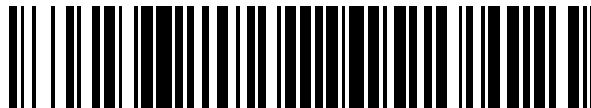


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 230**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/EP2012/068667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13041684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12766631 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2758544**

54 Título: **Materiales y métodos para pronóstico de evolución de esófago de Barrett**

30 Prioridad:

23.09.2011 US 201161538291 P

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM (100.0%)
TKs0-136 De Rode Luifel Meibergdreef 9
1105 AZ Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

KRISHNADATH, KAUSILIA KRISHNAWATIE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 650 230 T3

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

DESCRIPCIÓN

Materiales y métodos para pronóstico de evolución de esófago de Barrett

5 **Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con n.º 61/538.291, que se presentó el 23 de septiembre de 2011, y cuyos contenidos completos se incorporan por la presente por referencia.

10

Campo técnico

La presente divulgación se refiere al pronóstico de la evolución del esófago de Barrett, la determinación de anomalías genéticas, se hibridación *in situ*, así como a un conjunto de sondas y un kit útiles para el pronóstico del esófago de Barrett.

15

Antecedentes

El esófago de Barrett es una afección premaligna, metaplásica en la que el epitelio escamoso normal del esófago distal se reemplaza por mucosa columnar, que es similar al revestimiento del intestino. Este proceso se llama metaplasia intestinal. La afección se denomina de este modo por Norman Rupert Barrett, un cirujano al que le llamó la atención el "esófago corto" en un informe que publicó el mismo en 1950 (Barrett, Br. J. Surg. 38: 175-182 (1950); véase, también, la revisión de Shepherd, Esophagus 1: 17-29 (2003)).

20

Se sabe poco sobre los sucesos moleculares que afectan a la transformación del epitelio escamoso esofágico. El gen FHIT, que abarca el sitio frágil común FRA3B, según consta con frecuencia presenta delección en la metaplasia de Barrett y carcinomas esofágicos (Michael *et al.*, Oncogene 15 (14): 1653-1659 (Oct. 1997)). Se han observado aumentos de ADN en los cromosomas 2q, 3q, 7p, 17q, y 22q en el adenocarcinoma de Barrett primario metastásico (Walch *et al.*, Mod. Pathol. 13 (7): 814-824 (2000)). La amplificación de HER-2/*neu* se ha asociado según consta con una fuerte sobreexpresión del ARNm y una fuerte inmunotinción de HER-2/*neu* membranoso en el adenocarcinoma de Barrett y displasia de alto grado (Walch *et al.*, Lab. Invest. 81: 791-801 (2001)). Según consta, la amplificación del gen HER-2/*neu* predice una escasa supervivencia en el adenocarcinoma asociado al esófago de Barrett (Brien *et al.*, Human Pathol. 31 (1): 35-39 (enero de 2000)). Recientes estudios sugieren un papel patogénico para los genes *Cdx*, que pertenecen a la familia de genes de homeocaja de factores de transcripción y se sabe que median la diferenciación de células epiteliales intestinales. El gen *Cdx2* es expresado por células epiteliales en el intestino delgado y en el intestino grueso pero normalmente no en el esófago ni en el estómago. Silberg *et al.*, (Gastroenterology 122: 689-696 (2002)) según consta encontraron que podrían inducir una metaplasia intestinal en los estómagos de ratones forzando a las células epiteliales gástricas a expresar *Cdx2*. En un 100 % de muestras de ensayo de biopsia de metaplasia intestinal especializada de Barrett se ha encontrado inmunotinción de *Cdx2* (Phillips *et al.*, Am. J. Surg. Pathol. 27: 1442-1447 (2003)). Según consta, la pérdida y/o aneuploidía del locus p53 de los cromosomas 6, 7, 11, y 12 se detectó o se detectaron en un 95 % de los casos positivos para displasia/carcinoma mediante biopsia, mientras que según consta, la pérdida del locus p16 se observaba comúnmente en pacientes con y sin displasia/carcinoma (Fahmy *et al.*, Modern Pathol. 17: 588-596 (2004)). Según consta, se detectaron aumentos del número de copias de la secuencia de ADN para *SNRPN*, *GNLY*, *NME1*, *DDX15*, *ABCB1* (*MDR*), *ATM*, *LAMA3*, *MYBL2*, *ZNF217*, *TNFRSF6B*, *MSH2*, *TERC*, *SERPINE1*, *AFM137XA11*, *IGF1R*, and *PTPN1*, mientras que según consta se detectaron pérdidas del número de copias de la secuencia de ADN para *PDGFB*, *D17S125*, *AKT3*, *RASSF1*, *FHIT*, *CDKN2A* (p16), y *SAS* (*CDK4*) en el adenocarcinoma de Barrett (Albrecht *et al.*, The J. of Pathol. 203(3): 780-788 (julio de 2004)). Según consta la amplificación del cromosoma 4 se observó en tejidos de Barrett (Doak *et al.*, Experimental Molec. Pathol. 77 (1): 26-33 (agosto de 2004)). Como biomarcadores se identificaron sobreexpresión de la ciclina D1, C-erbB2(+), niveles elevados de poliposis Coli adenomatosa en plasma, sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2, y aumento de la tinción de E-cadherina para riesgos de estratificación para pacientes con esófago de Barrett (Kyrgidis *et al.*, J. Surgical Research 125(2): 189-212 (mayo de 2005)). Según consta, la amplificación de p53 confirmaba la displasia multifocal en todos los casos sometidos a ensayo, mientras que, según consta, la pérdida del cromosoma Y puede ser un marcador protector de displasia de alto grado en pacientes de sexo masculino (Cestari *et al.*, Cancer Letters 251 (2): 2278-287 (junio de 2007)). Según consta, la amplificación de p53 se observó en adenocarcinomas *in situ* y adenocarcinomas intramucosales (Ooi *et al.*, Pathol. Int'l 60 (6): 466-471 (junio de 2010)). Según consta, la pérdida de p16 puede ayudar a predecir la pérdida de displasia en pacientes con esófago de Barrett y displasia de alto grado/cáncer mucosal (Prasad *et al.*, Gastroenterology 135 (2): 379-379 (agosto de 2008)). Según consta, las matrices de polimorfismo de un solo nucleótido confirmaban alteraciones genómicas previamente descritas, por ejemplo, amplificación en 8q (*CMYC*) Y 20q13 o delección/pérdida de heterocigosis en 3p (*FHIT*) y 9p (*CDKN2A*), en adenocarcinomas esofágicos (Wiech *et al.*, Lab. Invest. 89: 385-397 (2009)).

55

60

65

A pesar de los numerosos estudios sobre biomarcadores potenciales que se han publicado, ninguno de los biomarcadores potenciales identificados hasta la fecha se ha evaluado en un estudio transversal de grupos de pacientes seleccionados con esófago de Barrett. Además, los análisis prospectivos en poblaciones base no

- seleccionadas, grandes carecen de evolución. Uno de los pocos marcadores de pronóstico, que, en estudios prospectivos de seguimiento, se ha asociado con la evolución del esófago de Barrett en la displasia de alto grado o adenocarcinoma esofágico es la aneuploidía/ aumento de fracciones de G2M (Reid *et al.*, Gastroenterology 102: 1212-1219 (1992); y Rabinovitch *et al.*, Am. J. Gastroenterol. 96: 3071-3083 (2001)). También se ha evaluado la sobreexpresión de la proteína p53, mutaciones genéticas y pérdida de heterocigosis de p53 (LOH) con respecto al pronóstico en el esófago de Barrett (Reid *et al.*, Am J. Gastroenterol. 96: 2839-2848 (2001); y Dolan *et al.*, J. Gastroenterol. Hepatology 18 (6): 683-9 (2003). Con esto dicho, en la actualidad las metodologías convencionales para detectar cambios de ploidía y anomalías del gen p53 no son factibles para ensayos clínicos de rutina.
- Los datos obtenidos en la Clínica Mayo para pacientes con exámenes endoscópicos 1976 y 1989 sugieren que el esófago de Barrett afecta a aproximadamente un 1 % de los adultos en Estados Unidos entre las edades de entre 80 y 89, el promedio de edad para desarrollar el esófago de Barrett es de 40 años, y el promedio de edad en un momento del diagnóstico es de 63 años (Cameron *et al.*, Gastroenterology 103: 1241-1245 (1992)). Los hombres se ven más afectados que las mujeres, y los hombres de raza blanca se ven más afectados que los hombres de otras razas.
- No hay síntomas asociados con el esófago de Barrett. Sin embargo, normalmente se encuentra en personas con enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD) (5-10 %; Kyrgidis *et al.*, (mayo de 2005), mencionado anteriormente). El esófago de Barrett es el factor de riesgo y lesión precursora más importante del adenocarcinoma esofágico, que es una neoplasia agresiva con una tasa de supervivencia global a cinco años inferior a un 20 %. La detección temprana y el tratamiento son fundamentales para la supervivencia. En vista de lo mencionado anteriormente, muchos médicos recomiendan que los adultos, que tengan una edad superior a 40 años y que hayan padecido GERD durante una serie de años, se sometan a una endoscopia del tracto gastrointestinal superior (GI) y a múltiples biopsias para comprobar el esófago de Barrett. También se recomienda que esos adultos, a los que se les haya diagnosticado esófago de Barrett, se sometan a endoscopia periódica del tracto GI superior y a múltiples biopsias para detectar la aparición de células precancerosas (displasia). La British Society of Gastroenterology recomienda que los adultos, a los que se les haya diagnosticado esófago de Barrett pero que no presenten ninguna displasia, se identifiquen sistemáticamente al menos cada dos años, mientras que los adultos con displasia de bajo grado se deberían identificar sistemáticamente cada seis meses, y los pacientes con displasia de alto grado se deberían someter a tratamiento e identificarse sistemáticamente cada tres meses. La American Society of Gastroenterology ha definido directrices similares.
- El esófago de Barrett con displasia de alto grado (HGD) o cáncer se pueden tratar usando técnicas endoscópicas o quirúrgicas. Las técnicas endoscópicas implican la destrucción del revestimiento de Barrett o la retirada de la parte del revestimiento de Barrett con displasia. La terapia fotodinámica (PDT), por ejemplo, implica inyectar un agente sensibilizante a la luz (por ejemplo, Fotofrina) en una vena de un paciente y, cuarenta y ocho horas más tarde, pasar una luz láser a través de un endoscopio para activar el agente sensibilizante a la luz y destruir el tejido de Barrett's en el esófago. La resección mucosal endoscópica (EMR) implica cualquiera de elevación del revestimiento de Barrett e inyección de una solución debajo del mismo o aplicar succión al revestimiento de Barrett y retirarlo mediante corte. A continuación el revestimiento se retira a través del endoscopio. La extirpación quirúrgica de la mayor parte del esófago se recomienda si una persona con esófago de Barrett tiene displasia grave o cáncer y puede tolerar un procedimiento quirúrgico.
- Aunque en la actualidad para la vigilancia del paciente con Barrett se recomienda endoscopia periódica del tracto GI superior y biopsias de 4 cuadrantes tomadas cada 1-2 cm de un esófago afectado y de cualquier lesión sospechosa. Y los resultados histológicos se consideran el patrón de oro para diagnosticar displasia esofágica y adenocarcinoma, aunque existen muchas limitaciones en las directrices para endoscopia y biopsia como lo recomienda el American College of Gastroenterology. Las limitaciones de este tipo incluyen visibilidad ilimitada de lesiones tempranas, reconocimiento endoscópico difícil de lesiones tempranas, toma de muestras limitada y errores En toma de muestras del área afectada, procedimientos frecuentes, y en ocasiones de duración larga para toma de biopsia, variabilidad inter- e intra-observadores, y una incapacidad para predecir la evolución del paciente de esófago de Barrett a carcinoma esofágico (Brankley *et al.*, J. Mol. Diagn. 8 (2): 260-267 (mayo de 2006)). En este sentido, es importante indicar que la evolución de esófago de Barrett a adenocarcinoma esofágico es un proceso de larga duración, gradual que puede llevar años, si no décadas, y una revisión reciente sistemática de aproximadamente 40 estudios sobre la evolución del esófago de Barrett mostraba que el cálculo global de la incidencia de cáncer en pacientes con esófago de Barrett es de un 0,61 %/año. En otras palabras, en una base anual, más de un 99 % de los pacientes con esófago de Barrett no desarrollarán adenocarcinoma esofágico. Por lo tanto, los métodos de vigilancia actuales no solamente son poco fiables, tampoco son rentables.
- Se han propuesto diversas técnicas endoscópicas adicionales para reconocer la neoplasia esofágica temprana. Las técnicas de este tipo incluyen cromoendoscopia (tinción mucosal con colorantes), endosonografía, tomografía de coherencia óptica, y espectroscopía usando métodos de detección con reflectancia, absorción, dispersión de luz, fluorescencia, y Raman (Canto *et al.*, Gastrointest. Endosc. 51: 561-568 (2000); Scotiniotis *et al.*, Gastrointest. Endosc. 54: 689-696 (2001); Kobayashi *et al.*, Gastrointest. Endosc. 47: 515-523 (1998); Georgakoudi *et al.*, Gastroenterology 120: 1620-1629 (2001); Kendall *et al.*, J. Pathol. 200: 602-609 (2003); y Conio *et al.*, Lancet Oncol. 6: 311-321 (2005)).

