de sodio 15 mM)/0,3% Nonidet P40 (NP40; Abbott Molecular Inc.) durante 2 a 10 minutos para eliminar los cubreobjetos. Los portaobjetos se sumergieron entonces en 73°C 2X SSC/0,3% de NP40 durante 2 minutos para la eliminación de la sonda no específicamente unida, y se dejaron secar en la oscuridad. La solución DAPI I Antifade (Abbott Molecular Inc.) se aplicó a la muestra para permitir la visualización de los núcleos.

Enumeración de las señales de FISH

[0064] Los portaobjetos se analizaron con un microscopio de epifluorescencia equipado con filtros de paso de banda individuales para el contraste DAPI, SpectrumAqua™, y SpectrumGold™, SpectrumGreen™, SpectrumOrange™, y SpectrumRed™. La enumeración de señal de FISH se realizó sin conocimiento de los resultados clínicos o histológicos del paciente. Los conjuntos de sonda I-V se hibridaron con micromatrices de tejidos y 40 células analizadas por espécimen. El conjunto de sondas VI-VIII se hibridaron a secciones de muestra y 30 células analizadas por espécimen. Para las muestras con baja celularidad, se requiere un mínimo de 20 núcleos para su inclusión en el análisis de datos.

Análisis de datos de enumeración

[0065] El número FISH de señales registradas para cada núcleo celular dentro de un espécimen puede ser usado para clasificar los loci correspondientes como normales (2 señales para loci en los autosomas), anormales debido a la pérdida (1 o 0 señales), o anormales debido a la ganancia (mayor que 2 señales). Varios parámetros se definen como mediciones de ganancias y pérdidas de locus anormales dentro de una muestra:

Parámetros basados en porcentajes de células enumeradas dentro de un espécimen:**[0066]**

% de ganancia: 1) para un solo locus, % de ganancia es el porcentaje de células con > 2 señales correspondientes a ese locus.

2) para la ganancia de un locus (locus 1) con relación a otro locus (locus 2), la ganancia es el porcentaje de células con más señales de locus 1 que señales de locus 2.

% de pérdida: 1) para un solo locus, % Pérdida es el porcentaje de células con <2 señales correspondientes a ese locus.

2) por la pérdida de un locus (locus 1) con relación a otro locus (locus 2), *por ejemplo*, MYB/CEP 6, *la pérdida* es el porcentaje de células con menos señales de locus 1 (*por ejemplo*, MYB) que señales de locus 2 (*por ejemplo*, CEP 6).

% *Anormal*: 1) para un solo locus, % *anormal* es el porcentaje de células con >2 señales o <2 señales correspondientes a ese locus.

2) para mantener el equilibrio anormal entre dos loci (locus 1 y locus 2), *Anormal* es el porcentaje de células para el que el número de señales locus 1 no es igual al número de señales de locus 2.

Parámetros basados en promedios de todas las células enumeradas dentro de una sola muestra:

[0067]

número de copias de locus promedio: Para un solo locus, *número medio de copias* es el número de señales que corresponden a ese locus sumado sobre todas las células enumeradas, divididas por el número de células enumeradas.

relación media de locus: Para una proporción de dos loci (locus 1/locus 2), *p.ej.* MYB/CEP 6 se muestra en la Tabla 6, *relación media de locus* es el número de locus 1 (*p.ej.* MYB) señales sumadas sobre todas las células enumeradas, divididas por el número de locus 2, (*p.ej.* CEP 6) señales sumadas sobre todas las células enumeradas.

[0068] Los valores de los cinco parámetros anteriores fueron tabulados para cada locus y pares de locus correspondientes (*p.ej.* Loci en el mismo cromosoma, como 6q23 (MYB) y CEP 6) para cada muestra, y los medios (\bar{x}) y las desviaciones estándar (s) de cada parámetro se calcularon para los grupos de muestras nevus y melanomas, con exclusión de las muestras de calidad de señal suficiente para la enumeración.

[0069] El valor discriminante (VD), definido como $(x_1 - x_2)^2 / (s_1^2 + s_2^2)$ se utilizó como una medida de la capacidad de una aberración de locus específica, medida por uno de los cinco parámetros anteriores, para distinguir entre una muestra de entre el grupo de pacientes que tienen melanoma y una muestra de entre el grupo de pacientes que no presentan melanoma. En esta fórmula, x_1 y s_1 se refieren a la media (\bar{x}) y la desviación estándar (s) de un parámetro de locus específico para el grupo de muestra de melanoma, y x_2 y s_2 se refieren a la media y la desviación estándar de ese parámetro para la muestra del grupo de nevus benignos. Valores VD más grandes son indicativos de una mayor capacidad de distinguir entre los dos grupos de pacientes. Como otra medida de discriminación, se utilizó la prueba t de Student para comparar los valores medidos para cada parámetro entre los grupos de nevus y muestras de melanoma con el fin de determinar si las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas (probabilidades <0,05 se consideraron significativas).

[0070] Las sensibilidades y especificidades se calcularon mediante la aplicación de puntos de corte para los diferentes parámetros de locus para cada uno de los 17 loci. Para el % de ganancia, % de pérdida, y % de parámetros anormales, una muestra se consideró positiva para un locus particular si el valor de dicho parámetro excede el valor de corte. Para el número de copias promedio de locus y parámetros de relación de locus media, los valores de corte se podrían aplicar para distinguir: 1) número de copia alto aberrante o relación, (indicada como r-ganancia en la Tabla 6), para el que los valores de parámetro mayores que el valor de corte indicaron que una muestra era positiva, 2) número de copias bajo aberrante o relación, (denotado por r-pérdida en la Tabla 6), o 3), para cuyos valores de parámetros menos que el valor de corte indican que una muestra era positiva, o 3) o ambas condiciones 1) y 2). Tenga en cuenta que los puntos de corte para los valores 1) y 2) pueden ser diferentes.

[0071] La sensibilidad para la detección de muestras con un diagnóstico particular era igual a la fracción de especímenes de ese grupo que eran positivos. Las muestras que no proporcionaron al menos 20 células con señales de FISH de calidad suficiente para el recuento se excluyeron del cálculo. La especificidad, con relación a un grupo de control, se calculó como uno menos la fracción de las muestras del grupo de control que eran positivas con los mismos criterios (falsos positivos). Para sondas individuales, la sensibilidad, la especificidad y el DFI se calcularon para los valores de corte entre las células anormales 0 y el 100%, en incrementos del 1%. El parámetro "distancia de ideal" (DFI), que incorpora tanto la sensibilidad como especificidad, se utilizó para evaluar el rendimiento relativo de cada sonda o combinación de sondas.

[0072] Para las combinaciones de sondas de puntos de corte se aplicaron por dos métodos diferentes que permitían que cada locus, medida por el parámetro seleccionado para ese locus, tuviera un valor de corte diferente. Si cualquiera de los loci dirigidos por la combinación de la sonda eran positivos para el respectivo corte, a continuación, la muestra se consideró positiva. El análisis de permutación de valores de corte individuales entre las células anormales 0 y 100% en incrementos del 1% no era práctico para las combinaciones de tres o más sondas (debido al tiempo de cálculo excesivo requerido), por lo que cortes basados en las medias y las desviaciones estándar de los parámetros locus para el grupo de muestra de nevus benignos se calcularon en primer lugar. Puntos de corte se generaron como $\bar{x} + n*s$, en donde \bar{x} y s son la media y la desviación estándar para un parámetro específico del locus particular, en el grupo de muestra de nevus y n es un multiplicador que típicamente varía -1-3 en incrementos de 0,1. Para combinaciones de sonda los valores de corte se calcularon utilizando las respectivas \bar{x} y s para cada sonda y los parámetros de la combinación, pero para el mismo valor de n . Con el fin de identificar los mejores valores de corte para discriminar entre especímenes de tumores malignos y benignos, se calcularon los valores de corte para el valor más bajo de n (*por ejemplo*, -1), la sensibilidad, la especificidad y los valores de DFI se calcularon

sobre la base de esos puntos de corte, n se incrementó (por ejemplo, 0,1), y los cálculos se repitieron hasta que se alcanzó un valor máximo ofn (por ejemplo, 3). Este procedimiento proporciona valores de corte ajustados a cada sonda basada en el nivel de anormalidad y grado de variación en el grupo de nevos. Para una primera aproximación, basando puntos de corte en x y múltiplos comunes de s establece una especificidad similar con respecto al grupo nevi para cada sonda y el parámetro en la combinación para cada valor de n (suponiendo una distribución normal de valores de parámetros). Las sondas y combinaciones de sondas en cada corte o un conjunto de valores de corte fueron ordenados de menor a mayor DFI con el fin de identificar las mejores combinaciones de sondas. Valores de corte óptimos para la realización de las mejores combinaciones de sonda (valores más bajos DFI) se perfeccionaron aún más por un segundo método. Por este método puntos de corte se variaron de forma independiente en pequeños incrementos en un intervalo reducido de puntos de corte que flanquean los puntos de corte óptimos establecidos por el primer método.

[0073] Complementación de la sonda se evaluó mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad y los valores DFI para todas las posibles combinaciones de sonda hasta combinaciones de cuatro sondas, en un intervalo de puntos de corte como se describe anteriormente. Cada sonda también se examinó utilizando los cinco parámetros diferentes para la medición de aberraciones. Los parámetros pertinentes examinados se incluyen en las Tablas 2 a 6. Dos sondas se complementan mutuamente si un valor inferior DFI se puede lograr para las dos sondas colectivamente, que para cualquiera de las sondas de forma individual. Típicamente, sólo las sondas que proporcionan valores de p de menos de 0,05 en el análisis de discriminación (Tabla 3) se utilizaron en estos cálculos con el fin de reducir la probabilidad de que los valores bajos DFI serían el resultado de la combinación de eventos al azar, y para reducir el tiempo de cálculo. Gráficos de características de operador de receptor (ROC) se generaron mediante el trazado de la sensibilidad frente a 1-especificidad para una sonda particular y parámetro o combinación de la sonda en el rango de valores de corte examinados (véase más arriba). Al generar independientemente variados puntos de corte en las combinaciones de sonda múltiples valores de sensibilidad para cada valor de especificidad, sólo el valor de la sensibilidad más alta en cada valor de especificidad se trazó, que representa la combinación óptima de valores de corte para cada especificidad. El rendimiento relativo de una sonda o combinación de sondas se puede evaluar a partir de estas curvas por las áreas bajo las curvas (mejor rendimiento indicado por las áreas más grandes) o por la distancia de enfoque más cercano al punto (0,1) en el gráfico (100% especificidad, 100% de sensibilidad). Observe que la distancia de cualquier punto de las curvas para el punto (0, 1) es igual al valor DFI, y combinaciones de sondas con valores más bajos DFI se desempeñan mejor que los que tienen valores más altos DFI. Los puntos de corte asociados con el valor DFI más bajo para una combinación de sonda particular son los puntos de corte óptimos para esa combinación. Sin embargo, dependiendo de la aplicación, puntos de las curvas ROC con valores algo inferiores DFI pueden seleccionarse, después de considerar la importancia clínica relativa de sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, un punto de la curva con una sensibilidad ligeramente menor pero especificidad mayor y DFI mayor puede elegirse sobre otro punto de la curva que tiene una sensibilidad menor y especificidad mayor y DFI menor si es más importante identificar el máximo número posible de tipos de cáncer, a expensas de un mayor número de falsos positivos.

