

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 867**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2013 PCT/EP2013/061707**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2013 E 13730505 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2859118**

54 Título: **Métodos para detectar la inactivación de la ruta de recombinación homóloga (BRCA1/2) en tumores humanos**

30 Prioridad:

**07.06.2012 EP 12305648**

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

**12.03.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT CURIE (50.0%)**

**26, rue d'Ulm**

**75005 Paris, FR y**

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**STERN, MARC-HENRI;**

**MANIE, ELODIE y**

**POPOVA, TATIANA**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 658 867 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para detectar la inactivación de la ruta de recombinación homóloga (BRCA1/2) en tumores humanos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a métodos para detectar una predisposición a desarrollar cáncer y métodos para tratar el cáncer.

10 **Estado de la técnica**

15 El cáncer es una clase de enfermedades en las que un grupo de células presentan los rasgos de crecimiento descontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales), invasión (intrusión en y destrucción de tejidos adyacentes), y en ocasiones metástasis (propagación a otras localizaciones en el cuerpo mediante la linfa o la sangre). Los cánceres pueden clasificarse según el órgano, tejido y tipo celular del que se originan las células cancerosas: pulmón, colon, hígado, piel, etc.

20 El cáncer representa una de las causas principales de muerte en el mundo. El tratamiento exitoso se basa en el diagnóstico de la enfermedad en estadios muy tempranos y en la elección de terapias adaptadas. Se ha identificado una pluralidad de factores de riesgos (relacionados con el estilo de vida, genéticos, etc.) para ciertos tipos de cánceres.

25 El cáncer de mama (neoplasia de mama maligna) es un tipo de cáncer que se origina de tejido de mama, más habitualmente del revestimiento interno de los conductos lácteos o los lóbulos que aportan leche a los conductos. Los cánceres que se cree que se originan de los conductos se conocen como carcinomas ductales; los que se cree que se originan de los lóbulos se conocen como carcinomas lobulares.

30 Los carcinomas de mama de tipo basal (BLC) se describen en general como carcinomas ductales de alto grado, que tienen el denominado fenotipo triple negativo (TNBC) (ausencia de receptor de estrógenos [RE], receptor de progesterona [RP] y sobreexpresión de HER2/ERBB2) y caracterizados por los marcadores expresados por las células basales/mioepiteliales normales de la glándula mamaria (tales como citoqueratinas 5/6, 14, 17 y EGFR (para revisión,<sup>1,2</sup>)).

35 El gen de susceptibilidad a cáncer de mama *BRCA1* tiene una conexión particular con el fenotipo de tipo basal: en primer lugar, los BLC representan la mayoría de carcinomas de mama que se desarrollan en portadores de mutación de *BRCA1*, mientras que son menos del 20 % en un contexto esporádico<sup>3</sup>, en segundo lugar, el alto nivel de inestabilidad genómica observado en BLC<sup>4-6</sup> está en línea con la implicación de *BRCA1* en señalización de rotura de doble cadena (DSB) y reparación por recombinación homóloga (RH) (para revisión,<sup>7,8</sup>). Sin embargo, ya que la deficiencia en RH (denominada BRCAdad) se ha propuesto como un elemento general de BLC<sup>9</sup>, se ha descubierto que distintivos tales como inactivación de *BRCA1*, alto nivel de inestabilidad genómica y respuesta potencialmente terapéutica al tratamiento que aprovechan la deficiencia en RH, son relevantes para solamente la mitad de BLC (o TNBC).<sup>10-15</sup>

45 Considerando su importancia en el diagnóstico y estratificación terapéutica, numerosos estudiosos han intentado definir marcadores afines clínicamente relevantes de BRCAdad (para revisión,<sup>16</sup>). Se buscaron principalmente marcadores genómicos de BRCAdad comparando perfiles de matriz-CGH de *BRCA1* mutado frente a tumores de mama hereditarios o esporádicos no seleccionados.<sup>17-21</sup> Estudios que comparaban BLC con o sin inactivación de *BRCA1* no encontraron ninguna diferencia<sup>11,22,23</sup> o identificaron ganancia de 3q como asociada con inactivación de *BRCA1*<sup>12</sup>. El clasificador de matriz-CGH entrenado con tumores con *BRCA1* mutado dentro del grupo no seleccionado de tumores<sup>24</sup> mostró aproximadamente 80 % de sensibilidad en los subgrupos de TNBC en dos estudios independientes.<sup>25,26</sup>

50 Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha en la técnica de métodos para marcadores genómicas que predigan la inactivación de *BRCA1* real dentro del grupo de carcinomas de mama de tipo basal y otros cánceres.

55 Recientemente, Birkbak *et al.* han descrito un método para predecir la reparación de ADN defectuosa y respuesta a agentes perjudiciales para el ADN<sup>60</sup>. Este método, denominado desequilibrio alélico telomérico (DAT) se basa en el número de desequilibrios alélicos que se extienden al extremo telomérico del cromosoma. El principal problema de este enfoque es que tiene en cuenta solamente roturas cromosómicas que conducen a desequilibrio alélico telomérico. Por lo tanto, muchas roturas cromosómicas no contribuirán a la puntuación, alterando su robustez. Otra salvedad es que el desequilibrio alélico o la pérdida de heterocigosidad de cromosomas evita la detección de desequilibrio alélico telomérico.