Además, como alternativas a la toma de muestras de biopsia aleatorias para la displasia en el esófago de Barrett se han propuesto marcadores moleculares del riesgo de cáncer. Los ejemplos incluyen expresión de *p53* y ciclina D1 (Skacel *et al.*, Am. J. Gastroenterol. 97: 2508-2513 (2002); y Bani-Hani *et al.*, J. Nat'l Cancer Inst. 92: 1316-1321 (2000)). Aunque los resultados de estudios preliminares son prometedores, ninguna de estas técnicas o marcadores han mostrado que proporcionen una información clínica suficiente para justificar el uso de rutina en vigilancia.

En vista de lo mencionado anteriormente, en la técnica existe una necesidad de un método objetivo y confiable Para pronosticar el desarrollo del adenocarcinoma esofágico en pacientes con esófago de Barrett. El método se pueden usar para clasificar pacientes con esófago de Barrett en grupos de riesgo bajo y alto para definir intervalos de vigilancia más rentables. Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un método que no presenta las desventajas de los métodos y disponibles en la actualidad, y materiales para su uso en el método. Este y otros objetos y ventajas, así como características de la invención, serán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

El documento WO 2006/089163 divulga una composición que comprende un conjunto de sondas cromosómicas, donde el conjunto de sondas cromosómicas es capaz de detectar de forma selectiva un carcinoma esofágico o lesión precursora en una muestra biológica, donde el conjunto comprende al menos tres sondas cromosómicas seleccionadas entre el grupo que consiste en una sonda específica del locus 8q24.12-13, una sonda específica del locus 7p12, una sonda específica del locus 17q11.2-12, una sonda específica del locus 20q13, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 9, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 7, una sonda específica del locus 5q21-22, una sonda específica del locus 5p15, una sonda específica del locus 17p13.1, una sonda de enumeración de cromosomas para el cromosoma 17, y una sonda específica del locus 9p21.

Sumario

La presente invención proporciona un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16 que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53 que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 17, y una sonda para Her2 que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, y donde el conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente.

La presente invención también proporciona un kit que consiste en:

- (a) un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16 que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53 que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda para el cromosoma 17, y una sonda para Her2 que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, y donde el conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente;
- (b) instrucciones para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente, donde las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17, y aumento de Her2; y opcionalmente
- (c) uno o más de un agente de bloqueo, una etiqueta, un agente de etiquetado, un reactivo para hibridación, un tampón, y una diseminación de la metafase. La muestra de células esofágicas se obtiene preferentemente con un método de citología con cepillo.

En el presente documento se divulga un método para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente. El método comprende detectar en una muestra de células de esófago del paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17. La presencia de al menos una anomalía indica que el esófago de Barrett probablemente evolucionará hacia adenocarcinoma esofágico. Preferentemente, al menos una anomalía es la pérdida de p16. Más preferentemente, al menos una anomalía es la pérdida de p16, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17. El método puede comprender adicionalmente detectar en la muestra de células de esófago del paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2. Preferentemente, la muestra de células esofágicas se obtiene con un método de citología con cepillo.

También se divulga un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende una sonda para p16 (pérdida), una sonda para p53 (pérdida), una sonda para el cromosoma 7 (aneuploidía), y una sonda para el cromosoma 17 (aneuploidía). El conjunto de sondas puede comprender al menos una sonda adicional. La al menos una sonda adicional se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una sonda para 20q (aumento), una sonda para c-myc (aumento), y una sonda para Her2 (aumento). Por lo tanto, el conjunto de sondas puede comprender una sonda para p16 (pérdida), una sonda para p53 (pérdida), una sonda para el cromosoma 7 (aneuploidía), una sonda para el cromosoma 17 (aneuploidía), una sonda para 20q (aumento), una sonda para c-myc (aumento), y una sonda para

Her2 (aumento).

También se divulga un kit. El kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente e instrucciones para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente. El conjunto de sondas comprende una sonda para p16, una sonda para p53, una sonda para el cromosoma 7, y una sonda para el cromosoma 17. Las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17. El conjunto de sondas puede comprender al menos una sonda adicional, y las instrucciones pueden comprender instrucciones adicionales. La al menos una sonda adicional se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una sonda para 20q, una sonda para C-myc, y una sonda para Her2. En una realización, la anomalía es pérdida de p16. En otra realización, la anomalía es p53. En otra realización, la anomalía es pérdida de p16, aumento del cromosoma 7, y aumento del cromosoma 17. En otra realización, la anomalía es pérdida de p16, pérdida de p53 y aumento del cromosoma 7. En otra realización, la anomalía es pérdida de p53, aumento del cromosoma 17, y aumento del cromosoma 7. En otra realización, la anomalía es pérdida de p16, pérdida de p53, aumento del cromosoma 17, and aumento del cromosoma 7. En una realización, la anomalía es aumento del cromosoma 7. En otra realización, la anomalía es aumento del cromosoma 17. En una realización, la anomalía es aumento del cromosoma 7 y aumento del cromosoma 17. Las instrucciones adicionales pueden comprender determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía adicional seleccionada entre el grupo que consiste en aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2.

Breve descripción de las figuras

La Fig 1 es un gráfico de la tasa acumulativa de supervivencia con respecto al seguimiento (meses), que muestra el uso de la curva de Kaplan Meier para representar los datos de seguimiento para la evolución del paciente con esófago de Barrett. La línea superior representa el grupo de 'marcador negativo', mientras que la línea inferior representa el grupo de 'marcador positivo'. Cada disminución en la línea inferior representa una evolución en el estadio de displasia. La diferencia en la evolución de los dos grupos en el tiempo es estadísticamente significativa (ensayo de rango logarítmico, valor de $p = 0,01$).

La Fig 2 es un gráfico de la tasa acumulativa de supervivencia sin evolución con respecto al seguimiento (meses), que muestra el uso de la curva de Kaplan Meier para representar los datos de seguimiento para la evolución del paciente con esófago de Barrett. La línea superior representa el grupo de 'marcador negativo', mientras que la línea inferior representa el grupo de 'marcador positivo'. Cada disminución en la línea inferior representa una evolución en el estadio de displasia. La diferencia en la evolución de los dos grupos en el tiempo es estadísticamente significativa (ensayo de rango logarítmico, valor de $p = 0,001$).

La Fig 3 es un gráfico del % de pacientes de BE con IM, IND, LGD, HGD, y EAC con aneuploidía (CEP7 y CEP 17), amplificación de Her2/neu, anomalías de C-myc, y anomalías de 20q, donde el número total de pacientes en cada grupo se muestra entre paréntesis ().

La Fig 4 es un gráfico del % de pacientes de BE con IM/IND, LGD, y HGD con aneuploidía (CEP7 y CEP 17), aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2, donde el número total de pacientes en cada grupo se muestra entre paréntesis ().

La Fig 5 es un gráfico de la sensibilidad con respecto a la especificidad de 1 (curva de ROC).

La Fig 6 es un gráfico del % de pacientes de BE con pérdida de p16 (9p21), pérdida de p53 (17p13.1), y aneuploidía (aneusomía de CEP7 y CEP 17) para IM de la población base de estudio e IM de la población base de validación.

La Fig 7a es un gráfico del porcentaje de supervivencia sin evolución con respecto a los meses para el grupo que dio positivo en el ensayo (ensayo pos) y para el grupo que dio negativo en el ensayo (ensayo neg) para anomalías de p53 con FISH.

La Fig 7b es un gráfico del porcentaje de supervivencia sin evolución con respecto a los meses para el grupo que dio positivo en el ensayo (ensayo pos) y para el grupo que dio negativo en el ensayo (ensayo neg) para anomalías de p53 con IHC.

La Fig 7c es un gráfico del porcentaje de supervivencia sin evolución con respecto a los meses para el grupo que dio positivo en el ensayo (ensayo pos) y para el grupo que dio negativo en el ensayo (ensayo neg) para anomalías de p53 con FISH+IHC.

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere, al menos en parte, a lo siguiente. Los conjuntos de sondas de FISH informativos se definieron basándose en la evaluación de diversos paneles de sondas de FISH de ADN que se usaron para detectar varias anomalías genéticas en muestras de ensayo de citología con cepillo de pacientes con esófago de Barrett en estudios exploratorios preclínicos (véase Rygiel *et al.*, Cancer 109 (10): 1980-1988 (2007); y Rygiel *et al.*, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17 (6): 1380-1385 (2008a)). Se consideró que un conjunto de sondas, que comprendía sondas de ADN para el cromosoma 9, cromosoma 17, cromosoma Y, región específica del locus p16 (9p21), y región específica del locus p53 (17p13.1), era 'potencialmente pronóstico' para el desarrollo de displasia (es decir, se encontraron con baja frecuencia en pacientes sin 'displasia' (ND) y con un aumento de la frecuencia en

pacientes con 'indefinida para displasia'/displasia de bajo grado' (IND/LGD) y 'displasia de alto grado'/adenocarcinoma esofágico' (HGD/EAC) (Rygiel *et al.*, (2007), mencionado anteriormente). Se consideró que es otro conjunto de sondas, que comprendía sondas de ADN para la región específica del locus Her2/neu (17q11.2), región específica del locus c-myc (8q24.12-13), región específica del locus EGFR (7p12), y la supuesta región oncogénica en 20q, era de 'diagnóstico' para detectar la displasia de alto grado o adenocarcinoma esofágico (es decir, los inventores encontraron una frecuencia elevada en pacientes con 'displasia de alto grado' y/o 'adenocarcinoma esofágico') (Rygiel *et al.*, (2008a), mencionado anteriormente). Los conjuntos se combinaron para crear una sonda de FISH 'potencialmente de pronóstico/diagnóstico' que comprendía sondas de ADN específicas para el cromosoma 7, cromosoma 17, región específica del locus p53 (17p13.1), región específica del locus p16 (9p21), región específica del locus Her-2 (17p11.2-12), y región específica del locus C-Myc (8q24.12). Un sistema automatizado, específicamente el sistema CytoVision SPOT AX (Applied Imaging, Newcastle, Reino Unido), se usó para puntuar los resultados de FISH en muestras de ensayo citológicas y posteriormente se validó mediante comparación de los resultados automatizados con puntuaciones normales (98 % de concordancia; $\kappa = 0,49-1$; véase Rygiel *et al.*, (2007), mencionado anteriormente). Entre 2002 y 2004, el ensayo de FISH automatizado se aplicó para evaluar toda la población base de Barrett del Academic Medical Center, Amsterdam, Países Bajos (AMC; N = 151) para los dos cromosomas y sondas específicas del locus (Rygiel *et al.*, (2007), mencionado anteriormente). Se realizó un seguimiento potencial a largo plazo y se describe en el presente documento.

Las sondas de FISH que parecía que se producían con una frecuencia más elevada en pacientes con esófago de Barrett y cualquiera de displasia de alto grado o adenocarcinoma esofágico se seleccionaron para evaluación en el pronóstico de la evolución de displasia a enfermedad invasiva o adenocarcinoma esofágico. Las muestras de ensayo citológicas de 99 pacientes (ND = 38; INF/LGD = 25; HGD = 22; y EAC = 16) se evaluaron usando sondas para el cromosoma 7 y las regiones específicas del locus Her2/Neu (17q11.2), EGFR (7p12), c-myc (8q24), y 20q13.2. Las amplificaciones de los locus no se observaron en pacientes con ND o IND/LGD. Al menos un locus se amplificó en un 14 % (3/22) de los pacientes con HGD y un 50 % (8/16) de los pacientes con EAC ($p = 0,015$). Este estudio confirmaba que estos locus tienen una alta especificidad (100 %), pero una sensibilidad relativamente baja (54 %; sin falsos positivos pero con un número considerable de falsos negativos), para identificar la presencia de HGD y/o EAC (Rygiel *et al.*, (2008a), mencionado anteriormente). Se desconocía si estos locus eran indicativos o no de la evolución a corto plazo de HGD a enfermedad invasiva o EAC.

Para mejorar la sensibilidad del conjunto de sondas de diagnóstico, también se evaluó la aneuploidía, ya que es uno de los pocos marcadores que se ha evaluado con respecto a la evolución del esófago de Barrett (Reid *et al.*, (1992), mencionado anteriormente; y Rabinovitch *et al.*, (2001), mencionado anteriormente). El estado de ploidía con FISH se evaluó usando sondas centroméricas específicas para los cromosomas 7 y 17. La aneuploidía se detectó en un 15 % (6/38) de pacientes con ND, un 27 % (5/19) de pacientes con IND/LGD, un 88 % (16/18) de pacientes con HGD, y un 86 % (13/15) de pacientes con EAC, y aumentaba de forma significativa con el estadio de displasia ($p < 0,001$). La aneuploidía determinada por FISH para los cromosomas 7 y 17 presentaba una alta sensibilidad (87 %) para detectar HGD y EAC y una alta especificidad (88 %).