RESULTADOS

[0074] Análisis de base de datos CGH y sondas de selección para FISH. Se utilizaron los datos CGH para identificar loci genéticos para el desarrollo de sonda FISH. El primer paso para la identificación de loci consistió en calcular la sensibilidad, especificidad y valor DFI en cada uno de los contenedores 571 en todo el genoma de 1p a través de 22q con respecto a las muestras 136 de melanoma y 56 muestras de nevos benignos. Especificidades fueron del 100% en casi todos los loci, por lo que sólo las sensibilidades se representaron respecto al número de contenedores en la figura 1 partes A (pérdidas), B (ganancias), y C (amplificaciones). Loci con sensibilidades más altas para la detección del melanoma incluyen 1p21, 3q29, 6q25.3, 8p23, 9p21, 9q21.1, 10p15, 10q23.3, 11q25, 13q34, 16q24, y 17pter para la pérdida; 1q22, 3p21.3, 6p25.3, 7p21, 7q33, 8q24.2, 15q26, 17q25, y 20q13.3 para la ganancia; y 5p15.3, 11q13.2 y 22q13.1 para la amplificación. Las regiones de ganancia y de pérdida eran a menudo amplias, a veces incluyendo cromosomas enteros o brazos cromosómicos, lo que indica que la colocación de la sonda FISH no sería crítica, es decir, sondas FISH de las bandas vecinas por lo general deben producir una eficiencia similar para la detección de anomalías.

[0075] El estado centrómero se evaluó a partir del estado de secuencias no repetitivas que flanquean el centrómero. Centrómeros predichos para tener altas sensibilidades para la detección de melanoma en base a los datos CGH incluidos centrómeros 3, 6, 9, y 10 para las pérdidas, y centrómeros 1, 6, 7, 8, y 20 para las ganancias.

[0076] El segundo paso en la identificación de loci para el desarrollo de la sonda FISH consistió en examinar la capacidad de diferentes loci para complementarse entre sí para la detección de malignidad (es decir, la sensibilidad de loci combinados es mayor que las sensibilidades individuales de los loci). Con este fin, las sensibilidades, especificidades y valores DFI se calcularon para todas las combinaciones posibles de dos, tres, y cuatro de los loci mencionados anteriormente. La Tabla 7 muestra las sensibilidades y valores DFI para combinaciones loci y locus con valores más bajos DFI para los 136 especímenes de melanoma en la base de datos CGH. Para loci, sensibilidades y valores DFI se enumeran en caso de desequilibrio (ganancia, pérdida, o amplificación), ganancia, pérdida, o amplificación. Para las combinaciones de locus, solamente se enumeran las sensibilidades y valores DFI en caso de desequilibrio. Los loci y combinaciones de loci con los valores más bajos DFI (FISH) individuales se enumeran en la Tabla 6 ordenados de menor a valores más altos DFI. Se seleccionaron los 14 loci que aparecen más comúnmente en las combinaciones con los valores más bajos DFI para su evaluación por FISH en TMA e

incluyen la conjunto de sondas IV en la Tabla 1. Tras el análisis de los loci 14, un subconjunto de las sondas FISH se evaluó en secciones de tejido de los tumores melanocíticos individuales (conjunto de sondas VI). Combinaciones adicionales de nuevas sondas se ensayaron también en dichas secciones (conjunto de sondas VII-VIII; Tabla 1) para identificar loci que se complementaron el uno al otro para la detección de malignidad.

5

Análisis de discriminación

[0077] La capacidad de cada sonda FISH para discriminar entre el grupo de pacientes con melanoma y los pacientes que tienen un nevo benigno se examinó inicialmente mediante la comparación de las medias y las desviaciones estándar de los diferentes parámetros para cada locus examinado entre el grupo de muestras benignas de nevos y el grupo de muestras de melanoma. Para las hibridaciones de micromatrices de tejidos y para cada locus o relación de locus, en la tabla 2 se enumeran los datos relevantes para el grupo de muestras benignas de nevos, incluyendo el número de muestras evaluadas (N), los medios del porcentaje de células con ganancia (% de ganancia) o pérdida (% de pérdida), el número medio de copias de locus (loci únicos) o la relación de locus promedio (proporciones de 2 loci), y las correspondientes desviaciones estándar. Los medios y las desviaciones estándar se calcularon para el grupo de muestra de melanoma y se enumeran en la Tabla 3 para los micromatrices de tejidos. Tabla 3 también muestra VD y los valores de p, cantidades que reflejan la capacidad de las sondas particulares o proporciones de sonda para diferenciar entre melanoma y muestras normales. Los VDs y valores p eran consistentes en que los valores de p inferiores fueron acompañados por VDs mayores. Entradas de NA en la Tabla 3 para VD y los valores p indican que la media del grupo de melanoma era inferior a la del grupo de nevos benignos.

[0078] Los valores p listados en la Tabla 3 indican que las ganancias de centrómero 8, centrómero 9, 1q23, 6p25, 7q34, 17q25 y 20q13 loci, y la ganancia de 7q34 en relación con centrómero 7 se producen en un porcentaje significativamente mayor de células en muestras de melanoma que en las muestras normales. Además, la pérdida de la 6p25, 8p22, 8q24, 9p21, 17q25, centrómero 6, y centrómero 10 loci, y la pérdida de 10q23 (identificado usando la sonda PTEN) con relación al centrómero 10, se producen en un porcentaje significativamente mayor de células para muestras de melanoma que para las muestras normales. Sobre la base de VD, la ganancia de 20q13 y centrómero 6 loci mostró el mayor nivel de discriminación entre melanoma y nevos, teniendo ambos $VD > 1$. Del mismo modo, la pérdida de 9p21, centrómero 6, y 17q25 loci mostraron $VD > 1$.

[0079] En base a los datos de la Tabla 3, un subconjunto de las sondas se hibridó con secciones de tejido enteras y se analizaron de la misma manera usando VD y los valores p para confirmar los datos recogidos en micromatrices de tejidos. Como se ve en la Tabla 5, las sondas seleccionadas basadas en células con la ganancia de datos de micromatrices del tejido tienen un rendimiento similar. Varias nuevas sondas se analizaron en las secciones de tejido (conjunto de sondas VII y VIII; Tabla 1). Las medias y las desviaciones estándar se calcularon para el melanoma y se enumeran en la Tabla 5 para las secciones. Tabla 5 también muestra valores diarios y los valores de p, cantidades que reflejan la capacidad de las sondas particulares o proporciones de sonda para diferenciar entre melanoma y muestras normales. Los VDs y valores p eran consistentes en que los valores de p inferiores fueron acompañados por VDs mayores.

[0080] El valores p listados en la Tabla 5 indican que las ganancias de 1q31, 6p25, 6q23, 7q34, 9p21, 11q13, 17q25, 20q13, y la ganancia relativa de 6q23 al centrómero 6 ocurren en un porcentaje significativamente mayor de células para muestras de melanoma que para las muestras normales. En base al VD, ganancia de 6p25 mostró el mayor nivel de discriminación entre melanoma y nevos, teniendo un $VD = 0,7$.

Sensibilidades, especificidades y valores DFI de sonda única

[0081] Las sensibilidades, especificidades y valores DFI se calcularon para cada uno de las sondas hibridadas con secciones en un rango de valores de corte y se enumeran en la parte superior de la Tabla 6. Para el melanoma en comparación con los nevos, los mejores valores DFI (es decir, los valores más bajos DFI) se obtuvieron de 6p25, 1q31, 7q34, 20q13 de menor a mayor DFI (Tabla 6). De estas sondas, ganancia de 6p25 se identificó como el rendimiento consistentemente más alto por los diferentes métodos de evaluación de rendimiento de la sonda única incluidos los valores VD, los valores de p de las comparaciones de la prueba t de Student y prueba exacta de Fisher de 2 colas, y los valores de DFI.

Análisis de complementación

[0082] Con el fin de determinar qué sondas funcionan mejor en combinación, se llevó a cabo el análisis de complementación. Sensibilidades, especificidades y valores DFI para discriminar el melanoma de nevos benignos se calcularon para todas las posibles combinaciones de sonda de 1 a 4 sondas. Se analizaron las combinaciones de un máximo de 4 sondas, ya que cuatro sondas se combinan fácilmente en un conjunto de sonda multicolor adecuado para su visualización a través del microscopio (etiquetas de emisión de luz visible). Datos resultantes de las combinaciones de sondas de ejecución superior se enumeran en la Tabla 6.

Curvas de operador de receptor

[0083] Diagramas ROC se generaron utilizando sensibilidades y especificidades calculadas en el rango de valor de

corte examinado. Las curvas ROC para unos pocos ejemplos de mejores combinaciones de sondas de rendimiento, según lo establecen los valores más bajos DFI en la Tabla 6, se representan en las figuras 2A, 2B y 2C. Curvas ROC en las Figuras 2A, 2B y 2C ilustran las relaciones entre sensibilidad y especificidad para la detección de muestras de melanoma en relación con el grupo colectivo de muestras de nevos utilizando sondas que detectan tanto la pérdida como la ganancia de loci. Curvas ROC para las 4 sondas individuales de mejor rendimiento se representan con el fin de mostrar mejoras (complementación) proporcionadas por combinaciones de sondas (Figura 2C). Las entradas de la tabla 6 corresponden al punto en cada curva que se encuentra más cerca de la esquina superior izquierda de la trama, (0,1). A partir de estas parcelas, o los datos de la Tabla 6, se puede observar que el aumento de 6p25 se complementa con CEP® 10 delección (0 señales/célula), ganancia de 11q13, o ganancia de 6q23 para discriminar entre melanoma y nevos benignos. Al poder proporcionar una única sonda una DFI tan baja como 0,2905 (6p25 ganancia), combinaciones de sondas deberían deseablemente proporcionar DFI <0,2905 para merecer el gasto adicional de incluir sondas adicionales en el ensayo, y el tiempo añadido requerido para enumerar las sondas. Las curvas ROC en la Figura 2B representan combinaciones de dos sondas que pueden cada una proporcionar DFI <0,2905, mientras que las combinaciones de tres sondas pueden proporcionar una DFI <0,2622 (Figura 2B), y la combinación de cuatro sondas pueden proporcionar una DFI <0,1937 (Figura 2C).

[0084] La mejor combinación global de la sonda se muestra en la Figura 2C. Las curvas ROC muestran que la ganancia 6p25 se complementa por la relación para 6q23 al centrómero 6 (comparación de la curva ROC para la ganancia 6p25 solo en la Figura 2A y la curva ROC para 6p25 en combinación con la relación de 6q23 al centrómero 6 en la Figura 2B), y ganancia 6p25 combinada con la relación de 6q23 al centrómero 6 se complementa además con ganancia 17q25 (Figura 2C). La curva ROC correspondiente tiene un valor DFI = 0,1127 con una sensibilidad de 91% y una especificidad del 93%. La segunda mejor sonda en la Figura 2C es el conjunto de 6p25, la relación de 6q23 a centrómero 6, y ganancia 11q13. La curva ROC correspondiente tiene una DFI = 0,1257 con una sensibilidad del 88% y especificidad del 97% (Tabla 6).

[0085] Al poder ser complicadas las mediciones de pérdida de locus por artefactos de truncamiento (secciones de parafina) y solapamientos de señal (cualquier preparación de muestras), combinaciones de sondas que sólo se basan en la medición de la ganancia de locus también se evaluaron. Los datos para el conjunto de cuatro sondas de todas las ganancias incluyendo sondas de 6p25, 6q23, relación de 6q23 a centrómero 6, y 17q25 se incluyen en la Tabla 6 y un ejemplo de curva ROC se representan en la Figura 2C. La curva ROC correspondiente tiene una DFI = 0,1257 con una sensibilidad de 88% y especificidad del 97% (Tabla 6).

DETECCIÓN DEL MELANOMA

[0086] Los conjuntos de sonda de cuatro colores 6p25, 17q25, 6q23, y CEP® 6; y 6p25, 6q23, CEP® 6 y 11q13 descritos en este estudio de selección de la sonda se puede utilizar para evaluar muestras de biopsia de piel de parafina embebida de formol fijado para la presencia de células que tienen anomalías cromosómicas consistentes con un diagnóstico de melanoma. Las muestras se preparan para la hibridación FISH y se sujetan a la hibridación con el conjunto de sonda como se describe en el estudio de selección de la sonda. Las células de cada muestra se evaluaron mediante la enumeración de 20 a 200 células secuenciales, como se describe en el estudio de selección de la sonda. Muestras que demuestran porcentajes de células con r-ganancia de 6p25, 6p25 anormal, aumento de 17q25 o una proporción del número total de 6q23 al centrómero de 6 tipos de $\geq 1,1$ que son mayores que los puntos de corte de 2,0%, 66%, 14% o 26%, respectivamente, se consideran positivas para melanoma. Las muestras que demuestran porcentajes de células con una r-ganancia de 6p25, 6p25 anormal, aumento de 11q13 o una relación del número total de 6q23 a señales de centrómero 6 $\geq 1,1$ que son mayores que los puntos de corte de 2,0, 66%, 13% y 26%, respectivamente, están considerados positivas para el melanoma. Los patrones de hibridación para otros conjuntos de sondas útiles para la detección de melanoma se muestran en la Tabla 6.

Conjuntos de sondas adicionales

[0087] Conjuntos de sonda que pueden ser útiles en la detección del melanoma también pueden seleccionarse en base a los valores de DFI, por ejemplo, menos de 0,15, a partir de estudios de CGH, supra.

[0088] Por lo tanto, otras combinaciones de sondas que se han encontrado para ser útiles tienen dos sondas, en las que las dos sondas son:

- a) una sonda enumeradora de cromosoma 9 y una sonda a la subregión de cromosoma 9p21;
- b) sondas para las subregiones del cromosoma 9p21 y 20q13;
- c) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- d) una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13;
- e) una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda enumeradora de cromosoma 8;
- f) sondas para las subregiones del cromosoma 20q13 y 6p25;
- g) sondas a las subregiones del cromosoma 9p21 y 6p25;
- h) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25;
- i) una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- j) sondas que se dirigen a las subregiones del cromosoma 9p21 y 17q25;
- k) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13;
- l) sondas que se dirigen a las subregiones del cromosoma 9p21 y 7q34;

- m) sondas que se dirigen a las subregiones del cromosoma 9p21 y 1q23
- n) sondas que se dirigen a las subregiones del cromosoma 20q13 y 1q23; y
- o) una sonda enumeradora de cromosoma 9 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13.

5 **[0089]** Combinaciones de sondas útiles que tienen tres sondas son:

- a) sondas para las subregiones del cromosoma 20q13, 9p21, 7q34 y;
- b) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- 10 c) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda enumeradora de cromosoma 8, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- d) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 7q34, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- 15 e) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25;
- f) una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13, y una sonda que se dirige a la subregión cromosoma 9p21;
- g) una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 20q13, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- 20 h) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda enumeradora de cromosoma 10, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21;
- i) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda que se dirige a la subregión cromosómica 6p25 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21; y
- 25 j) tres sondas que se dirigen a las subregiones de cromosoma 9p21, 6p25, y 7q34.

25 **[0090]** Combinaciones de sondas útiles que tienen cuatro sondas son:

- a) sondas para las subregiones del cromosoma 9p21, 6p25, 7q34, 20q13 y;
- b) sondas para subregiones de cromosoma 1q23, 6p25, 7q34, 20q13 y;
- 30 c) una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13, y una sonda que se dirige a las subregiones del cromosoma 7q34; y
- d) una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 9p21, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13, y una sonda que se dirige a las subregiones del cromosoma 7q34.
- 35

[0091] Por lo tanto, las combinaciones de sonda de al menos dos sondas incluyen:

- a) una sonda enumeradora de cromosoma 9 y una sonda a la región de cromosoma 9p;
- 40 b) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q;
- c) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;
- d) una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q;
- 45 e) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p;
- f) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p;
- g) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p;
- h) una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;
- 50 i) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 17q;
- j) una sonda enumeradora de cromosoma 8 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q;
- k) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 7q;
- l) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 1q;
- 55 m) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 1q; y
- n) una sonda enumeradora de cromosoma 9 y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q.

60 **[0092]** Combinaciones de sonda de al menos tres sondas incluyen:

- a) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q;
- b) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;
- 65 c) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda enumeradora de cromosoma 8, y una sonda que se

dirige a la región de cromosoma 9p;

d) una sonda enumeradora de cromosoma 9, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;

5 e) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p;

f) una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;

g) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p;

10 h) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda enumeradora de cromosoma 10, y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 9p;

i) una sonda enumeradora de cromosoma 8, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p; y

15 j) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q.

[0093] Combinaciones de sonda de al menos cuatro sondas incluyen:

20 a) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q;

b) una sonda que se dirige a la región de cromosoma 1q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q;

25 c) una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q; y

30 d) una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 9p, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 20q, y una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q.

Otras realizaciones

35 **[0094]** Se ha de entender que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones de la invención están dentro del alcance de las reivindicaciones establecidas a continuación.

ES 2 618 858 T3

2. La muestra de nevo que figura en los micromatrices de tejidos (DE = desviación estándar, VD = valor discriminante)

SONDA	N	Células con ganancia		Células con pérdida		Señales de sonda/célula o sonda 1/sonda 2	
		Ave. % células con ganancia	DE % células con ganancia	Ave. % células con pérdida	DE % células con pérdida	Nº de copias de locus Ave. o relación	Nº de copia DE de relación
NTRK1 (1q23)	29	4,80	6,85	36,95	20,81	1,69	0,25
RREB1 (6p25)	31	3,20	5,34	30,65	11,73	1,74	0,16
CEP 6	22	8,60	7,52	49,57	19,51	1,61	0,28
BRAF (7q34)	22	6,16	5,42	49,34	18,18	1,59	0,22
CEP 7	22	11,48	8,11	35,88	19,16	1,79	0,26
LPL (8p22)	23	27,93	14,73	16,92	10,99	2,26	0,36
MYC (8q24)	23	28,62	9,47	17,79	9,75	2,24	0,27
CEP 8	22	0,81	2,36	50,50	19,56	1,50	0,20
p16 (9p21)	31	3,84	4,99	33,82	10,07	1,73	0,21
CEP 9	22	0,84	1,84	45,53	16,69	1,55	0,17
PTEN (10q23)	29	5,97	6,71	43,42	17,96	1,64	0,24
CEP 10(conjunto sonda 2)	31	3,51	2,89	42,52	10,90	1,60	0,15
CEP 10(conjunto sonda 5)	29	5,95	8,05	47,58	18,23	1,61	0,28
CEP 10(conjunto sonda 5)	33	4,67	4,26	44,92	10,04	1,60	0,15
CEP 10(avg. para conjunto 2 and 5)	31	3,40	6,14	29,22	10,50	1,75	0,16
CEP 10(avg. para conjunto 2 and 5)	22	1,14	3,43	47,02	24,64	1,54	0,26
TK1 (17q25) 20q13	23	20,29	10,77	19,17	7,40	1,01	0,09
TK1 (17q25) 20q13	29	19,13	9,72	16,05	7,16	1,03	0,11
LPUMYC	22	7,05	6,46	25,63	7,66	0,89	0,07
PTEN/CEP10	21					1,12	0,22
BRAF/CEP7	18					1,48	0,31
RREB1/CEP6*	18					1,49	
LPL/CEP8*	22					0,24	
MYC/CEP8*						1,13	0,18
p16/CEP9*							

* Las relaciones son estimaciones basadas en señales de promedio por célula para cada sonda medida en diferentes hibridaciones.

Tabla 3. Casos de melanoma en micromatrices de tejido (DE = Desviación estandar, VD = valor discriminante)

SONDA	N	Células con ganancia				Células con pérdida				Señales de sonda/célula o sonda 1/sonda 2			
		Ave. % células con ganancia	DE % células con ganancia	VD	p	Ave. % células con pérdida	DE % células con pérdida	VD	p	Nº copias de locus Ave. o relación	Nº de copia de relación	de DE	VD
NTRK1 (1q23)	75	19,15	17,15	0,60	0,00	30,58	14,55	0	NA	1,97	0,40	0,34	0,00
RREB1 (6p25)	66	16,06	17,48	0,50	0,00	42,36	17,88	0	0,00	1,88	0,91	0,02	0,24
CEP 6	86	3,15	5,38	0,35	NA	78,14	16,60	0	0,00	1,26	0,23	0,93	NA
BRAF (7q34)	86	12,98	14,78	0,19	0,00	48,14	16,83	0	NA	1,70	0,51	0,04	0,12
CEP 7	86	15,72	13,61	0,07	0,07	39,36	14,95	0	0,44	1,81	0,32	0,00	0,82
LPL (8p22)	39	23,09	17,05	0,05	NA	31,71	15,32	1	0,00	2,16	1,19	0,01	NA
MYC (8q24)	39	19,00	15,31	0,29	NA	34,86	15,68	1	0,00	1,93	0,39	0,43	NA
CEP 8	84	14,52	12,62	1,14	0,00	44,07	15,80	0	NA	1,76	0,33	0,43	0,00
p16 (9p21)	66	5,38	7,67	0,03	0,24	60,47	17,98	2	0,00	1,43	0,27	0,76	NA
CEP 9	84	10,62	11,30	0,73	0,00	50,65	17,78	0	0,21	1,63	0,32	0,05	0,12
PTEN (10q23)	75	7,87	9,26	0,03	0,25	42,94	16,57	0	NA	1,67	0,26	0,01	0,57
CEP 10	93	6,71	7,42	0,06	0,06	52,04	14,63	0	0,00	1,51	0,25	0,08	NA
TK1 (17q25)	66	8,16	9,52	0,18	0,00	53,74	16,88	2	0,00	1,52	0,33	0,41	NA
20q13	84	21,91	19,32	1,12	0,00	34,19	14,80	0	NA	2,02	0,60	0,54	0,00
LPL/MYC	39	28,43	13,86	0,21	0,01	21,05	10,28	0	0,41	1,11	0,42	0,06	0,15
PTEN/CEP10	75	16,95	8,48	0,03	NA	20,21	11,14	0	0,03	0,99	0,12	0,06	NA
BRAF/CEP7	86	16,15	12,36	0,43	0,00	26,59	11,74	0	0,65	0,95	0,30	0,04	0,07
RREB1/CEP6*	51									1,55	0,81	0,26	0,00
LPL/CEP8*	34									1,14	0,20	0,82	NA
MYC/CEP8*	34									1,11	0,24	1,25	NA
p16/CEP9*	55									0,87	0,18	1,02	NA