La combinación de las sondas para las regiones específicas de los locus Her-2 (17q11.2), c-myc (8q24), y 20q13.2 con las sondas específicas para los cromosomas 7 y 17 (indican el estado de ploidía) proporcionó una sensibilidad de un 89 % para detectar HGD y/o EAC, mientras que la especificidad variaba entre un 87-100 % por marcador. Para comparación, el conjunto de cuatro sondas que consiste en Her-2/Neu (17q11.2), c-myc (8q24), 20q13.2, y p16 (9p21) (Brankley *et al.*, (Brankley, S.M., Wang, K.K., Harwood, A.R., Miller, D.V., Legator, M.S., Lutzke, L.S., Kipp, B.R., Morrison, L.E., y Halling, K.C. (2006). También se evaluó el desarrollo de un ensayo de hibridación *in situ* de fluorescencia para la detección de displasia y adenocarcinoma en el esófago de Barrett. *J. Mol. Diagn.* 8, 260-267. Brankley *et al.*, informaron de que el último conjunto de sondas presentaba una sensibilidad y especificidad, respectivamente, de un 84 % y de un 93 % para detectar HGD, y una sensibilidad y especificidad, respectivamente, de un 94 % y de un 93 % para detectar EAC. En el estudio de comparación, la sensibilidad y la especificidad, respectivamente, del conjunto de sondas de Brankley *et al.*, era de un 88 % y entre un 62 % y un 100 %.

Se realizó un análisis adicional del conjunto de sondas que comprende sondas para los cromosomas 9, 17, e Y y sondas específicas del locus para p16 (9p21) y p53 (7p13.1) para someter ensayo valor de potencialmente pronóstico. La sonda Her2/neu (17q11.2) se incluyó como una sonda de diagnóstico comparativa. Este conjunto de seis sondas se usó para identificar sistemáticamente una población base de 151 pacientes con esófago de Barrett en el e AMC usando el sistema automatizado de puntuación CytoVision SPOT AX. La pérdida de p53 (17p13.1) se produjo en un 5 % de ND, 9 % de IND/LGD, y en un 46 % de HGD ($p < 0,005$, ensayo exacto de Fisher). Se observaron aumentos del cromosoma 17 en un 6 % de ND, un 21 % de LGD, y un 62 % de HGD ($p < 0,05$). Se observó pérdida de p16 (9p21) en un 30 % de ND, un 20 % de IND/LGD, y un 46 % de HGD/EAC ($p < 0,05$). Un diez por ciento de ND presentaba pérdida del cromosoma Y, mientras que un 27 % de HGD presentaba pérdida del cromosoma Y ($p < 0,05$). La amplificación de Her2/neu (17q11.2) se detectó en un 62 % de HGD ($p < 0,001$). Basándose en estos resultados, se llegó a la conclusión de que la pérdida de p16 (9p21) y de p53 (17p13.1) y la polisomía de los cromosomas 17 y 7 se correlacionan con el aumento del grado de displasia en pacientes con esófago de Barrett, y que estas anomalías son potencialmente de pronóstico para la evolución del esófago de Barrett (Rygiel *et al.*, (2007), mencionado anteriormente).

Con el conjunto de cuatro sondas se identificó un total de 263 muestras de ensayo de citología con cepillo obtenidas a partir de la población base de Barrett de AMC. La población base incluía 197 pillados de casos de ND, 19 de casos de IND, 21 de casos de LGD y 19 de casos de HGD. Los resultados fueron como se muestra en la Tabla I.

5

Tabla I

Anomalía de FISH	N.º/N.º Total (%)			
	ND	IND	LGD	HGD
Pérdida de p16 (9p21)	74/197 (37)	5/19 (26)	9/21 (42)	7/19 (36)
Pérdida de p53 (17p13.1)	7/197 (3.5)	0	2/21 (9)	6/19 (31)
Pérdida de CEP 7	2/197 (1)	0	0	1/19 (5.2)
Pérdida de CEP 17	3/197 (1.5)	1/19 (5)	0	0
Tri- o tetrasomía de CEP 7	5/197 (2.5)	0	1/21 (9)	2/19 (15)
Tri- o tetrasomía de CEP 17	9/197 (5)	5/19(26)	4/21 (19)	11/19 (57)
Amplificación de Her2/neu (17q11.2)	0	0	0	12/19 (63)

En vista de lo mencionado anteriormente, se realizó un seguimiento potencial, a largo plazo, del valor de los marcadores mencionados anteriormente para pronosticar HGD y/o EAC. El estudio de seguimiento se describe en el presente documento en los Ejemplos 1 y 2.

10

Los siguientes términos son relevantes para la presente divulgación: "Aproximadamente" se refiere a una variación de aproximadamente +/-10 % del valor indicado. Se debe observar que una variación de este tipo siempre está incluida en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, tanto si se hace como sino se hace referencia al mismo.

15

El "esófago de Barrett" es una afección del esófago en la que el epitelio escamoso, estratificado, normal se sustituye con un tipo de epitelio columnar, premaligno, metaplásico, que incluye al tipo intestinal diferenciado de forma incompleta, el tipo cardiaco y el tipo cardiaco/oxíntico en el esófago distal.

20

"Biomarcador", como lo define el National Institutes of Health, es "una característica que se mide y se evalúa de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica".

25

La "muestra de ensayo de citología con cepillo" es una muestra de células obtenidas mediante cepillado de una superficie epitelial, por ejemplo, tracto gastrointestinal.

30

La "sonda de enumeración de cromosomas (CEP)" es cualquier sonda que permita la enumeración del número de cromosomas específicos en una célula. Por lo general una sonda de enumeración de cromosomas reconoce y se une a una región cerca de (denominada "peri-centromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, por lo general una secuencia de ADN repetitiva (por ejemplo, ADN de satélite alfa). Por lo general se considera que el centrómero de un cromosoma representa a ese cromosoma, ya que el centrómero es necesario para una segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica en particular se puede diferenciar de la pérdida o aumento de todo el cromosoma (aneusomía), en el que normalmente reside, por comparación del número de señales que corresponden al locus en particular (número de copias) con respecto al número de señales que corresponden al centrómero. Un método para realizar esta comparación es dividir el número de señales que representan al locus entre el número de señales que representan al centrómero. Las proporciones inferiores a uno indican una pérdida o delección relativas del locus, y las proporciones superiores a uno indican un aumento o amplificación relativos del locus. De forma análoga, entre dos locus diferentes en el mismo cromosoma se puede realizar una comparación, por ejemplo en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar aumentos o pérdidas desequilibrados dentro del cromosoma. En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, alguien con experiencia en la materia reconocerá que una sonda de brazo de cromosoma se puede usar como alternativa para aproximar la pérdida o aumento de todo el cromosoma. Sin embargo, las sondas de este tipo no son tan precisas como para enumerar cromosomas, ya que la pérdida de señales para las sondas de este tipo no siempre puede indicar una pérdida de todo el cromosoma. Los ejemplos de las sondas de enumeración de cromosomas incluyen las sondas CEP® disponibles en el mercado en Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

45

El "número de copias" es una medición del ADN, ya sea de un locus individual, uno o más locus, o un genoma completo. Un "número de copias" de dos es de "tipo silvestre" en un ser humano (debido a la diploidía, excepto para los cromosomas sexuales). Un "número de copias" de un número distinto a dos en un ser humano (excepto para los cromosomas sexuales) se desvía del tipo silvestre. Las desviaciones de este tipo incluyen amplificaciones, es decir,

50

5 aumentos del número de copias, y deleciones, es decir, disminuciones del número de copias e incluso ausencia de número de copias.

5 El "adenocarcinoma esofágico" es una neoplasia del esófago que surgen a partir de células de tipo columnar que están presentes en la unión del esófago y el estómago, o en el caso del esófago de Barrett en el esófago distal.

10 La "displasia de alto grado" o "HGD" (también; Neoplasia Intraepitelial de Alto Grado, 'HGIN') es una clasificación histológica de un estadio de una expansión más avanzada de células epiteliales inmaduras, en este contexto el esófago de Barrett, con atipia severa de núcleos y células y arquitectura tisular alterada, en la mayoría de los casos con una disminución correspondiente del número y situación de células maduras. A menudo la HGD es indicativo de que la presencia de un proceso neoclásico temprano o inicial (< 1 año) puede conducir a un proceso neoclásico, es decir, adenocarcinoma esofágico.

15 "Indefinido para displasia" o "IND" es una afección en la que existe una incertidumbre con respecto a estos cambios observados en el tejido se deben a displasia se deben a factores de confusión tales como inflamación o esofagitis causada por reflujo de ácido biliar y ácido.

20 En el presente documento "etiquetado", "etiquetado con una etiqueta detectable", y "etiquetado de forma detectable" se usan indistintamente para indicar que una entidad (por ejemplo, una sonda) se puede detectar. "Etiqueta" y "etiqueta detectable" hacen referencia a un resto unido a una entidad para hacer que la entidad sea detectable, tal como un resto unido a una sonda para hacer que la sonda sea detectable después de su unión a una secuencia diana. El resto, por sí mismo, puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable después de su reacción con otro resto adicional. El uso de la expresión "etiquetado de forma detectable" pretende incluir un etiquetado de este tipo. La etiqueta detectable se puede seleccionar de modo que la etiqueta genere una señal, que se puede medir y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de entidad unida. Se conoce bien una amplia diversidad de sistemas para etiquetado y/o detección de moléculas, tales como ácidos nucleicos, por ejemplo, sondas. Los ácidos nucleicos etiquetados se pueden preparar mediante incorporación o conjugación a una etiqueta que se puede detectar de forma directa o indirecta con medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, partículas magnéticas, partículas de densidad electrónica, etiquetas de masa, etiquetas de espín, haptenos, y similares. En el presente documento son preferentes los agentes fluoróforos y quimioluminiscentes.

35 "Son específica del locus" se refiere a una sonda que se une de forma selectiva a un locus específico en una región en un cromosoma, por ejemplo, un locus de que se ha determinado que experimenta aumento/pérdida en la metástasis. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes o no codificantes, incluyendo exones, intrones, y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.

40 "Displasia de bajo grado" o "LGD" (también: LGIN, Neoplasia Intraepitelial de Bajo Grado) es una expansión de células inmaduras con una disminución correspondiente en el número y ubicación de las células maduras y atipia de la célula que puede conducir a un desarrollo de HGD o a la transformación en adenocarcinoma esofágico. La LDG es un estadio preneoplásico que presenta un riesgo de evolucionar a adenocarcinoma, que se encuentra entre el de ND y HGD.

45 "Negativo para displasia" o "ND" se refiere a que no existen cambios atípicos/displásicos en las células, es decir, en el contexto de la presente divulgación no hay cambios atípicos en la región del esófago de Barrett.

50 "Muestra de ácido nucleico" se refiere a una muestra que comprende ácido nucleico en una forma adecuada para su hibridación con una sonda, tal como una muestra que comprende núcleos o ácidos nucleicos aislados o purificados de tales núcleos. La muestra de ácido nucleico puede comprender ADN genómico total o parcial (por ejemplo, cromosoma(s) en particular), ARNm total o parcial (por ejemplo, cromosoma(s) o gen(es) en particular), o secuencia(s) seleccionada(s). Los cromosomas condensados (tal como están presentes en interfase o metafase) son adecuados para su uso como dianas en hibridación *in situ*, tal como FISH.

55 "Punto de corte determinado previamente" y "nivel determinado previamente" por lo general se refieren a un valor de punto de corte que se usa para evaluar los resultados de la eficacia del diagnóstico/pronóstico/terapéuticos mediante comparación de los resultados del ensayo frente al punto de corte/nivel determinado previamente, donde el punto de corte/nivel determinado previamente ya se ha relacionado o asociado con diversos parámetros clínicos (por ejemplo, gravedad de la enfermedad, evolución/no evolución/mejora, etc.).

60 "Sonda" en el contexto de la presente divulgación, es un oligonucleótido o polinucleótido que se puede hibridar de forma selectiva al menos a una parte de una secuencia diana en condiciones que permiten o que promueven la hibridación selectiva. En general, una sonda puede ser complementaria a la hebra de ADN codificante o sentido (+) o complementaria a la hebra de ADN no codificante o antisentido (-) (denominada en ocasiones "complementaria inversa"). La longitud de las sondas puede variar de forma significativa. Puede ser preferente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, tal como de 15 a aproximadamente 75 nucleótidos, por

ejemplo, de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos.

"Pronóstico de la evolución del esófago de Barrett" se usa en el presente documento para hacer referencia al pronóstico de la evolución del esófago de Barrett desde un estadio a otro estadio, tal como de no displasia a displasia de bajo grado, displasia de bajo grado a displasia de alto grado, o displasia de alto grado a adenocarcinoma esofágico, y similares.