Tabla 4. Conjunto de muestras de nevo en las secciones

Conjunto de muestra nevo										
SONDA	Número de muestras	Ave. % células con ganancia	DE % células con ganancia	Ave. % células con pérdida	DE % células con pérdida	Ave. % células con desequilibrio	DE % células con desequilibrio	Ave. relación	DE relación	
RREB1 (6p25)	81	8,2922	10,4349	44,1975	13,7617	52,4897	12,9371	1,6226	0,2536	
BRAF (7q34)	81	4,5268	6,5682	62,8395	15,4592	67,3663	13,6673	1,3554	0,2285	
20q13	81	10,7819	11,5413	43,9506	12,1548	54,7325	11,2776	1,6416	0,2811	
p16 (9p21)	81	5,4733	7,9461	52,9424	15,0422	58,4156	14,1321	1,4572	0,2653	
cualquier del p16 (9p21) del (1 señal/célula)	81	5,4733	7,9461	44,1358	13,0679	49,6090	12,7755	1,4572	0,2653	
p16 (9p21) del (0 señal/célula)	81	5,4733	7,9461	8,8066	6,3532	14,2798	9,1929	1,4572	0,2653	
RREB1/p16	81	34,8560	12,4058	23,5597	10,7230	58,4156	11,9777	1,1388	0,2304	
cualquier del BRAF/p16	80	24,1511	10,1229	33,0258	10,8556	57,1769	11,6528	0,9455	0,1836	
cualquier del 20q13/p16	80	24,1667	10,1258	33,0208	10,8600	57,1875	11,6458	1,1457	0,2547	
cualquier del RREB1/BRAF	81	39,6296	11,0649	18,5597	8,9704	58,1893	10,5548	1,2140	0,1848	
RREB1/20q	81	27,9424	10,1320	29,2387	9,4577	57,1811	11,3855	0,9997	0,1343	
BRAF/20q	79	18,8819	8,8301	39,1561	10,7048	58,0380	12,1063	0,8357	0,1200	
TK1 (17q25)	30	5,5412	5,0317	46,9534	9,7086	52,4946	10,0194	1,5283	0,1508	
CCND (11q13)	30	4,3226	5,5357	43,2903	11,8843	47,6129	12,5514	1,5704	0,1952	
GOX2 (1q23)	30	2,8817	2,8669	60,5771	10,0991	63,4568	9,3219	1,2926	0,1724	
CEP10	30	1,4444	2,5795	62,6165	12,7613	64,0609	12,1295	1,3353	0,1365	
cualquier del CEP10 del (1 señal/célula)	30	1,4444	2,5795	57,3154	14,4824	58,7599	13,6419	1,3353	0,1365	
CEP10 del (0 señales/célula)	30	1,4444	2,5795	5,3011	4,9629	6,7455	6,2607	1,3353	0,1365	
TK1/CEP10	30	36,1219	8,8908	21,2473	8,9356	57,3692	8,3119	1,1549	0,1575	
cualquier del CCND/CEP10	30	37,9068	11,4420	18,2652	10,4954	56,1720	10,2664	1,1874	0,1838	
cualquier del COX2/CEP10	30	28,9283	7,5494	31,0860	10,5999	60,0143	9,2432	0,9743	0,1356	

(continúa)

Conjunto de muestra nuevo										
SONDA	Número de muestras	Ave. % células con ganancia	DE % células con ganancia	Ave. % células con pérdida	DE % células con pérdida	Ave. % células con desequilibrio	DE % células con desequilibrio	Ave. relación	DE relación	
TK1/CCND	30	26,4588	9,5039	29,6846	8,5423	56,1434	9,4157	0,9863	0,1454	
TK1/COX2	30	39,6416,	7,8529	22,2616	7,5379	61,9032	7,4944	1,1995	0,1755	
CCND/COX2	30	39,1792	9,6529	20,3728	9,7491	59,5520	10,0786	1,2392	0,2647	
MYB (6q23)	13	10,8974	22,8989	26,0256	12,5377	36,9231	19,3631	1,8795	0,3941	
CEP 6	13	12,9487	20,0018	27,1795	11,8514	40,1282	14,5370	1,8795	0,3655	
MYB/CEP 6	13	18,3333	5,0000	17,5641	9,7329	35,8974	9,4432	0,9493	0,0561	

Tabla 5. Conjunto de muestra de melanoma en secciones

Todas las etapas		Nº de muestras	Ave. % células con páncrea	DE % células con páncrea	VD % variancia	p variancia	Seguranza p	Ave. % células con pérdida	DE % células con pérdida	VD % pérdida	p pérdida	Ave. % células anormales	DE % células anormales	VD % variancia	Valor discriminante p % Abnormal	% Abnormal	Ave. nº de copias focos o relaciones	DE nº de copias o relación	Nº de copia valor discriminante o relación	p relación	
SONIDA																					
PRRBT (6x25)		64	27.9759	10.4419	0.7480	0.0000	0.0000	30.0000	13.9998	0.3465	0.0000	63.7270	13.9998	0.0000	0.0001	0.0173	2.1230	0.6228	0.7444	0.0000	
BRRAF (6x4)		68	14.6958	14.6958	0.3710	0.0000	40.3100	18.9308	18.9308	0.3465	0.0000	63.7270	18.9308	0.0000	0.0000	0.0173	1.6700	0.4090	0.3600	0.0000	
20q13		64	22.1631	17.6966	0.2877	0.0000	35.1064	15.7543	15.7543	0.1976	0.0000	67.2696	12.4910	0.0000	0.0000	0.0173	1.9760	0.6376	0.2036	0.0000	
pr16 (6x21) cualquier del (1) (señalado)		64	8.7234	10.8706	0.0582	0.0241	66.3120	19.6776	19.6776	0.0185	0.3017	66.0656	14.2937	0.0000	0.0000	0.0173	1.4220	0.4224	0.0000	0.0000	
pr16 (6x21) del (1) (señalado)		64	8.7234	10.8706	0.0582	0.0241	42.6586	15.4392	15.4392	0.0053	0.4943	51.3930	12.0000	0.0000	0.0000	0.0173	1.4220	0.4224	0.0000	0.0000	
PRRBT (6x16) cualquier del (1) (señalado)		64	52.4468	17.9417	0.6593	0.0000	13.6925	13.6901	13.6901	0.1042	0.0026	22.3759	14.0797	0.0000	0.0000	0.0173	1.4220	0.4224	0.0000	0.0000	
BRRAF (6x16) cualquier del (1) (señalado)		64	37.7652	15.1677	0.3048	0.0000	15.9974	10.0203	10.0203	0.2081	0.0000	68.4942	14.0091	0.0000	0.0000	0.0173	1.7586	1.6457	0.1390	0.0000	
20q13 (6x21) cualquier del (1) (señalado)		68	37.9970	15.2243	0.4028	0.0000	27.1212	12.7375	12.7375	0.1246	0.0744	64.8964	11.7330	0.0000	0.0000	0.0173	1.4277	1.6232	0.0000	0.0000	
PRRBT (6x16) cualquier del (1) (señalado)		61	45.1648	16.5576	0.0841	0.0074	20.9993	12.7050	12.7050	0.1293	0.0910	64.8462	11.6997	0.0000	0.0000	0.0173	1.7361	2.8371	0.0430	0.0000	
BRRAF (6x16) cualquier del (1) (señalado)		60	37.3119	13.7811	0.3000	0.0000	19.4872	11.2089	11.2089	0.0442	0.5450	64.6530	12.2975	0.0000	0.0000	0.0173	1.1116	2.2606	0.0562	0.0000	
TK1 (17x25)		90	24.4815	11.9942	0.1413	0.0000	41.4444	13.5962	13.5962	0.0170	0.2222	66.9259	11.2711	0.0000	0.0000	0.0173	0.8771	0.2166	0.0279	0.0000	
CCND (11x13)		20	17.5009	17.1103	0.4591	0.0012	38.0326	13.6046	13.6046	0.4289	0.0010	53.9335	16.4147	0.0000	0.0000	0.0173	1.8934	2.8904	0.0554	0.0000	
CEP10 cualquier del (1) (señalado)		28	20.0029	26.4269	0.3372	0.0045	32.3322	16.6336	16.6336	0.3114	0.0043	52.3351	19.7410	0.0000	0.0000	0.0173	1.9925	3.1559	0.0679	0.0000	
CEP10 del (1) (señalado)		28	10.1183	12.6577	0.3196	0.0037	48.3324	13.7921	13.7921	0.5215	0.0003	50.3506	10.7742	0.0000	0.0000	0.0173	1.4004	2.0094	0.0679	0.0000	
CEP10 del (1) (señalado)		28	3.8433	5.6927	0.1513	0.0454	87.1083	12.6267	12.6267	0.027	0.1070	60.8516	10.7742	0.0000	0.0000	0.0173	1.6925	2.9406	0.0679	0.0000	
7K11CEP10 cualquier del (1) (señalado)		28	3.8433	5.6927	0.1513	0.0454	40.8174	11.7569	11.7569	0.1616	0.0943	63.6917	10.6974	0.0000	0.0000	0.0173	1.4004	2.0094	0.0679	0.0000	
CCND (11x13)		26	43.5921	14.4407	0.1929	0.0239	7.2899	8.3933	8.3933	0.0416	0.2821	11.1342	10.6974	0.0000	0.0000	0.0173	1.4004	2.0094	0.0679	0.0000	
CCND (11x13)		26	49.7993	10.2212	0.3034	0.0031	17.6182	8.7643	8.7643	0.0641	0.1242	64.1703	13.8827	0.0000	0.0000	0.0173	1.3550	0.3000	0.2270	0.0157	
CCND (11x13)		26	36.1775	12.3092	0.2217	0.0186	14.6285	7.6359	7.6359	0.0701	0.1678	64.8874	13.6175	0.0000	0.0000	0.0173	1.7550	1.5884	0.1393	0.0659	
TK1 (17x25)		26	20.4301	15.8824	0.0029	0.0000	24.6294	7.5994	7.5994	0.2694	0.0597	60.2673	12.2436	0.0000	0.0000	0.0173	1.4399	0.1974	0.8500	0.0004	
TK1 (17x25)		26	36.8700	15.5970	0.0252	0.0029	23.6192	22.2006	22.2006	0.0597	0.2028	60.2673	18.2001	0.0000	0.0000	0.0173	0.8720	0.3079	0.0012	0.0579	
CCND (11x13)		26	42.6956	11.8360	0.0546	0.0000	20.0000	12.4005	12.4005	0.0068	0.0181	60.4991	15.3093	0.0000	0.0000	0.0173	1.2017	0.3441	0.0000	0.0000	
MYB (6x23)		13	31.6906	34.3839	0.2464	0.0000	20.0000	12.0700	12.0700	0.0112	0.8840	63.8656	15.8539	0.0000	0.0000	0.0173	1.5917	1.4600	0.0000	0.0000	
CEP10		13	26.2386	33.9744	0.6970	0.0000	22.9886	14.4728	14.4728	0.0524	0.4177	48.1271	23.2914	0.0000	0.0000	0.0173	2.3313	0.8907	0.3229	0.0000	
MYB (6x23)		13	26.1928	33.6037	0.4615	0.0000	16.6786	12.8174	12.8174	0.0019	0.8781	45.6673	19.2473	0.0000	0.0000	0.0173	0.0262	0.1435	0.0043	0.0000	

Tabla 6.

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	Parámetro nº de sondas	Nº Muestras	Nº Muestras melanoma	SENS	SPEC vs norm	DFI vet norm
RREB1 (6p25)	r-ganancia o % ganancia	Parámetro sonda 1	SONDA 1	1	30	33	0.7273	0.9000	0.2005
RREB1 (6p25)	r-ganancia o % anormal	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	1	30	33	0.7879	0.8000	0.2915
RREB1 (6p25)	r-ganancia	r-ganancia	SONDA 3	1	30	33	0.7273	0.8967	0.3005
COX2 (1q31)	r-ganancia	r-ganancia	SONDA 4	1	30	33	0.7300	0.8333	0.3145
BRAF (7q34)	% ganancia	% ganancia	SONDA 4	1	81	93	0.6452	0.7160	0.4545
20q13	% ganancia	% ganancia	SONDA 4	1	81	94	0.6809	0.6667	0.4615
RREB1 (6p25)	r-ganancia o % anormal	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	2	30	33	0.8485	0.8700	0.1966
MYB(6q23)	r-ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	2	30	33	0.8485	0.8700	0.1966
CEP10	% pérdida (sin señales)	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	2	30	33	0.8182	0.8700	0.2235
RREB1 (6p25)	r-ganancia o % anormal	señales	SONDA 2	2	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
CEP10	% pérdida (sin señales)	r-ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.7879	0.8000	0.2915
MYB(6q23)	r-ganancia	% ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.7273	0.8667	0.3006
20q13	% ganancia	% ganancia	SONDA 2	2	81	94	0.7766	0.7776	0.3151
RREB1 (6p25)	r-ganancia	% ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.7273	0.8333	0.3196
CEP10	% pérdida (sin señales)	r-ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.8182	0.7333	0.3226
RREB1 (6p25)	r-ganancia	r-ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.8768	0.7000	0.3256
COX2 (1q31)	r-ganancia	% anormal (0 o >2)	SONDA 2	2	30	33	0.8182	0.7000	0.3509
MYB(6q23)	r-ganancia	señales	SONDA 2	2	30	33	0.7273	0.7667	0.3589
BRAF (7q34)	% ganancia	r-ganancia	SONDA 2	2	81	93	0.7312	0.7407	0.3735
MYB(6q23)	% ganancia	r-ganancia	SONDA 2	2	30	33	0.6970	0.7667	0.3825
MYB(6p25)	% ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	3	30	33	0.6500	0.8333	0.1669
MYB(6q23)/CEP 6	r-ganancia	r-ganancia o % ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.8182	0.9333	0.1937
BRAF (7q34)	r-ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	3	30	33	0.8182	0.9333	0.1937
20q13	r-ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	3	30	33	0.8182	0.9333	0.1937
RREB1 (6p25)	r-ganancia	% ganancia	SONDA 2	3	30	30	0.8333	0.9000	0.1944
MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	r-ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.8200	0.9000	0.2075
20q13	r-ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	3	30	33	0.7879	0.9000	0.2345
CCND (11q13)/CEP10	% ganancia	% ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7500	0.8700	0.2488
CEP10	% pérdida (sin señales) o % ganancia	% ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7870	0.8667	0.2505
20q13	r-ganancia	r-ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
BRAF (7q34)	r-ganancia o % ganancia	r-ganancia o % anormal	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
20q13	r-ganancia o % ganancia	r-ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
RREB1 (6p25)	r-ganancia	r-ganancia o % ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
RREB1 (6p25)	% ganancia	% ganancia	SONDA 2	3	30	30	0.8333	0.8000	0.2603
RREB1 (6p25)	r-ganancia	r-ganancia	SONDA 2	3	30	30	0.8333	0.8000	0.2603
CCND/CEP10 any del	r-ganancia o % anormal	r-ganancia	SONDA 2	4	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
BRAF (7q34)	r-ganancia	% pérdida (sin señales)	SONDA 2	4	30	33	0.7570	0.9000	0.2622
20q13	r-ganancia	% pérdida (sin señales)	SONDA 2	4	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
CEP10	% pérdida (sin señales)	r-ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
COX2 (1q31)	r-ganancia	señales	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
CEP10	% pérdida (sin señales)	r-ganancia	SONDA 2	3	30	33	0.7576	0.9000	0.2622

RREB1 (6p25)	r-ganancia	CEP10	%anormal (0 o > 2	CCND (11q13)	% ganancia	3	30	0.7576	0.9000	0.2622
RREB1 (6p25)	r-ganancia	COX2 (1q31)	señales)	RREB1 (6p25)	%anormal	3	30	0.7576	0.9000	0.2622
COX2(6p25)	% ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	3	30	0.7679	0.8333	0.2698
CCND/CEP10	% ganancia	CEP10	% pérdida (sin señales)	RREB1 (6p25)	r-ganancia	3	30	0.7576	0.9000	0.2622
COX2 (1q31)	% ganancia	CCND (11q13)	% ganancia	TK1 (17q25)	r-ganancia	3	30	0.6000	0.8000	0.2823
RREB1 (6p25)	% ganancia	COX2 (1q31)	% ganancia	CCND (11q13)	% ganancia	3	30	0.7667	0.8333	0.2867
CEP10	% pérdida (sin señales)	RREB1 (6p25)	r-ganancia	COX2 (1q31)	% ganancia	3	30	0.7273	0.8667	0.3030
MYB(6q23)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	CCND (11q13)	% ganancia	3	30	0.7273	0.8667	0.3030
COX2 (1q23)	%anormal (0 o > 2	RREB1 (6p25)	% ganancia	CCND (11q13)	% ganancia	3	30	0.7273	0.8667	0.3030
CEP10	señales	BRAF (7q34)	% ganancia	RREB1 (6p25)	% ganancia	3	30	0.6089	0.8148	0.3535
20q13	% ganancia									
MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.5001	0.9333	0.1127
MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	CCND (11q13)	% ganancia	4	30	0.8788	0.9667	0.1257
BRAF (7q34)	r-ganancia	CEP10	señales	RREB1 (6p25)	% ganancia	4	30	0.8788	0.9667	0.1257
BRAF (7q34)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	CEP10	%anormal (0 o > 2	4	30	0.8788	0.9000	0.1571
20q13	% ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	r-ganancia o %anormal	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	4	30	0.8788	0.9000	0.1571
20q13	r-ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	4	30	0.8485	0.9333	0.1655
20q13	r-ganancia	COX2 (1q31)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	4	30	0.8485	0.9000	0.1815
20q13	r-ganancia	COX2 (1q31)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.8182	0.9333	0.1937
20q13	% ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.8182	0.9333	0.1937
RREB1 (6p25)	% ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	RREB1 (6p25)	% ganancia	4	30	0.8333	0.9000	0.1944
BRAF (7q34)	r-ganancia	MYB(6q23)	r-ganancia	CCND (11q13)	% ganancia	4	30	0.8132	0.9000	0.2075
20q13	r-ganancia	MYB(6q23)	r-ganancia	CEP10 any del	% ganancia	4	30	0.8333	0.9667	0.2134
CCND/CEP10	r-ganancia	BRAF (7q34)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.9667	0.2147
CCND/CEP10	r-ganancia	20q13	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.9667	0.2147
BRAF (7q34)	r-ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	% ganancia	RREB1 (6p25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.9333	0.2224
BRAF (7q34)	r-ganancia o % ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	r-ganancia o %anormal	MYB(6q23)	r-ganancia	4	30	0.7879	0.9000	0.2345
20q13	r-ganancia o % ganancia	MYB(6q23)/CEP 6	r-ganancia o %anormal	RREB1 (6p25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.9000	0.2345
BRAF (7q34)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.9000	0.2345
20q13	r-ganancia	BRAF (7q34)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9667	0.2447
TK1/CEP10	r-ganancia	20q13	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia o %anormal	4	30	0.7576	0.9667	0.2447
TK1/CEP10	r-ganancia	20q13	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9667	0.2447
BRAF (7q34)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	% ganancia	CEP10	% ganancia	4	30	0.7879	0.8667	0.2505
BRAF (7q34)	r-ganancia	MYB(6q23)	r-ganancia	CEP10	% ganancia	4	30	0.7879	0.8667	0.2505
20q13	% ganancia	MYB(6q23)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7879	0.8667	0.2505
CCND/CEP10	r-ganancia o % ganancia	BRAF (7q34)	% pérdida (sin señales)	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
TK1 (17q25)	r-ganancia	CEP10	% pérdida (sin señales)	RREB1 (6p25)	r-ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
BRAF (7q34)	% ganancia	CEP10	% pérdida (sin señales)	RREB1 (6p25)	r-ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
CEP10	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	COX2 (1q31)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
20q13	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	CEP10	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
MYB(6q23)	% ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
CCND/CEP10 any del	r-ganancia	RREB1 (6p25)	%anormal o %ganancia	TK1 (17q25)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514
MYB(6q23)	r-ganancia	CEP10	%anormal	COX2 (1q31)	% ganancia	4	30	0.7576	0.9333	0.2514

3(6c23)/CEP 6	%ganancia	MYB(6c23)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	COND (11q13)	%ganancia	4	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
MYB(6c23)/CEP 6	%ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	COND (11q13)	%ganancia	4	30	33	0.7576	0.9333	0.2514
MYB(6c23)	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	COX2 (1q31)	r-ganancia	CEP10	(0 o >2	4	30	33	0.7576	0.9000	0.2622
COX2/CEP10	r-ganancia	COND(CEP10)	r-ganancia	CEP10	r-ganancia	RREB1 (6p25)	r-ganancia	4	30	33	0.7576	0.9000	0.2622

Tabla 7.