En el contexto de la presente divulgación, "hibridarse de forma selectiva a" (así como "hibridación selectiva", "hibridarse de forma específica a" e "liquidación específica"), se refiere a la unión, formación de híbridos, o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos en particular en condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente a su secuencia diana, y en menor medida a, o en absoluto a, otras secuencias no diana. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosa" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (por ejemplo, como en una matriz, hibridación de Southern, hibridación de Northern, o FISH) dependen de la secuencia, y el diferencial en diferentes condiciones. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular, Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, C. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, NY (1993) ("Tijssen"). Generalmente, la hibridación y las condiciones de lavado de alta rigurosidad se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C menores 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 (para una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para que sean iguales a la T_m para una sonda en particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios, que tienen más de 100 restos complementarios, en una matriz o en un filtro en una transferencia de Southern o Northern es de 42 °C usando soluciones de hibridación convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (2001)).

"Secuencia diana", "región diana", y "diana de ácido nucleico" hacen referencia a una secuencia de nucleótidos que reside en una ubicación cromosómica específica cuya pérdida y/o aumento, por ejemplo, se está determinando.

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones en particular y no pretende ser limitante de otro modo.

La detección de biomarcadores se puede usar como indicadores de evolución del esófago de Barrett a adenocarcinoma esofágico, es decir, como biomarcadores de pronóstico, y como indicadores del estadio de la neoplasia temprana o avanzada, es decir, como biomarcadores de diagnóstico. La evolución del esófago de Barrett a adenocarcinoma esofágico está asociada con la aparición de varios cambios genéticos.

Métodos para pronosticar la evolución del esófago de Barrett

En el presente documento divulga un método para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente. El método comprende detectar en una muestra de células de esófago del paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, y aneuploidía del cromosoma 7 y aneuploidía del cromosoma 17. La presencia de al menos p16 o pérdida de p53 o aneuploidía tanto para 7 como para 17 indica que el esófago de Barrett probablemente evolucionará hacia LGD, HGD o adenocarcinoma esofágico. Preferentemente, al menos una anomalía es la pérdida de p16. Más preferentemente, al menos una anomalía es la pérdida de p16, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17. El método puede comprender adicionalmente la detección en la muestra de células de esófago del paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2. En este sentido, el aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2 pueden ser diagnóstico de HGD.

La muestra de células esofágicas se puede obtener mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, la muestra de células esofágicas se obtiene con un método de citología con cepillo. El uso de muestras de ensayo de citología con cepillo permite el uso de un sistema automatizado, tal como el sistema CytoVision SPOT AX, para evaluación de anomalías.

El método mencionado anteriormente se puede realizar usando cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, el método mencionado anteriormente se realiza usando hibridación *in situ*, tal como hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Preferentemente, cada sonda se etiqueta de forma detectable con una etiqueta distinta, tal como un fluoróforo distinto.

Cuando los métodos mencionados anteriormente se realizan mediante hibridación *in situ*, en la que cada sonda se etiqueta de forma detectable con una etiqueta distinta, tal como mediante FISH, en el que cada sonda se etiqueta con un fluoróforo distinto, los métodos se realizan por lo general en una muestra de células esofágicas, que están recién preparadas (las células recién preparadas se pueden cultivar durante 1-3 días y se puede añadir un agente de bloqueo, tal como Colcemid, al cultivo para bloquear las células en metafase, durante lo cual los cromosomas están altamente condensados y se pueden visualizar), congeladas, o fijadas (por ejemplo, fijadas en citoconservante,

formalina y embebidas en parafina), tratadas (por ejemplo, con Rnasa y pepsina) para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN) y para reducir la unión no específica, y a continuación se someten a hibridación con una o más sondas, lavando para retirar cualquier sonda no unida, y detección de sondas hibridadas. Por ejemplo, una suspensión celular se puede aplicar como una sola capa sobre un portaobjetos, y la densidad celular se puede medir con un microscopio de luz o de contraste de fases. Una sección (con un espesor de aproximadamente 5 µm) de una muestra embebida en parafina, fijada con formalina de células esofágicas se puede montar en un portaobjetos, tal como un portaobjetos cargado de forma positiva SuperFrost Plus (disponible en ThermoShandon, Pittsburgh, PA), calentado a 56 °C durante una noche, desparafinado, sumergido en 1 x de solución salina de citrato sódico, pH 6,3, a 80 °C durante 35 minutos, y lavado en agua durante tres minutos. Después de digestión de proteasa (4 mg de pepsina/ml y HCl 0,2 N) a 37 °C durante 15 minutos, la sección se puede aclarar en agua durante tres minutos, se puede pasar a través de etanol de calidad, se puede secar. Preferentemente, la hibridación con una o más sondas como se ha descrito anteriormente se realiza a 37 °C durante 16-18 horas en un horno de co-desnaturalización automatizado (Sistema de Desnaturalización/Hibridación HYBrite o ThermoBrite, Abbot Molecular, Inc., Des Plaines, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (los métodos de este tipo por lo general implican la desnaturalización de sondas y ácidos nucleicos diana). Después de la hibridación, la sección se coloca preferentemente en tampón de lavado (2 x de solución salina de citrato sódico / NP40 al 0,3 %; disponible en Abbott Molecular, Inc.) a temperatura ambiente durante 2-10 minutos para retirar encubre objetos y a continuación se sumerge en tampón de lavado a 73 °C durante dos minutos, se seca, y se monta con una solución anti-turbidez I de hidrato de diclorhidrato de 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Abbott Molecular, Inc.). Preferentemente, el portaobjetos se analiza con un microscopio de epi-fluorescencia equipado con filtros de paso de banda individual (Abbott Molecular, Inc.).

Antes de su detección, las muestras de células se pueden previamente opcionalmente basándose en anomalías citológicas aparentes. La selección previa identifica células sospechosas, permitiendo de este modo que la identificación sistemática se centre en esas células. En otra realización, la selección previa puede proporcionar la exclusión de las células escamosas de las muestras de ensayo. Durante la selección previa, las células de una muestra biológica se pueden colocar en un portaobjetos de microscopio y se pueden escanear visualmente en busca de anomalías citológicas asociadas comúnmente a células displásicas y neoplásicas. Las anomalías de este tipo incluyen anomalías en el tamaño nuclear, forma nuclear y tinción nuclear, tal como se evalúa mediante contratinción de núcleos con tintes o colorantes de ácido nucleico tales como yoduro de propidio o diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) usualmente después de la hibridación de sondas para sus ADN diana. Por lo general, las células neoplásicas albergan núcleos que están agrandados, tienen una forma irregular, y/o muestran un patrón de tinción moteado. El yoduro de propidio, usado por lo general a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante específico de ADN fluorescente rojo que se puede observar a una longitud de onda de pico de emisión de 614 nm. El DAPI, usado por lo general en una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, es una tinción específica de ADN fluorescente azul que se puede observar a una longitud de onda de pico de emisión de 452 nm con un filtro DAPI a bajo aumento. En este caso, solo las células seleccionadas previamente para detección se someten a recuento de pérdidas y/o aumentos cromosómicos. En una realización, las células seleccionadas previamente en el orden de al menos 20, en otra realización, al menos 30-40, en número se eligen para evaluar las pérdidas y/o aumentos cromosómicos.

Como alternativa, un área que evidencia cierto nivel de displasia o una lesión sospechosa se puede localizar usando el filtro de DAPI a bajo aumento y se puede inspeccionar minuciosamente la presencia de núcleos que albergan números anómalos de copias de cualquier sonda. En una célula normal, se detectarán dos copias de una sonda determinada. En una célula anómala, se detectarán más o menos copias de una sonda determinada. Las áreas con los cambios de número de copias más significativos se seleccionan preferentemente seleccionadas para Su recuento. Siempre que sea posible, se seleccionan tres áreas anómalas y, dentro de cada área anómala, se analizan 10 núcleos aleatorios a alta potencia (objetivo de 64 x o 100 x). Preferentemente, los núcleos no se solapan y albergan señales suficientemente brillantes.

Como alternativa, las células para detección se pueden elegir independientemente entre características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células no superpuestas en un área o áreas determinadas en un portaobjetos de microscopio se pueden evaluar para pérdidas y/o aumentos cromosómicos. Como un ejemplo más, se pueden elegir células en el portaobjetos, por ejemplo, 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 para evaluar las pérdidas y/o aumentos cromosómicos.

Se hace el recuento de las copias de al menos uno de p16, p53, cromosoma 7, y cromosoma 17. Preferentemente, se hace el recuento de al menos el número de copias de p16. Más preferentemente, se hace el recuento del número de copias de p16, cromosoma 7, y cromosoma 17. Además se hace el recuento de las copias de al menos uno de 20q, C-myc, y Her2. El número de copias se puede comparar con un punto o puntos de corte determinados previamente. La pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17 indican que el esófago de Barrett probablemente evolucionará hacia adenocarcinoma esofágico. Además, el aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2 indican que el esófago de Barrett probablemente evolucionará hacia adenocarcinoma esofágico.

Por lo tanto, los métodos de este tipo comprenden poner en contacto una muestra del esófago de Barrett de un paciente, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico, con al menos una sonda que se une de forma selectiva a una secuencia de ácido nucleico diana (es decir, al menos uno de p16, p53, cromosoma 7, y cromosoma 17, tal como al menos p16, solo o en combinación adicional con el cromosoma 7 y el cromosoma 17, donde una combinación de este tipo puede incluir adicionalmente al menos uno de 20q, C-myc, y Her2) en condiciones que permitan (o que estimulen) la unión de la sonda de forma selectiva con su secuencia de ácido nucleico diana y formar un complejo de hibridación estable. Los métodos de este tipo comprenden adicionalmente detectar la formación del complejo de hibridación y el recuento del número de complejos de hibridación. En vista del número de complejos de hibridación que comprenden p16, p53, cromosoma 7, cromosoma 17, 20q, C-myc, y/o Her2, el método comprende adicionalmente determinar el número de copias de p16, p53, cromosoma 7, cromosoma 17, 20q, C-myc, y/o Her2. El número de copias se puede comparar con un punto de corte determinado previamente, donde un número de copias mayor que el punto de corte determinado previamente (es decir, para un aumento) y un número de copias menos que el punto de corte determinado previamente (es decir, para una pérdida), si fuera apropiado, indica que probablemente se producirá la evolución del esófago de Barrett. En una realización, el punto de corte se determina en los recuentos del número de copias encontrados en células epiteliales escamosas normales.

Se pueden usar otros métodos ya conocidos en la técnica o que están en desarrollo en la actualidad. Los métodos de este tipo pueden necesitar el uso de una muestra del esófago de Barrett que es distinto a una sección del esófago de Barrett que se fija en formalina y se embebe en parafina, por ejemplo, una sección recién preparada o congelada del esófago de Barrett, células homogeneizadas del esófago de Barrett, células lisadas del esófago de Barrett, o ácidos nucleicos aislados o purificados (por ejemplo, una "muestra de ácido nucleico" tal como ADN) del esófago de Barrett ("muestra del esófago de Barrett" como se usa en el presente documento pretende incluir todas las formas de una muestra del esófago de Barrett que permiten la determinación del número de copias y aumento/pérdida). En este sentido, se puede usar una preparación táctil (una monocapa de células obtenidas presionando tejido recién preparado o congelado contra un portaobjetos) preparada a partir de una muestra sin cultivar del esófago de Barrett (véase, por ejemplo, Kallioniemi *et al.*, Cytogenet. Cell Genet. 60: 190-193 (1992)). Las preparaciones táctiles contienen nucleico intacto y no experimentan el artefacto de truncamiento de la sección. Las monocapas de células en una preparación táctil se puede fijar, por ejemplo, en alcohol, tal como etanol, o solución alcohólica, tal como metanol:ácido acético al 3:1. Los núcleos también se pueden extraer de secciones gruesas de muestras de ensayo embebidas en parafina para reducir artefactos de truncamiento y eliminar material embebido extraño. Por lo general, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se cosechan y se procesan antes de su hibridación usando métodos convencionales conocidos en la técnica. El procesamiento de este tipo por lo general incluye tratamiento de proteasa y fijación adicional en una solución de aldehído, tal como formaldehído.

Los ejemplos de métodos que se pueden usar en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR), Q-PCR en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA), escaneo densitométrico de productos de PCR, PCR digital, opcionalmente con amplificación previa del gen o genes y/o región o regiones cromosómicas para el/los que se va a determinar el número o números de copias (véase, por ejemplo, Vogelstein *et al.*, PNAS USA 96: 9236-9241 (1999); Pub. de Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 2005/0252773; y Pub. de Sol. de Pat. de Estados Unidos N.º 2009/0069194), hibridación genómica comparativa (CGH; véase, por ejemplo, Kallioniemi *et al.*, Science 258: 818-821 (1992); y Pub. de Sol. de Pat. Internacional WO 93/18186), análisis de alelotipos de microsatélite o Southern, transferencias puntuales, matrices, micromatrices (Carter, Nature Genetics Supplement 39: S16-S21 (julio de 2007)), e hibridación de sondas amplificables múltiplex (MAPH), hibridación de sondas dependiente de ligamiento múltiplex (MLPA; véase, por ejemplo, Schouten *et al.*, Nucleic Acids Res. 30: e 57 (2002)), cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (dHPLC; Kumar *et al.*, J. Biochem. Biophys. Methods 64 (3): 226-234 (2005)), hibridación específica de alelos dinámica (DASH), medición de longitudes de sondas fluorescentes en ADN genómico peinado (Herrick *et al.*, PNAS 97 (1): 222-227 (2000)), pirosecuenciación de consulta de referencia (RQPS; Liu *et al.*, Cold Spring Harb. Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot5491 (2010)), formación de mapas de extremos de fósido en una secuencia de referencia (tecnología basada en capilares), secuenciación microelectroforética y de nanoporos (véase, por ejemplo, Service, Science 311: 1544-1546 (2006); y Shendure *et al.*, Nat. Rev. Genet. 5: 335-344 (2004)), y similares.

La desnaturalización de dianas de ácidos nucleicos para análisis mediante hibridación *in situ* y métodos similares por lo general se realiza de un modo tal como para conservar la morfología celular. Por ejemplo, el ADN cromosómico se puede desnaturalizar con un pH elevado, calor (por ejemplo, temperaturas de aproximadamente 70-95 °C), disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida), y combinaciones de los mismos. Por otro lado, las sondas, se pueden desnaturalizar con calor en cuestión de minutos.

Después de la desnaturalización, se realiza la hibridación. Las condiciones para hibridar de forma específica las sondas a sus dianas de ácido nucleico por lo general incluyen las combinaciones de condiciones que se pueden usar en un procedimiento de hibridación dado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones las puede determinar fácilmente alguien con una experiencia habitual en la materia. Las condiciones de este tipo por lo general implican temperatura controlada, fase líquida con el contacto entre una sonda y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores que incluyen concentración de la sonda, longitud de la diana, contenido de G-C de diana y sonda, composición del disolvente, temperatura, y duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Como alternativa, la

sombra y la diana se pueden someter a condiciones desnaturalizantes en conjunto mientras que están en contacto entre sí, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede conseguir con una incubación posterior de la sonda/muestra, por ejemplo, en una fase líquida con una mezcla de 2-4 x de SSC y formamida con una proporción de volumen de aproximadamente 50:50, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 55 °C durante un periodo de tiempo que de forma ilustrativa está en el intervalo de aproximadamente 0,5 horas a aproximadamente 96 horas, o más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 32 °C a aproximadamente 40 °C durante un periodo de tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Para aumentar la especificidad, se puede usar un agente de bloqueo, tal como un ácido nucleico de bloqueo sin etiqueta, como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.756.696 (cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad, y de forma específica para la descripción del uso de ácido nucleico de bloqueo). Otras condiciones se pueden usar fácilmente para hibridar de forma específica las sondas a sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como sería rápidamente evidente para alguien con experiencia en la materia. Los protocolos de hibridación se describen, por ejemplo, en Pinket *et al.*, PNAS USA 85: 9138-9142 (1988); In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo, ed., Humana Press, Totowa, NJ (1994); y Kallioniemi *et al.*, PNAS USA 89: 5321-5325 (1992).

Después de finalizar un periodo de incubación adecuado, la unión no específica de sondas cromosómicas a ADN de muestra se puede retirar mediante una serie de lavados. La temperatura y las concentraciones de sal se eligen adecuadamente para una rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la complejidad de una secuencia de sonda específica en relación con la secuencia genómica, y se puede determinar hibridando de forma sistemática sondas a muestras de composición genética conocida. En general, se pueden realizar lavados de alta rigurosidad a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 80 °C con aproximadamente 0,2 x a aproximadamente 2 x de SSC y de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 1 % de un detergente no iónico, tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de los rigurosidad menor, los lavados se pueden realizar a una temperatura inferior con un aumento de la concentración de sal.

Cuando se usan sondas o composiciones de sondas etiquetadas con fluoróforo, el método de detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Cualquier método de formación de imágenes microscópicas adecuado se puede usar en conjunto con los métodos que se describen en el presente documento para observar múltiples fluoróforos. En el caso en el que se usa microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden visualizar con luz adecuada para excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiados. Como alternativa se pueden usar sistemas de formación de imágenes digitales automatizados, tales como los sistemas MetaSystems, BioView o Applied Imaging.

Dependiendo del método usado, se puede usar un sistema de análisis de imágenes digitales para facilitar la presentación de resultados y para mejorar la sensibilidad para detectar pequeñas diferencias en la intensidad de fluorescencia. Un sistema a modo de ejemplo es QUIPS (un acrónimo para sistema de procesamiento cuantitativo de imágenes), que es un sistema de análisis de imágenes automatizado basado en un microscopio de fluorescencia convencional equipado con una plataforma automatizada, control de enfoque y rueda de filtro (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY). La rueda de filtro se monta en la vía de excitación de fluorescencia del microscopio para selección de la longitud de onda de excitación. Filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en el bloque óptico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin desplazamiento del registro de imágenes. El microscopio tiene dos puertos de cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, Calif.) para presentación de imágenes de video a alta velocidad sensible, que se usa para encontrar áreas interesantes en un portaobjetos así como para enfoque. El otro puerto de cámara tiene una cámara CCD enfriada (modelo 200 de Photometrics Ltd., Tucson, AZ), que se usa para la adquisición real de imágenes con resolución y sensibilidad elevadas. La cámara CCD enfriada esta interconectada con una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un puerto VME. Toda la adquisición de imágenes de múltiples colores se controla usando un paquete peso vuelve procesamiento de imágenes SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Países Bajos).

En la matriz CGH (aCGH) las sondas se inmovilizan en distintas posiciones en un sustrato y no están etiquetadas (véase, por ejemplo, Pub. de Sol. de Pat. Internacional N.º WO 96/17958). En su lugar, los ácidos nucleicos de muestra, que comprenden ácido o ácidos nucleicos diana, están etiquetados. Cualquiera de los ácidos nucleicos demuestra se etiquetan antes de su hibridación o los complejos de hibridación se etiquetan de forma detectable. En aCGH dual o multicolor la matriz de la sonda se hibrida de forma simultánea o de forma secuencial a dos o más colecciones de ácidos nucleicos diana etiquetados de forma diferente.

60 **Sondas**

En vista de lo mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16 que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53 que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 17, y una sonda para Her2 que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, y donde el conjunto de

sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente.

En el presente documento se divulga un conjunto de sondas que permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente. El conjunto de sondas comprende una sonda para p16 (pérdida), una sonda para p53 (pérdida), una sonda para el cromosoma 7 (aneuploidía), y una sonda para el cromosoma 17 (aneuploidía). El conjunto de sondas puede comprender al menos una sonda adicional. La al menos una sonda adicional se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una sonda para 20q (aumento), una sonda para C-myc (aumento), y una sonda para Her2 (aumento). Por lo tanto, el conjunto de sondas puede comprender una sonda para p16 (pérdida), una sonda para p53 (pérdida), una sonda para el cromosoma 7 (aneuploidía), una sonda para el cromosoma 17 (aneuploidía), una sonda para 20q (aumento), una sonda para c-myc (aumento), y una sonda para Her2 (aumento).

La sonda para el cromosoma 7 se puede hibridar al ADN satélite alfa situado en el centrómero del cromosoma 7, mientras que la sonda para el cromosoma 17 se puede hibridar al ADN satélite alfa situado en el centrómero del cromosoma 17. Los ejemplos de las sondas de este tipo incluyen CEP7 y CEP17. La sonda para p16 se puede hibridar al sitio 9p21 específico del locus, la sonda para p53 puede ser para la región 17p13.1, la sonda para 20q puede ser para 20q13, la sonda para C-myc puede ser Vysis LIS C-MYC para 8q24, y que la sonda para Her2 puede ser para la región cromosómica 17q11-q12. En una realización, la sonda para p16 se hibrida a todo o a una parte del gen p16 en 9p21 en el cromosoma 9. En otra realización, la sonda se hibrida a todo el gen p16 en el cromosoma 9 y regiones adyacentes, que se extienden desde un punto centromérico del gen p16 hasta un punto telomérico del gen p 16.

En una realización, la sonda para p53 se hibrida a todo o a una parte del gen p53 en 17p13.1 en el cromosoma 17. En otra realización, la sonda se hibrida a todo el gen p53 en el cromosoma 17 y regiones adyacentes, que se extienden desde un punto centromérico del gen p53 gene hasta un punto telomérico del gen p53.

La sonda para 20q se puede hibridar en cualquier posición apropiada del brazo q del cromosoma 20. En una realización, la sonda para 20q se hibrida a todo o a una parte del gen AURKA en el cromosoma 20. En otra realización, la sonda para 20q se hibrida a todo el gen AURKA en el cromosoma 20 y regiones adyacentes, que se extienden desde un punto centromérico del gen AURKA hasta un punto telomérico del gen AURKA. En otra realización, la sonda para 20q se hibrida a la región 20q13.2 del cromosoma 20 e incluye el gen 17.5 kb ZNF217. En otra realización, la sonda para 20q se hibrida a todo o a una parte del locus D20S108 situado en el cromosoma 20q12. En otra realización, la sonda para 20q se hibrida a todo el locus D20S108 en el cromosoma 20 y regiones adyacentes, que se extienden desde un punto centromérico del locus D20S108 hasta un punto telomérico del locus D20S108.

En una realización, la sonda para C-myc se hibrida a todo o a una parte del gen c-myc situado en la región 8q24.12-q24.13 del cromosoma 8.

En una realización, la sonda para Her2 se hibrida a todo o a una parte del gen her2/neu / erbB2 en la región 17q11.2-12 del cromosoma 17. En otra realización, la sonda para Her2 se hibrida a todo el gen her2/neu / erbB2 y regiones adyacentes, que se extienden desde un punto centromérico del gen her2/neu / erbB2 hasta un punto telomérico del gen her2/neu / erbB2.

Las sondas enumeradoras de cromosomas (CEP) y sondas específicas del locus que se dirigen a una región o subregión cromosómica se pueden obtener en el mercado o las pueden preparar fácilmente los expertos en la materia. Las sondas de este tipo se pueden obtener en el mercado en Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Las sondas cromosómicas se pueden preparar, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos de proteína (PNA), ADN humano clonado tal como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), y cromosomas artificiales de PI (PAC) que contienen inserciones de secuencias de ADN humano. Una región de interés se puede obtener a través de amplificación con PCR O clonación. Como alternativa, las sondas cromosómicas se pueden preparar de forma sintética de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En otra realización, las sondas cromosómicas pueden ser oligo sondas.

Cuando se desea dirigirse a un locus genético en particular, pueden ser preferentes las sondas que seguirían a lo largo de toda la longitud del gen al que se dirigen, aunque no es necesario. Se puede diseñar una sonda específica del locus para que se hibride a un oncogén o gen supresor tumoral, cuya aberración genética se correlaciona con la metástasis, por ejemplo, p16, p53, C-myc y Her2.

Las sondas reivindicadas están etiquetadas de forma detectable, y cada sonda está etiquetada de forma distinta. Preferentemente, las sondas se etiqueta en forma detectable con fluoróforos, y cada sonda está etiquetada de forma distinta. Los ejemplos de fluoróforos preferentes incluyen, pero no se limitan a, ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), 5-carboxi-X-rodamina, 6-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), ácido 7-dietil-aminocumarin-3-carboxílico, 5-isotiocianato de tetrametilrodamina, 6-isotiocianato de tetrametilrodamina, 5-carboxitetrametilrodamina, 6-carboxitetrametilrodamina, ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico, ácido N-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacenopropiónico, 5-isotiocianato de eosina, 5-isotiocianato de eritrosina, SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.),

SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.), ROJO TEXAS (Molecular Probes, Inc.), y acetilazida de azul CASCADE (Molecular Probes, Inc.). La etiqueta usada en particular no es fundamental; de forma deseable, sin embargo, la etiqueta en particular no interfiere con la hibridación de la sonda *in situ*. De forma deseable la etiqueta se puede detectar con un número de copias tan bajo como sea posible para maximizar la sensibilidad del ensayo y puede ser detectable por encima de cualquier señal de fondo. También de forma deseable, la etiqueta proporciona una señal altamente localizada, proporcionando de ese modo un alto grado de resolución espacial.

En la técnica se conoce bien la unión de fluoróforos a sondas de ácidos nucleicos y se puede realizar mediante cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir de forma covalente a un nucleótido en particular, por ejemplo, y el nucleótido etiquetado se pueden incorporar en la sonda usando técnicas convencionales tales como traducción libre, cebado aleatorio (Rigby *et al.*, J. Mol. Biol. 113: 237 (1997)), etiquetado con PCR, etiquetado directo mediante modificación química de restos en particular, tales como restos de citosina (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.491.224), y similares. Como alternativa, el fluoróforo se puede unir de forma covalente a través de un conector a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los métodos para sondas de etiquetado se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.491.224, y en Morrison *et al.*, Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications, Capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," pp. 21-40, Fan, Ed., Humana Press (2002), ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia para sus descripciones de sondas de etiquetado.

Alguien con experiencia en la materia reconocerá que como restos que contienen etiqueta se pueden usar otros agentes o colorantes en lugar de fluoróforos. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, Restos que contienen etiqueta radioluminescente, quimioluminescente, bioluminescente, y fosforescente. Como alternativa, se pueden usar restos de detección que se visualizan con medios indirectos. Por ejemplo, las sondas se pueden etiquetar con biotina o digoxigenina usando métodos de rutina conocidos en la técnica, y a continuación se pueden procesar adicionalmente para su detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede conseguir mediante la unión posterior de avidina conjugada a un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso se puede conseguir la visualización y diferenciación de sondas como se describe a continuación.