SONDA 1	SONDA 2	SONDA 3	SONDA 4	DESEQUILIBRIO SENS	DFI	PÉRDIDA SENS	DFI	GANANCIA SENS	DFI	AMPL SFNS	DFI
09p22				0.59	0.41	0.59	0.41	0.00	1.00	0.00	1.00
10q26.3				0.36	0.64	0.35	0.65	0.01	0.99	0.00	1.00
06p25				0.35	0.65	0.00	1.00	0.33	0.67	0.02	0.98
09q21.2				0.35	0.65	0.34	0.66	0.01	0.99	0.00	1.00
01q22				0.32	0.68	0.00	1.00	0.32	0.68	0.00	1.00
07p21				0.32	0.68	0.01	0.99	0.31	0.69	0.01	0.99
07q36				0.32	0.68	0.01	0.99	0.29	0.71	0.01	0.99
10p15				0.28	0.72	0.28	0.72	0.00	1.00	0.00	1.00
08p23.2				0.27	0.73	0.18	0.82	0.10	0.90	0.00	1.00
06q25.3				0.26	0.74	0.25	0.75	0.01	0.99	0.00	1.00
17q25	09p22			0.72	0.28						
09p22	06p25			0.70	0.30						
09p22	06q25.3			0.69	0.31						
09p22	01q22			0.69	0.31						
09p22	08p23.2			0.68	0.32						
09p22	07p21			0.68	0.32						
10q26.3	09p22			0.68	0.32						
09p22	07q36			0.68	0.32						
09p22	08q24.2			0.68	0.32						
20q13.3	09p22			0.66	0.34						
17q25	09p22	06p25		0.79	0.21						
17q25	09p22	08p23.2		0.78	0.22						
17q25	10q26.3	09p22		0.77	0.23						
17q25	09p22	08q24.2		0.77	0.23						
20q13.3	17q25	09p22		0.77	0.23						
09p22	08p23.2	06q25.3		0.76	0.24						
09p22	08p23.2	06p25		0.76	0.24						
09p22	07p21	06p25		0.76	0.24						
09p22	06p25	01q22		0.76	0.24						
17q25	09p22	06q25.3		0.76	0.24						

SONDA 1	SONDA 2	SONDA	3 SONDA 4	DESEQUILIBRIOSENS	DFI	PÉRDIDA SENS DFI	GANANCIA SENS DFI	AMPL SFNS	DFI
10cen	17q25	09p22	06p25	0.82	0.18				
17q25	10q26.3	09p22	06p25	0.82	0.18				
17q25	09p22	08p23.2	06p25	0.82	0.18				
20q13.3	17q25	09p22	08p23.2	0.82	0.18				
01cen	09p22	06q25.3	06p25	0.82	0.18				
06cen	17q25	10q26.3	09p22	0.82	0.18				
06cen	17q25	09p22	08p23.2	0.82	0.18				
06cen	09p22	08p23.2	01q22	0.82	0.18				
08cen	17q25	09p22	06p25	0.82	0.18				
10cen	06cen	17q25	09p22	0.82	0.18				

REALIZACIONES DE LA DESCRIPCIÓN

[0095]

- 5 1. Un método para detectar la presencia de células de melanoma en una muestra biológica de un paciente, comprendiendo el método:
- 10 a) poner en contacto la muestra con una combinación de al menos dos sondas, donde las sondas se seleccionan del grupo que consiste en una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 11q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 17q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 1q, y una sonda que se dirige a las regiones de cromosoma 20q;
- 15 b) incubar cada sonda del conjunto con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos en su cromosoma o región diana cromosómica para formar un complejo de hibridación estable;
- 20 c) detectar el patrón de hibridación de la combinación de sondas, en el que un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia o pérdida o desequilibrio en una región cromosómica específica por las sondas es indicativo de melanoma.
- 25 2. El método de la realización 1, en el que la combinación de al menos dos sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de 0,29 o menos.
- 30 3. El método de la realización 1, en el que la combinación de al menos dos sondas tiene un valor DFI de aproximadamente 0,20 o menos.
- 35 4. El método de la realización 1, en el que una de las sondas en la combinación de al menos dos sondas es una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25.
- 40 5. El método de la realización 4, en el que una segunda sonda en la combinación de al menos dos sondas se selecciona del grupo que consiste de una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la subregión 11q13, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23.
- 45 6. El método de la realización 1, en el que la combinación es una combinación de al menos tres sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la realización 1.
- 50 7. El procedimiento de la realización 6, en el que una de las tres sondas es una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25.
- 55 8. El método de la realización 7, en el que la combinación de al menos tres sondas tiene dos sondas seleccionadas de entre el grupo de dos sondas que consisten en:
- 60 a) una sonda de cromosoma 6q23 que se dirige a la subregión y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- b) una sonda que se dirige a 1q31 de la subregión de cromosoma y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- c) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 50 d) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- e) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- f) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 55 g) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13;
- h) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- i) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- 60 j) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13;
- k) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23;
- 65 l) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- m) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
- n) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10.

9. El método de la realización 6, en el que la combinación de al menos tres sondas tiene una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda que se dirige a las subregiones del cromosoma 17q25.
- 5 10. El método de la realización 1, en el que la combinación de sondas es una combinación de al menos cuatro sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la Realización 1.
11. El método de la realización 10, en el que una de las cuatro sondas es una sonda para la subregión de cromosoma 6p25.
- 10 12. El método de la realización 11, en el que además la combinación de cuatro sondas tiene tres sondas seleccionadas de entre el grupo de tres sondas que consisten en:
- 15 a) una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- b) una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- c) una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 20 d) una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- e) una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 25 f) una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- g) una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- h) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- 30 i) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- j) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 35 k) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- l) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- m) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 40 n) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- o) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 45 p) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
- q) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
- r) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 50 s) una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- t) una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 55 u) una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
- v) una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10.
- 60 13. El método de la realización 10, en el que la combinación de al menos cuatro sondas tiene una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6.
14. El método de la realización 1, en el que la muestra biológica es una biopsia de piel.
- 65 15. El método de la realización 14, en el que la muestra biológica es una muestra embebida en parafina fijada con

formalina.

16. El método de la realización 1, en el que las sondas se marcan con fluorescencia.

5 17. Un método para detectar la presencia o ausencia de células de melanoma en una muestra biológica de un paciente, comprendiendo el método:

10 a) poner en contacto la muestra con una combinación de al menos dos sondas, donde las sondas se seleccionan del grupo que consiste en una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, una sonda que se dirige a región de cromosoma 6q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 7q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 11q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 17q, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 1q, y una sonda que se dirige a las regiones de cromosoma 20q;

15 b) incubar cada sonda del conjunto con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos en su cromosoma o región diana cromosómica para formar un complejo de hibridación estable;

c) detectar y analizar el patrón de hibridación de la combinación de sondas para la presencia o ausencia de melanoma.

20 18. Una combinación de sondas que comprenden al menos dos sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la realización 1, en el que la combinación de sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de aproximadamente 0,29 para el melanoma.

25 19. La combinación de sondas de realización 18, en la que la combinación de sondas tiene un valor DFI de menos de aproximadamente 0,20.

20. La combinación de sondas de realización 18, en la que las dos sondas se seleccionan del grupo que consiste en:

30 a) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
b) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda para las subregiones de cromosoma 11q13; y
c) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda para las subregiones de cromosoma 6q23.

35 21. Una combinación de sondas que comprenden al menos tres sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la realización 1, en el que la combinación de sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de aproximadamente 0,29 para el melanoma.

22. La combinación de la realización 21, en la que las tres sondas se seleccionan del grupo de sondas que consiste en:

40 a) una sonda que se dirige a las subregiones del cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23 y una sonda enumeradora de cromosoma 6;

b) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;

45 c) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;

d) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;

e) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;

50 f) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;

g) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q3;

55 h) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;

i) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;

j) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;

60 k) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13;

l) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23;

65 m) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;

- n) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
 o) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10.

5 23. Una combinación de sondas que tiene cuatro sondas seleccionadas del grupo que se establece en la realización 1, en el que la combinación de sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de aproximadamente 0,29 para el melanoma.

10 24. La combinación de la realización 23, en el que las cuatro sondas se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) una sonda a subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 b) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
 15 c) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 d) una sonda para las subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
 20 e) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 f) una sonda para las subregiones de cromosoma 6p25, la sonda para la subregión de cromosoma 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 g) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
 25 h) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
 i) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
 30 j) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 k) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 35 l) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 m) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 n) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 40 o) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 p) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
 45 q) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
 r) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para el la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 s) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 50 t) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
 u) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
 55 v) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
 x) una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6.

60 25. Una combinación de dos sondas seleccionadas del grupo que consiste de una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 7q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 11q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 17q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 1q, y una sonda que se dirige a las regiones cromosómicas 20q.

65 26. Una combinación de tres sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la realización 25.

27. Una combinación de cuatro sondas seleccionadas del grupo que se establece en modo de realización 25.

28. Un kit que comprende una combinación de al menos dos sondas seleccionadas de entre el grupo expuesto en la realización 1, en el que la combinación de sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de aproximadamente 0,29 para el melanoma.

29. El kit de la forma de realización 28, en el que la combinación de sondas tiene un valor DFI de menos de aproximadamente 0,20.

30. El kit de la forma de realización 28, en el que las dos sondas se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- b) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda para subregiones de cromosoma 11q13; y
- c) una sonda para la subregión de cromosoma 6p25 y una sonda para subregiones de cromosoma 6q23.

31. Un kit que comprende una combinación de al menos tres sondas seleccionadas del grupo de sondas se establece en la realización 1.

32. El kit de la forma de realización 31, en el que las tres sondas se seleccionan del grupo de sondas que consiste en:

- a) una sonda que se dirige a las subregiones del cromosoma 6p25 una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23 y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- b) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- c) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- d) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- e) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- f) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- g) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13;
- h) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 1q31, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- i) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- j) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 17q25;
- k) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13;
- l) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23;
- m) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 11q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- n) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 7q34 y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
- o) una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6p25, una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 20q13 y una sonda enumeradora de cromosoma 10.

33. Un kit que comprende una combinación de al menos cuatro sondas seleccionadas del grupo de sondas establecido en la realización 1.

34. El kit de la forma de realización 33, en el que las cuatro sondas se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda enumeradora de cromosoma 6 y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- b) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- c) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- d) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y

- e) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25; una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- f) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, la sonda para la subregión de cromosoma 1q31, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 5 g) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- h) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- 10 i) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6;
- j) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- k) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 1q31, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 15 l) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- m) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- 20 n) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- o) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- p) una sonda para subregiones cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
- 25 q) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda para la subregión de cromosoma 11q13;
- r) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 30 s) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- t) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 20q13, y una sonda para la subregión de cromosoma 17q25;
- u) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, y una sonda enumeradora de cromosoma 10;
- 35 v) una sonda para subregiones de cromosoma 6p25, una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 10; y
- x) una sonda para la subregión de cromosoma 17q25, una sonda para la subregión de cromosoma 7q34, una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, y una sonda enumeradora de cromosoma 6.
- 40 35. Un kit que contiene un conjunto de la sonda para el diagnóstico de melanoma, en el que el conjunto de sondas es una combinación de dos sondas seleccionada del grupo de sondas que consta de una sonda enumeradora de cromosoma 6, una sonda enumeradora de cromosoma 10, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 6p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 7q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 11q, una sonda que se dirige a la región del cromosoma 17q, una sonda que se dirige a la región cromosómica 1q, y una sonda que se dirige a las regiones cromosómicas 20q.
- 45 36. Un kit que contiene un conjunto de sondas para el diagnóstico de melanoma, en el que el conjunto de sonda es una combinación de tres sondas seleccionadas del grupo de sondas establecido en modo de realización 35.
- 50 37. Un kit que contiene un conjunto de la sonda para el diagnóstico de melanoma, en el que el conjunto de sondas es una combinación de cuatro sondas seleccionadas del grupo de sondas establecidos en modo de realización 35.