Como alternativa las sondas de cromosomas hibridadas a regiones diana se pueden visualizar mediante reacciones enzimáticas de restos de etiqueta con sustratos adecuados para la producción de productos con color insolubles. Cada sonda se puede diferenciar de otras sondas dentro del conjunto mediante la elección de un resto de etiqueta distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto se puede detectar mediante la incubación posterior con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. El fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y el nitro azul de tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que el diaminobenzoato sirve como sustrato para la HRP.

Kits

La presente invención también proporciona un kit que consiste en:

- (a) un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16 que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53 que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda para el cromosoma 17, y una sonda para Her2 que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, and donde el conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente;
- (b) instrucciones para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente, donde las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53 aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17, y aumento de Her2, and opcionalmente
- (c) uno o más de un agente de bloqueo, una etiqueta, un agente de etiquetado, un reactivo para hibridación, un tampón, y una diseminación de la metafase. La muestra de células esofágicas se obtiene preferentemente con un método de citología con cepillo.

En el presente documento se desvela un kit que comprende (a) un conjunto de sondas que permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente and instrucciones para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente. El conjunto de sondas comprende una sonda para p16, una sonda para p53, una sonda para el cromosoma 7, y una sonda para el cromosoma 17. Las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, y aneuploidía del cromosoma 17. El conjunto de sondas puede comprender al menos una sonda adicional, y las instrucciones pueden comprender instrucciones adicionales. La al menos una sonda adicional se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una sonda para 20q, una sonda para C-myc, y una sonda para Her2. Las instrucciones adicionales pueden comprender determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía adicional seleccionada entre el grupo que consiste en aumento de 20q, aumento de C-myc, y aumento de Her2. Los kits de este tipo pueden comprender adicionalmente

agentes de bloqueo o sondas, diversas etiquetas o agentes de etiquetado para facilitar la detección de las sondas, reactivos para hibridación (por ejemplo, tampones), una diseminación de la metafase, y similares.

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos e sirven para ilustrar la presente invención. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica posteriormente.
Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan a la referencia.

10 **Ejemplo 1**

Este ejemplo describe un seguimiento potencial, a largo plazo de marcadores para pronosticar LGD, HGD y/o EAC en una población base teórica de pacientes con esófago de Barrett (BE).

15 El problema clínico del BE es que la gran mayoría de los pacientes no tienen y un riesgo de < 0,5 % al año para su evolución. En este estudio el objeto de identificar marcadores de pronóstico temprano que se pueden usar para identificar a los pacientes con BE y ninguna displasia y que se clasifican como indefinidos para displasia en muestras de ensayo de biopsia. La población base de AMC, que se había identificado sistemáticamente para los marcadores de FISH, p16 (9p21) pérdida, p53 (17p13.1) pérdida, cromosoma 7 pérdida/aumento (usando sonda de enumeración de cromosomas (CEP) 7), cromosoma 17 pérdida/aumento (usando CEP 17), y amplificación de Her2/neu (17q11.2) entre 2002 y 2008, se siguieron de forma potencial durante un periodo medio de seguimiento de 60 meses. Los
 20 pacientes con LGD, HGD o EAC en la endoscopia inicial o evolución histológica en seis meses y/o tratamiento previo para BE se excluyeron. Los pacientes, que previamente tuvieron tratamiento mediante resección mucosal endoscópica (EMR) y/o una terapia de ablación (por ejemplo, ablación con radiofrecuencia) para tratamiento de BE, también se excluyeron. En la endoscopia inicial (t = 0) se tomaron biopsias siguiendo las directrices de ACG, y se realizó una citología con cepillo. Todos los pacientes se sometieron a vigilancia potencial. La histología y la FISH se realizaron en muestras de citología independientemente y con ocultación. La histología se evaluó durante la endoscopia de vigilancia realizada por dos endoscopistas profesionales, que siguieron los criterios y el protocolo de biopsia actuales (es decir, biopsias de 4 cuadrantes de cada centímetro del segmento de Barrett y de cualquier
 25 lesión sospechosa). La histopatología fue evaluada por un patólogo experto teórico en el campo gastrointestinal (GI) y, en el caso de displasia, por dos patólogos GI teóricos expertos. Los criterios de valoración fueron evolución histológica de ND/IND en LGD/HGD/EAC, o un FU de 60 meses. El ensayo daba "marcador positivo" cuando el porcentaje de células anómalas con anomalías genéticas para Her2, p16 o p53 y/o aneuploidía (aneusomía para los cromosomas 7 y 17) era más elevado que los valores del punto de corte. Los valores del punto de corte se
 30 determinaron haciendo el recuento de muestras de ensayo de citología con cepillo de epitelio esofágico escamoso normal (media +3 DT).

En vista de lo mencionado anteriormente, en el estudio se incluyeron 195 pacientes. Ciento setenta y seis (176) de los 195 pacientes alcanzaron un criterio de valoración, y 140 de ellos eran de sexo masculino (80 %). La edad media en el momento de la entrada era de 62 (DT ± 12). Las longitudes M y C medias de Barrett fueron de 3,6 cm (DT ± 2,5) y de 1,16 cm (DT ± 1), respectivamente. Diecisiete pacientes evolucionaron de ND/IND a LGD o HGD/EAC. El ensayo de FISH dio positivo en 55/176 (31 %). Quince de los 17 pacientes (15/55 (27 %)), que evolucionaron de ND/IND a LGD o HGD/EAC, tenían marcador positivo, mientras que solamente dos pacientes (2/121 (1,6 %)) que evolucionaron de ND/IND a LGD o HGD/EAC, presentaban marcador negativo. Las curvas de Kaplan Meier mostraban que el intervalo sin evolución era significativamente más corto en el grupo del marcador positivo con respecto al grupo del marcador negativo (p = 0,001; Figura 1). Un análisis multivariado usando un modelo de regresión de Cox (Tabla 1) mostraba que un ensayo positivo se correlacionaba con un HR de 10,6 (p = 0,003) para evolucionar cuando se comparaba con otras variables.

50 En este estudio de seguimiento a largo plazo potencial se demostró que el ensayo de biomarcador de FISH De muestras de ensayo de citología de pacientes con vigilancia para BE, como se describe en el presente documento, se correlaciona con un aumento del riesgo de evolución de 10,6. Este ensayo se muestra prometedor como una herramienta útil para mejorar la clasificación de riesgo de pacientes con BE y un aumento de la eficacia de la vigilancia.

55 Como se muestra en la Fig 1, que es un gráfico de la tasa acumulativa de supervivencia sin evolución con respecto al seguimiento (meses) que muestra el uso de la curva de Kaplan Meier para representar los datos de seguimiento para la evolución de pacientes con esófago de Barrett, en el que la línea superior representa el grupo de 'marcador negativo' y la línea inferior representa el grupo de 'marcador positivo', el grupo de marcador positivo presentaba una evolución en el estadio de displasia (véanse las disminuciones en la línea inferior). La diferencia en la evolución de los dos grupos en el tiempo es estadísticamente significativa (ensayo de rango logarítmico, valor de p = 0,01).

Tabla II: Análisis Multivariado usando el modelo de regresión de Cox
 Variables
 Proporción de Riesgo (Exp (B))

ES 2 650 230 T3

Variables
95,0 % de CI (Exp (B))
Significancia
Inferior
Superior
Marcadores
10,644
2,269
49,921
0,003
Edad
1,012
0,966
1,06
0,616
Longitud C de Barrett
1,001
0,655
1,53
0,996
Longitud M de Barrett
1,001
0,655
1,53
0,996
Altura
0,974
0,906
1,046
0,465
BMI
0,996
0,939
1,056
0,884
Tabaquismo
1,38
0,403
4,726
0,608
Alcohol
1,278

Variables

0,137

11,879

0,829

Ejemplo 2

5 Este ejemplo describe la validación del conjunto de marcadores de FISH de ADN de pronóstico en una población de vigilancia aleatoria de BE basada en comunidad.

10 El estudio se inició porque la combinación de CEP 7, 17, aumentos/amplificación de Her2/neu (17q11.2), p53 (17p13.1), y pérdidas de p16 (9p21) prometían tener un valor de pronóstico para identificar a los pacientes con Barrett que presentan un aumento del riesgo del desarrollo de displasia en un centro de referencia terciario. Entre enero de 2007 y noviembre de 2010 se recogieron de forma potencial y aleatoria muestras de ensayo de citología con cepillo en seis hospitales regionales en la región de Amsterdam/Holanda Septentrional de 266 pacientes con BE, que fueron diagnosticados sin displasia. Los pacientes con LGD, HGD o EAC en la endoscopia inicial o evolución histológica en seis meses y/o tratamiento previo para BE se excluyeron. Los pacientes, que previamente tuvieron tratamiento mediante resección mucosal endoscópica (EMR) y/o una terapia de ablación (por ejemplo, ablación con radiofrecuencia) para tratamiento de BE, también se excluyeron. En la endoscopia inicial (t = 0) se tomaron biopsias siguiendo las directrices de ACG, y se realizó una citología con cepillo. Todos los pacientes se sometieron a 15 vigilancia potencial. La histología y la FISH se realizaron en muestras de citología independientemente y con ocultación. Las biopsias se procesaron de forma rutinaria para clasificación de displasia histopatológica. Las muestras de ensayo con cepillo se tomaron del epitelio escamoso normal y del segmento de Barrett. La FISH con el conjunto de marcadores se realizó en nuestros de ensayo de citología, y los resultados se evaluaron con respecto a 20 la histología. El ensayo daba "marcador positivo" cuando el porcentaje de células anómalas con anomalías genéticas para Her2 (aumentos/amplificación), p16 o p53 y/o aneuploidía (aneusomía para los cromosomas 7 y 17) era más elevado que los valores del punto de corte. Los valores del punto de corte usados para cada sonda para detectar un resultado de FISH anómalos en las muestras de ensayo de citología de Barrett se determinaron en las 25 muestras de citología de la mucosa escamosa normal. Por último, los resultados de FISH se correlacionaron con el estadio histológico.

30 En la actualidad, 170 pacientes han alcanzado un seguimiento medio de 48 meses. La edad media de los 170 pacientes es 170 64 (intervalo de 32-88), y un 81 % (218/266) de los pacientes son de sexo masculino. La longitud máxima del segmento de Barrett es de 1,16 cm (intervalo: 1-3 cm). A t = 0, el ensayo de FISH dio positivo en 48/170 (28 %) casos. Diez de los 170 pacientes presentaban evolución histológica, y todos tenían marcador positivo. Ocho pacientes evolucionaron de ND a LGD, mientras que los pacientes evolucionaron de ND a HGD. Usando curvas de Kaplan Meier para evaluar la supervivencia sin evolución, se observó una diferencia altamente significativa entre los dos grupos (ensayo de rango logarítmico, valor de p 0,001, Fig 2). El análisis de regresión de Cox revelaba un HR de 9,1 (valor de p 0,001) para evolucionar en el caso de un ensayo positivo en comparación con otras variables (Tabla 35 III). Los datos indican que el ensayo de marcador de FISH tiene un valor de pronóstico elevado para predecir la evolución en los pacientes con BE. Los datos apoyan el uso del ensayo de biomarcador de FISH de ADN para aumentar la rentabilidad de la vigilancia de los pacientes con Barrett.

40 Tabla III: Análisis Multivariado usando el Modelo de regresión de Cox

Variables	Proporción de riesgo (Exp (B))	95 % de CI		Significancia
		inferior	Superior	
Marcadores	9,175	2,68	25,02	0,001
Edad	0,937	0,86	1,02	0,136
Longitud C de Barrett	1,017	0,65	2,56	0,770
Longitud M de Barrett	1,172	0,40	3,40	0,770

Ejemplo 3

45 Este ejemplo describe de qué modo la citología con cepillo de todo el segmento de la mucosa de Barrett, en combinación con biomarcadores, puede reducir los errores en la toma de muestras y aumentar la precisión de la identificación de de HGD/EAC temprano.

50 A pesar del examen endoscópico cuidadoso del esófago de Barrett y las biopsias tomadas durante los programas de vigilancia, aún se pueden perder lesiones con HGD o adenocarcinoma esofágico temprano (EAC). Los estudios tempranos han mostrado que la aneuploidía y las aplicaciones de los oncogenes C-Myc, Her-2 y 20q son sucesos

frecuentes en HGD y EAC. Estos marcadores se pueden determinar de forma eficaz mediante FISH en muestras de ensayo de citología con cepillo de pacientes con BE.

5 Se analizaron anomalías de Her2/Neu, c-Myc y 20q13.2 y aneuploidía (determinadas mediante aneusomía para los cromosomas 7 y 17) para su precisión para detectar HGD/EAC en una población base de referencia terciaria teórica de 202 pacientes con BE y EAC. El conjunto de marcadores se aplicó en una población base de comunidad de 305 pacientes con BE de 6 hospitales diferentes. A t = 0, las biopsias y las muestras de ensayo de citología con cepillo se obtuvieron de todos los pacientes. Las biopsias se usaron para clasificación de displasia. La FISH para el conjunto de cinco marcadores se realizó en las muestras de ensayo de citología. Las evaluaciones histológicas y de FISH fueron realizadas con ocultación, por investigadores independientes. Por último, los resultados de FISH se evaluaron para su precisión para detectar HGD/EAC.

15 De 202 casos, 138 fueron ND/IND, 11 fueron LGD, 53 fueron HGD /EAC. Se encontró aneuploidía en 32/53 (60 %) pero también un aumento de la frecuencia de ND/IND a LGD (ND (10 %), IND (20 %), LGD (18 %)). Las amplificaciones de Her2/Neu (17q11.2), c-Myc (8q24) di 20q13.2 no estaban presentes en los casos de ND/IND o LGD. En los casos de HGD/EAC la amplificación de Her-2/Neu se encontró en 28/53 (53 %). La amplificación de C-Myc se observó en 28/53 (53 %) y la amplificación de 20q se observó en 24/53 (45 %) de los casos de HGD/EAC (Fig 3).

20 La población base de validación de BE aleatoria consistía en 305 pacientes con BE incluidos de forma potencial, 266 pacientes con IM, 31 con LGD y 8 pacientes con HGD. Se observaron anomalías para Her2/Neu (17q11.2) en un 62 % (5/8), mientras que se observaron anomalías para c-Myc (8q24) en un 50 % (4/8) y se observaron anomalías para 20q en un 38 % (3/8) en casos de HGD. Ninguno de los casos de IM o LGD presentaban estas anomalías. Un 75 % (6/8) de HGD presentaba aneuploidía, en las que también se observaba aneuploidía en un 5 % (14/266) de ND/IND y en un 34 % (10/29) de LGD (Fig 4). El análisis de ROC mostraba que la combinación de Her2/Neu, c-Myc, 20q13.2 y que aneuploidía se refieren a un área bajo la curva de 0,90 (p = 0,001; sensibilidad de un 88 %, especificidad de un 100 %; Fig 5).

30 Tabla IV: Sensibilidad y Especificidad de los Marcadores de Diagnóstico en las Dos Poblaciones Base de BE Independientes

Marcador	Población Base del estudio (n = 202)		Población Base de Validación (n = 305)	
	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Her-2/neu	53	100	62,5	100
C-myc	53	100	75	98
20q13.2	44	100	38	100
aneuploidía (aneusomía (CEP7 y CEP 17))	60	88	87,5	91

Ejemplo 4

35 Este ejemplo muestra que la supervivencia sin evolución era significativamente peor para pacientes con anomalías en p53 detectadas con FISH, IHC y la combinación de las técnicas, pero que FISH solo tenía los valores predictivos positivos (PPV) y predictivos negativos (NPV) más elevados de FISH para predecir la evolución con BE, que se pueden dividir en tres categorías: 1) pacientes de bajo riesgo, que presentan un riesgo de un 0,2-0,5 % al año de evolucionar y que principalmente no presentan displasia ni displasia indefinida, 2) pacientes de riesgo intermedio, que presentan un riesgo de un 1 % a un 10 % al año de evolucionar y que pueden presentar LGD, y 3) pacientes, que tienen HGD o cáncer inicial y demanda de tratamiento.

45 Los marcadores de pronóstico como se han abordado anteriormente se sometieron a ensayo en la población de bajo riesgo mientras que los marcadores de diagnóstico se sometieron a ensayo en una población mixta de pacientes con Barrett. En este estudio con el papel de p53 se abordaba de forma más específica aunque no se menciona en las directrices, la inmunohistoquímica (IHC) para p53 se está aplicando en la actualidad en muchos laboratorios de patología para determinar si los pacientes con Barrett están desarrollando un riesgo intermedio para evolucionar. En las poblaciones base de bajo riesgo mencionadas en los ejemplos 1 y 2, se identificó solamente una pequeña fracción de pacientes con Barrett no displásico (Fig 6).

50 En un sub análisis, el estado de pérdidas de p53/CEP 17 evaluado con FISH en muestras de ensayo de citología con cepillo se evaluó en comparación con las pérdidas de p53 evaluadas con IHC en muestras de ensayo de biopsia, donde todas las muestras de ensayo se tomaron a t = 0 en una población base mixta de pacientes con Barrett. Se realizó una vigilancia potencial para pacientes sin displasia/displasia indefinida y displasia de LGD. En este estudio, 116 pacientes con BE se evaluaron inicialmente, de los cuales 95 eran de sexo masculino y 21 eran de

sexo femenino. Las edades me di mediana eran 63 ± 13 años y 64 años (intervalo de 34-92), respectivamente. La longitud media del segmento máximo de BE (longitud M) era de 3 cm (intervalo de 1-13 cm). La población de BE incluía 80 casos con metaplasia de tipo intestinal sin displasia (IM), 13 casos indefinidos para displasia (IND), siete casos con displasia de bajo grado (LGD), seis casos con displasia de alto grado (HGD), y 10 casos con adenocarcinoma esofágico (EAC), tal como se evalúa mediante histopatología en muestras de ensayo de biopsia tomadas en el momento de la inclusión de los pacientes ($t = 0$). El análisis de FISH se realizó usando sondas específicas para LSI p53 y CEP17 para determinar la proporción entre CEP 17 y p53. Una proporción de $p53:CEP17 < 1$ se consideraba como pérdida de p53 (relativa). La pérdida o pérdida relativa se determinó haciendo el recuento de controles de citología escamosa emparejada. Estas muestras de citología escamosa si adquirieron a $t = 0$ y se procesaron como una segunda muestra de citospina en el mismo portaobjetos que las muestras de ensayo de Barrett. La FISH se realizó de forma simultánea para los controles (internos) y casos de Barrett. El valor del punto de corte se determinó con la media de los controles internos +3 DT.

Para IHC, un 8,6 % de los casos de IM/IND, un 100 % de los casos de LGD, un 66,7 % de los casos de HGD y un 80 % de los casos de EAC fueron positivos para acumulación de proteína de p53. Para FISH, un 7,5 % de los casos de IM/IND, un 42,9 % de los casos de LGD, un 33,3 % de los casos de HGD y un 80 % de los casos de EAC Eran positivos para pérdida del locus de p53. Los datos mostraban un aumento de la frecuencia de la anomalía de p53 junto con la secuencia patogénica de BE. Esta correlación significativa se observa tanto para IHC como para FISH (tendencia de χ^2 , $p < 0,001$).

Se realizó un seguimiento potencial para 86 de los pacientes con IM, IND y LGD siguiendo criterios de ACG y las directrices para biopsia endoscópica de rutina. Las edades media y mediana de la población base de seguimiento eran de 62 ± 13 años y 61 años (intervalo de 34-88), respectivamente. Setenta y tres de estos pacientes eran del sexo masculino y 13 eran de sexo femenino. La población base de seguimiento incluía 73 IM, 9 IND y 4 casos histopatológicos de LGD. El tiempo medio de seguimiento fue de 63 meses, que varía de 1 a 113 meses. Los criterios de valoración de seguimiento estaban definidos por la evolución como desarrollo de IM/IND a HGD/EAC Y desarrollo de LGD a HGD/EAC. Los pacientes que evolucionaron en seis meses se excluyeron del análisis ya que en los casos de este tipo es probable que el estadio patogénico más avanzado se perdiera en la primera endoscopia. El tiempo medio para la evolución fue de 43 meses, que varía de 12 a 72 meses. Los valores predictivos positivos (PPV) y predictivos negativos (NPV) de FISH para predecir la evolución fueron un 75 % y un 100 %, respectivamente. Para IHC, PPV y NPV fueron un 33,3 % y un 96,1 %. La supervivencia sin evolución para grupos positivos para el ensayo y negativos para el ensayo para ambas técnicas se evaluaron mediante análisis de Kaplan-Meier (Fig 7a-7c). La supervivencia sin evolución era significativamente peor para pacientes con anomalías en p53 detectadas con FISH, IHC y la combinación de las técnicas (el valor de p del ensayo de rango logarítmico era respectivamente $< 0,001$, $0,004$ y $< 0,001$; Fig 7a-7c).

Todas las patentes, publicaciones de solicitud de patentes, artículos en revistas, libros de texto, y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativos del nivel de experiencia para los expertos en la materia a la que pertenece la divulgación. Todas las publicaciones de este tipo se incorporan en el presente documento por referencia con el mismo alcance que si se indicará que cada publicación individual se incorpora por referencia de forma específica e individual.

La invención que se describe en el presente documento de forma ilustrativa se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos o limitación o limitaciones, que se divulgan o no de forma específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en el presente documento cada caso de cualquiera de las expresiones "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en" se puede reemplazar con cualquiera de las otras dos expresiones. De forma análoga, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo, que se describen en el presente documento y/o que serán evidentes para las personas con experiencia habitual en la materia después de la lectura de la divulgación.

Los términos y expresiones, que se han usado, se usan como términos de prescripción y no de limitación. En este sentido, cuando ciertos términos se definen en "Definiciones" y de otro modo se definen, describen, o discuten en cualquier parte en la "Descripción Detallada", todas las definiciones, descripciones, y discusiones de este tipo pretenden atribuirse a tales términos. Tampoco hay intervención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Además, cuando en la "Descripción Detallada" se usan subtítulos, por ejemplo, "Definiciones", al uso es únicamente para facilitar la referencia y no pretende limitar ninguna divulgación realizada en una sección con respecto a esa sección solamente; en su lugar, cualquier divulgación realizada bajo un subtítulo pretende constituir una divulgación en todos y cada uno de otros subtítulos.

Se reconoce que dentro del alcance de la invención reivindicada son posibles diversas modificaciones. Por lo tanto, se debería entender que, aunque la presente invención se ha divulgado que forma específica en el contexto de realizaciones preferentes y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento. Las modificaciones y variaciones de este tipo se

consideran dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16, que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53, que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 17, y una sonda para Her2, que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, donde el conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente.
- 10 2. Un kit que consiste en:
- 15 (a) un conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable que consiste en una sonda para p16, que se hibrida a p21 en el cromosoma 9 humano, una sonda para p53, que se hibrida a p13 en el cromosoma 17 humano, una sonda centromérica para el cromosoma 7, una sonda centromérica para el cromosoma 17, y una sonda para Her2, que se hibrida a q11 en el cromosoma 17 humano, donde cada sonda está etiquetada de forma detectable con un fluoróforo distinto, donde el conjunto de sondas etiquetadas de forma detectable permite el pronóstico de la evolución del esófago de Barrett en un paciente;
- 20 (b) instrucciones para pronosticar la evolución del esófago de Barrett en un paciente, donde las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células de esófago de un paciente al menos una anomalía seleccionada entre el grupo que consiste en pérdida de p16, pérdida de p53, aneuploidía del cromosoma 7, aneuploidía del cromosoma 17, y aumento de Her2;
- 25 y opcionalmente
(c) uno o más artículos seleccionados entre el grupo que consiste en un agente de bloqueo, una etiqueta, un agente de etiquetado, un reactivo para hibridación, un tampón, y una diseminación de la metafase.
3. El kit de la reivindicación 2, donde la muestra de células esofágicas se obtiene con un método de citología con cepillo.