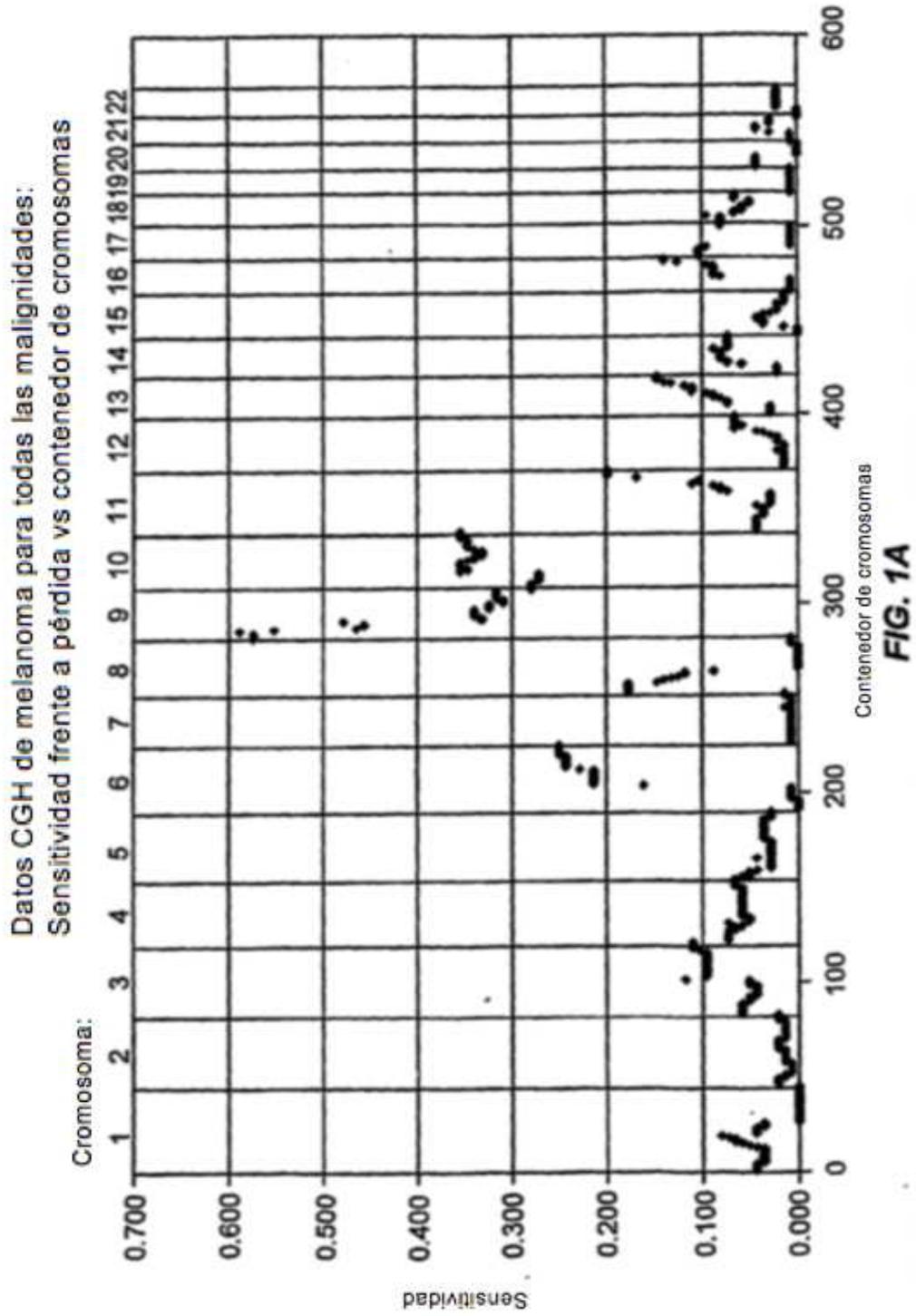
55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una combinación de sondas que comprende al menos cuatro sondas, en la que dicha combinación de sondas comprende una enumeradora de cromosoma 6, una sonda que se dirige a la región de cromosoma 6p, una sonda que se dirige a la región cromosómica 6q y una sonda que se dirige a la región del cromosoma 11q, en la que la combinación de al menos cuatro sondas tiene una diferencia de valor ideal (DFI) de menos de 0,29 para el melanoma, en el que DFI se calcula como $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$.
- 10 2. Un método para detectar la presencia de células de melanoma en una muestra biológica de un paciente, comprendiendo el método:
 - 15 a) contacto de la muestra con la combinación de sondas de la reivindicación 1;
 - b) incubar cada sonda de la combinación con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos en su cromosoma o región diana cromosómica para formar un complejo de hibridación estable; y
 - c) detectar el patrón de hibridación de la combinación de sondas, en el que un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia o pérdida o desequilibrio en una región cromosómica específica por las sondas es indicativo de melanoma.
- 20 3. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la sonda que se dirige a la región cromosómica 6p se dirige a la subregión de cromosoma 6p25.
- 25 4. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la sonda que se dirige a la región cromosómica 6q23 se dirige a la subregión de cromosoma 6q.
- 30 5. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la sonda que se dirige a la región cromosómica 11q se dirige a la subregión de cromosoma 11q13.
- 35 6. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la combinación de sondas comprende una sonda que se dirige a la subregión 11q13, y una sonda que se dirige a la subregión de cromosoma 6q23.
- 40 7. La combinación de sondas o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4, en el que la combinación de sondas comprende una sonda que se dirige a 6q23 de la subregión de cromosoma y una sonda enumeradora de cromosoma 6.
- 45 8. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que la combinación de sondas comprende una sonda para la subregión de cromosoma 6q23, una sonda para la subregión de cromosoma 11q13, y una sonda enumeradora de cromosoma 6.
- 50 9. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra biológica es una biopsia de piel, opcionalmente una muestra embebida en parafina fijada con formalina.
- 55 10. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que las sondas se marcan con fluorescencia.
- 60 11. La combinación de sondas de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que dicha combinación de sondas tiene cuatro sondas.
12. Un kit que comprende cualquiera de las combinaciones de sondas se establece en cualquiera de las reivindicaciones 1-11



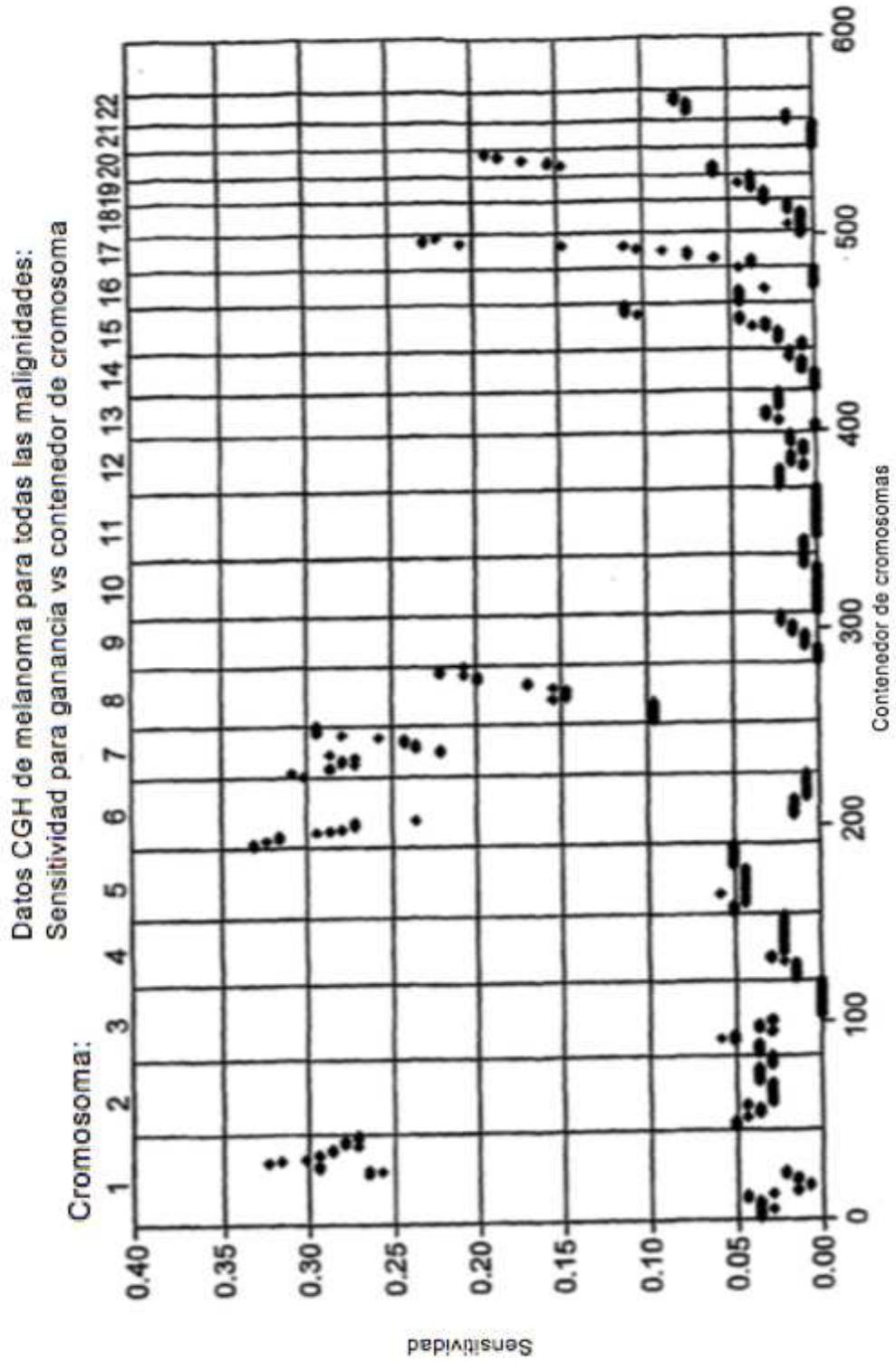


FIG. 1B

Datos CGH de melanoma para todas las malignidades: Sensibilidad para
amplificación vs contenedores de cromosoma

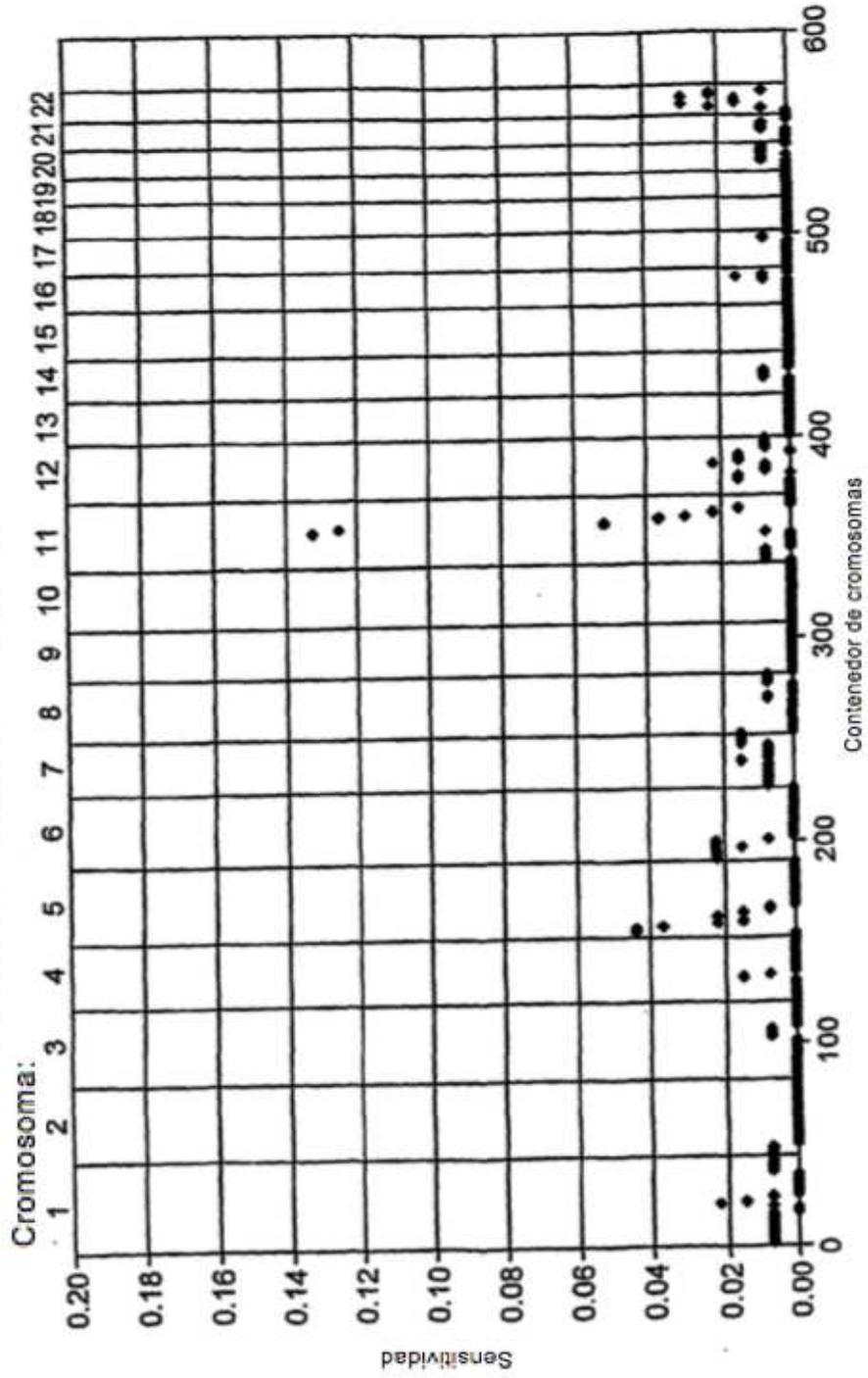
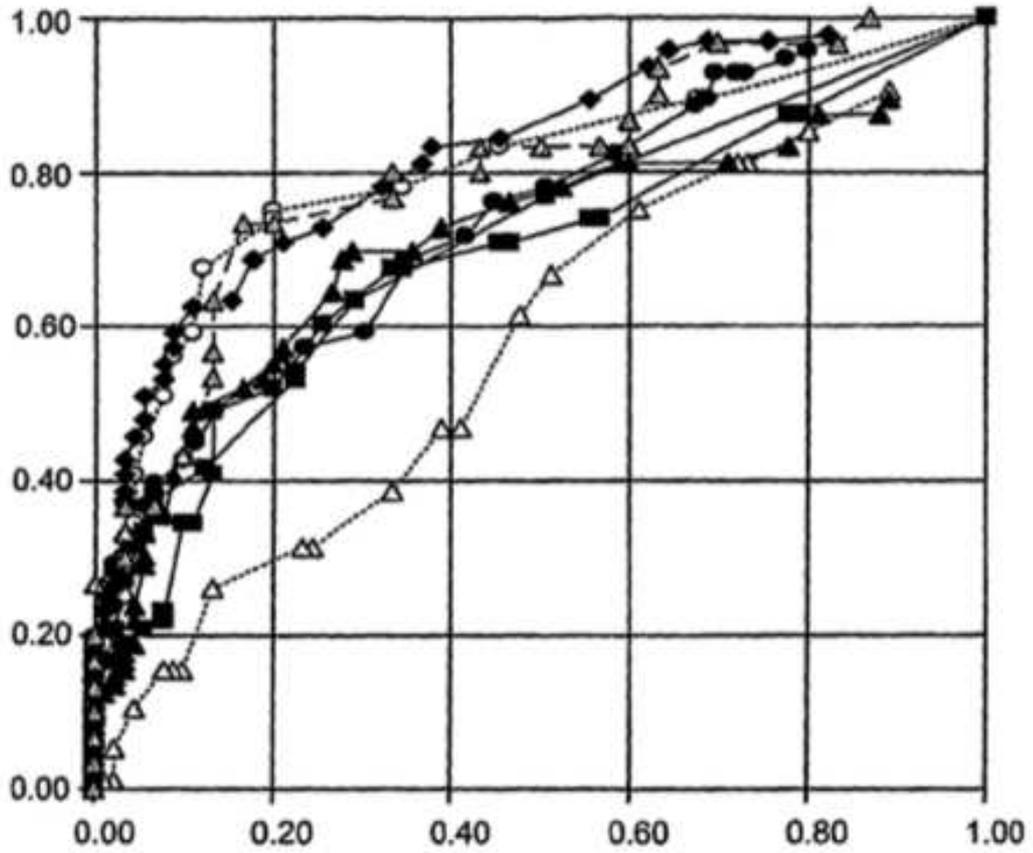


FIG. 1C

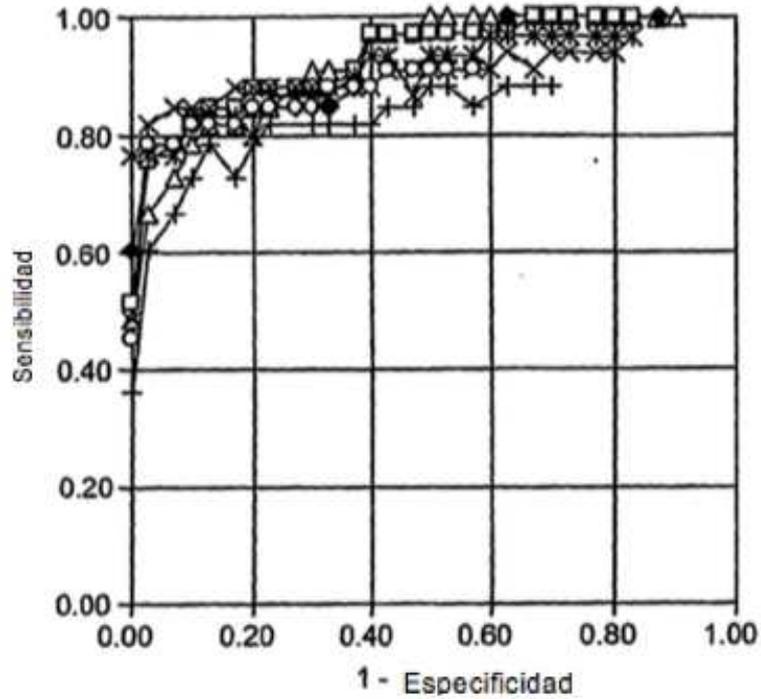
Curvas ROC para sondas únicas



- RREB ganancia
- ◆— RREB r-ganancia
- △-- RREB abnormal
- 20q ganancia
- ▲— 20q r-ganancia
- BRAF ganancia
- BRAF r-ganancia
- △— COX2 r-ganancia

FIG. 2A

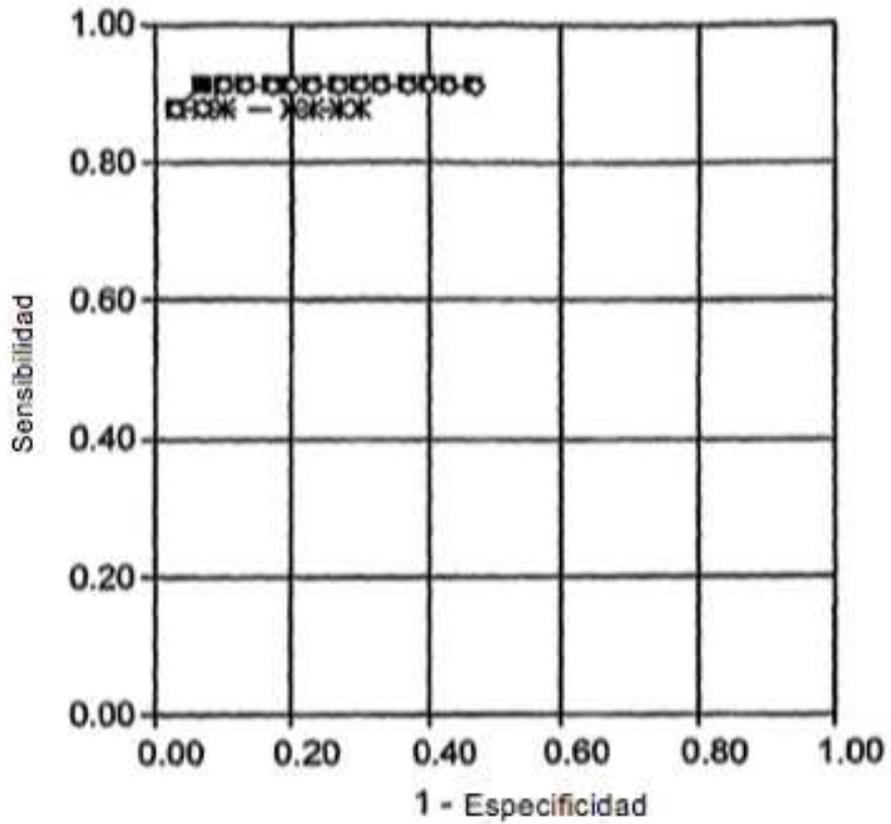
Curvas ROC para combinaciones de dos y tres sondas
 ROC (mejor sensibilidad a cada especificidad)



- x— Ganancia RREB o ganancia anormal + ganancia MYB/CEP6
- *— Ganancia RREB + ganancia COX2 + ganancia TK1
- o— Ganancia RREB + MYB r-ganancia + ganancia MYB/CEPS
- +— Ganancia RREB + ganancia CCND1/CEP10
- △— R-ganancia RREB + anormal + CEP 10 anormal
- R-ganancia RREB + ganancia + CCND1 anormal
- R-ganancia RREB + r-ganancia + MYB anormal

FIG. 2B

Curvas ROC para combinaciones de cuatro sondas.
ROC (mejor sensibilidad para cada especificidad)



- Ganancia RREB o ganancia + MYB/CEP6 anormal + ganancia TK1
- ◇--- RREB anormal + RREB r-ganancia + MYB/CEP 6 ganancia + ganancia CCND1
- *— Ganancia RREB + ganancia MYB/CEP6 r-ganancia MYB ganancia TK1

FIG. 2C