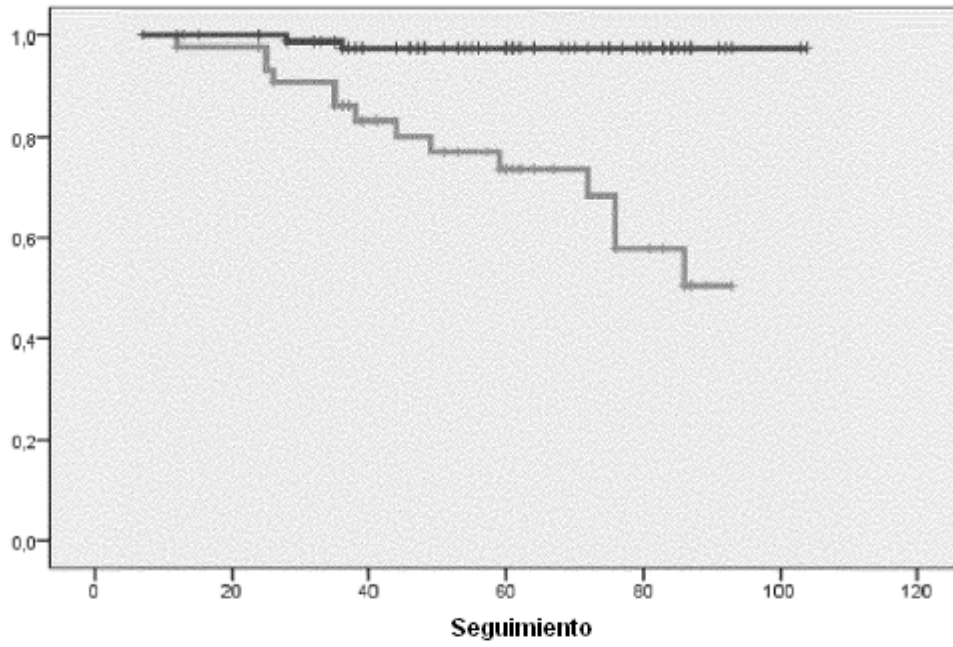


FIG. 1

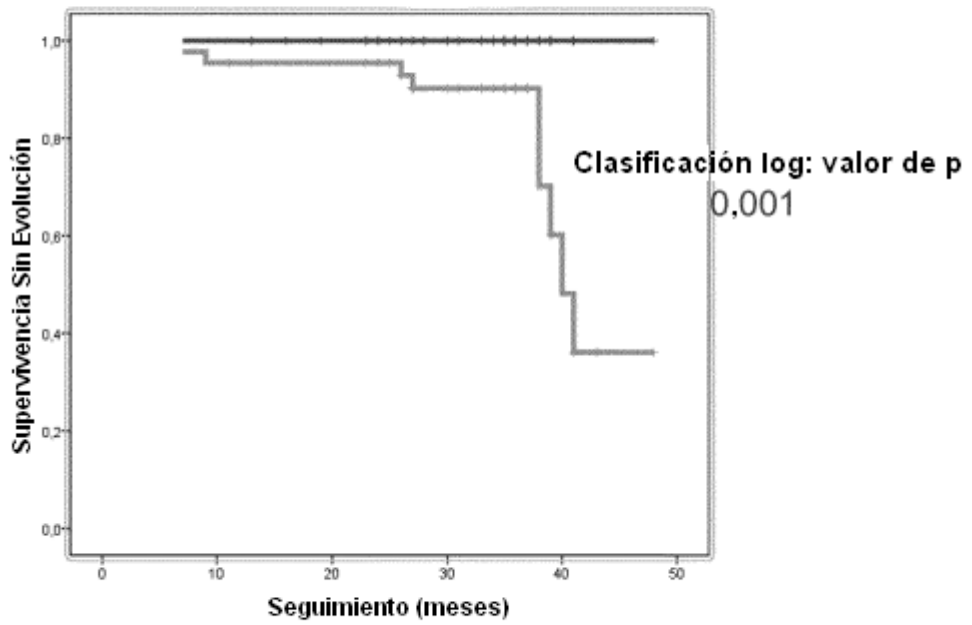


FIG. 2

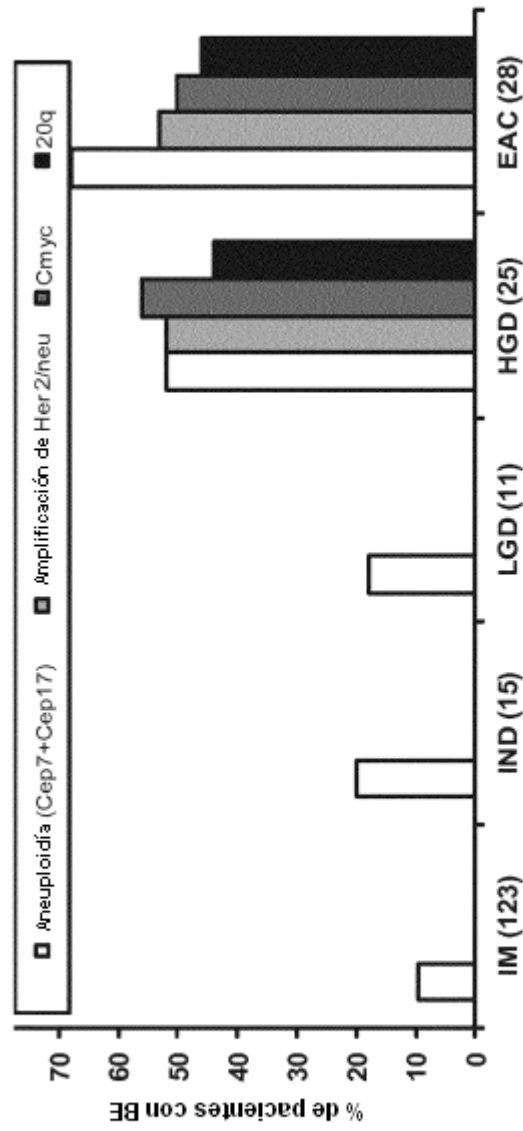


FIG. 3

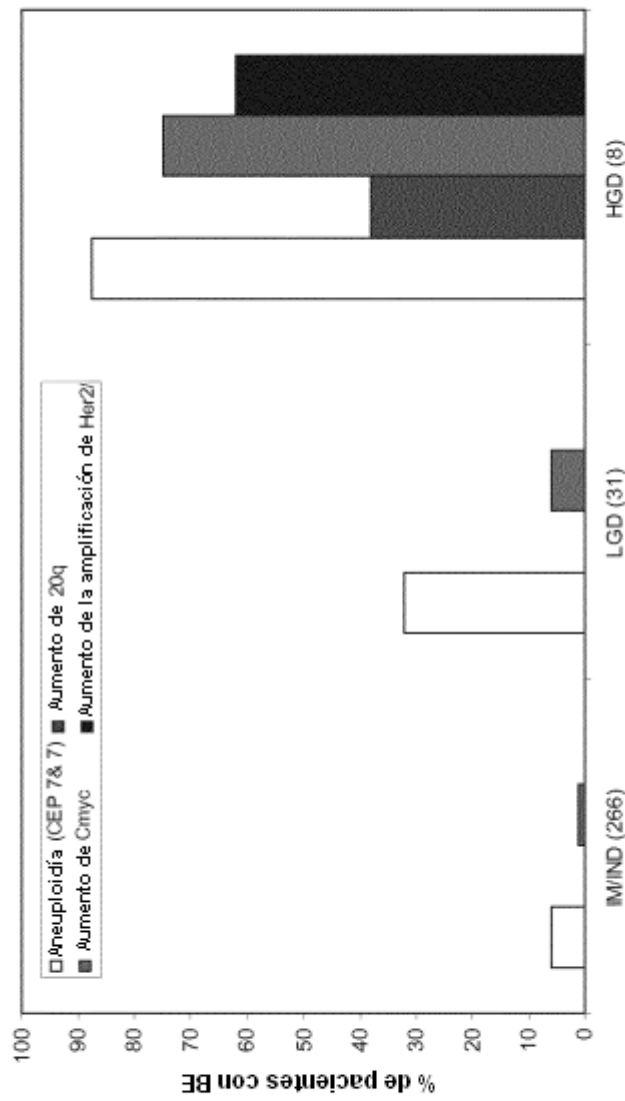


FIG. 4

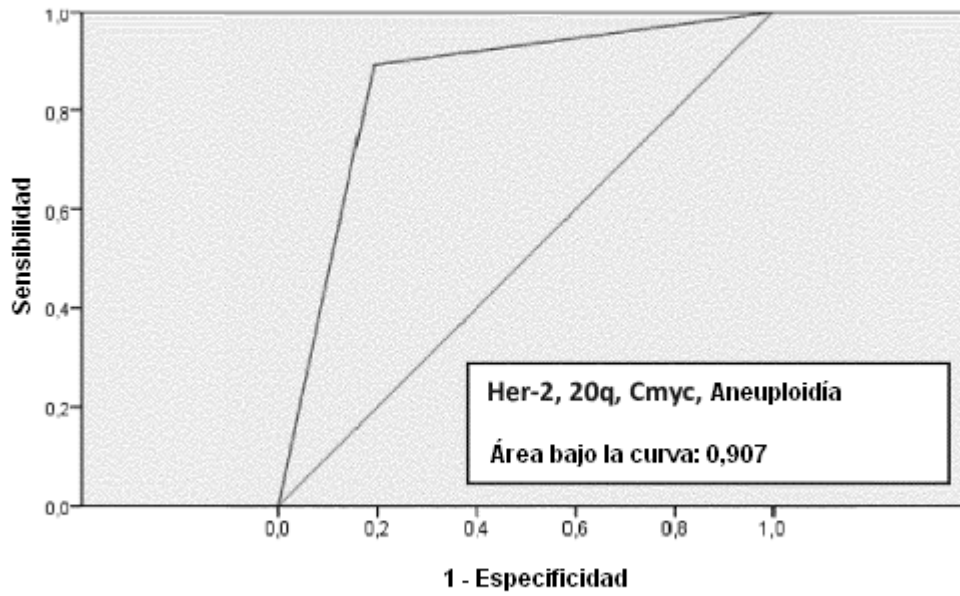


FIG. 5

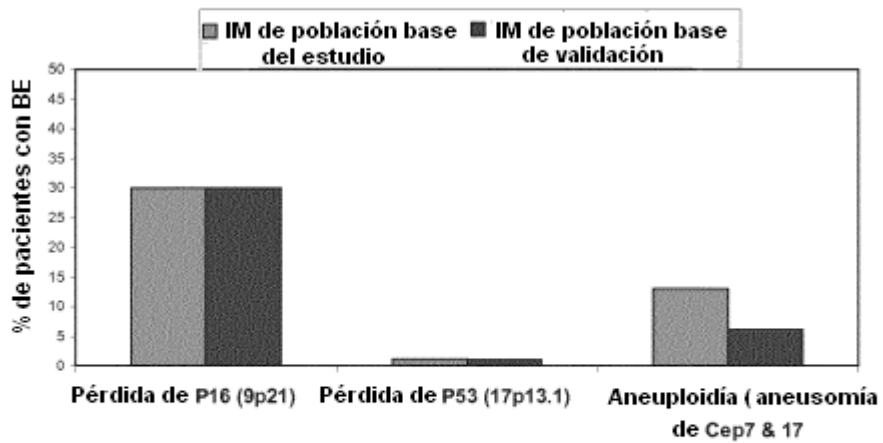


FIG. 6

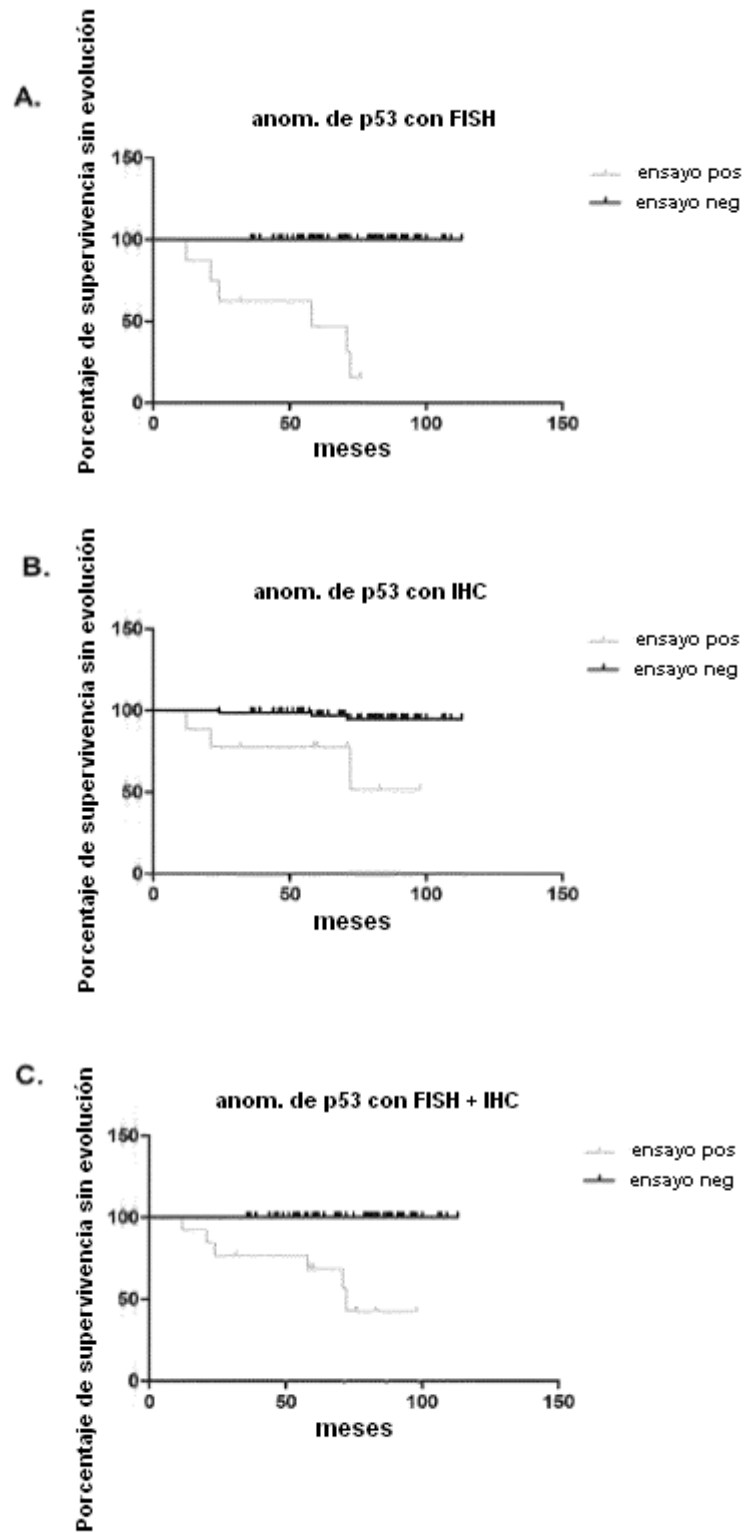


FIG. 7