65 Otra tecnología reciente, publicada como el documento US2012/0015050 (Abkevich), se centra en la pérdida de heterocigosidad como un posible marcador predictivo de defectos de reparación homólogos en cáncer ovárico epitelial. Estos autores proponen calcular la puntuación de Deficiencia de Recombinación Homóloga (o "puntuación

de DRH”), que tiene en cuenta el número de regiones en las que hay una pérdida de heterocigosidad (es decir, solamente está presente uno de los alelos). Esta puntuación no tiene en cuenta los puntos de rotura cromosómicos o reordenaciones que dan como resultado desequilibrio alélico.

## 5 Objeto de la invención

Los inventores han descubierto que las roturas de cromosomas a gran escala son fuertemente predictivas de deficiencia de Recombinación Homóloga (RH), sea cual sea el mecanismo de inactivación.

10 Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un método para predecir deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN en un paciente que padece cáncer, que comprende la etapa de cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente, en el que el número de reordenaciones corresponde al número, por genoma, de puntos de rotura que dan como resultado segmentos de al menos 3 megabases, preferentemente al menos 4 megabases, aún más preferentemente al menos 5, 6, 7, 8 9, 10, 15 11 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 megabases.

La invención también se refiere a un método para predecir la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece cáncer, en el que dicho tratamiento comprende un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante, y en el que dicho método comprende la etapa que consiste en predecir la deficiencia en la ruta de RH como se ha descrito anteriormente.

La invención también se refiere a un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante para su uso en un método para tratar cáncer en un paciente en el que dicho cáncer está ligado a deficiencia en la ruta de RH.

25 La invención también se refiere a un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante, en el que dicho paciente se ha clasificado como poseedor de una deficiencia en la ruta de RH como se ha descrito anteriormente.

## Descripción detallada de la invención

### 30 Métodos para predecir la deficiencia en la ruta de recombinación homóloga de ADN

En un aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN en un paciente que padece cáncer, que comprende la etapa de cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente, en el que el número de reordenaciones corresponde al número, por genoma, de puntos de rotura que dan como resultado segmentos de al menos 3 megabases, preferentemente al menos 4 megabases, aún más preferentemente al menos 5, 6, 7, 8 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 megabases.

40 Típicamente, el método de la invención comprende la etapa de comparar el número de reordenaciones por genoma con un umbral, en el que un número de reordenaciones por genoma superior a dicho umbral es indicativo de deficiencia en RH.

45 Como se usa en el presente documento, el término “paciente” indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, un bovino, un equino, una oveja, un porcino y un primate. Preferentemente, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

Los inventores han observado que tumores de pacientes que padecen mutaciones del *BRCA1* u otras deficiencias en la ruta de Recombinación Homóloga de ADN se caracterizan por un genoma que contiene mayor número de puntos de rotura que muestras de control o tumores de pacientes que padecen cánceres que no implican la ruta de RH.

Más específicamente, los inventores han demostrado que los puntos de rotura relevantes son los que dan como resultado segmentos de ADN genómico de al menos 10 megabases. De acuerdo con la invención, los puntos de rotura que dan como resultado segmentos más pequeños no se tienen en cuenta.

55 Sin desear quedado ligado a la teoría, los inventores creen que, eliminando los puntos de rotura que dan como resultado segmentos de menos de 3 megabases, preferentemente de menos de 4 megabases, aún más preferentemente de menos de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 megabases el número resultante de puntos de rotura (o transiciones a gran escala) es una medición más precisa de la inestabilidad genómica relacionada con deficiencia de recombinación homóloga. Otros puntos de rotura con concentración local no están correlacionados con el estado de recombinación homóloga.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión “ruta de recombinación homóloga (RH) del ADN” tiene su significado general en la técnica. Se refiere a la ruta a través de la que se separan roturas de ADN de Doble Cadena (DSB) por un mecanismo denominado Recombinación Homóloga.

Dentro de células de mamífero, el ADN se expone continuamente al daño que surge de fuentes exógenas tales como radiación ionizante o fuentes endógenas tales como productos secundarios de la replicación celular. Todos los organismos han desarrollado diferentes estrategias para tratar estas lesiones. Una de las formas más deletéreas del daño de ADN es DSB. En células de mamífero, hay dos rutas principales para reparar DSB: recombinación homóloga (RH) y Unión de Extremos No Homólogos (UENH). La RH es el mecanismo más preciso para reparar DSB debido a que usa una copia intacta del ADN de la cromátida hermana o el cromosoma homólogo como una matriz para reparar la rotura.

Los BRCA1, BRCA2, PALB2/FANCN, BRIP1/FANCJ, BARD1, RAD51 y parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) son proteínas que son importantes para la reparación de roturas de ADN bicatenarias mediante esta ruta de RH sin errores. Cuando el gen para una de las proteínas se mute, o cuando uno de los genes es infra-expresado, el cambio puede conducir a errores en la reparación de ADN que pueden con el tiempo provocar cáncer. Aunque aún no se han encontrado mutados de forma recurrente en tumores humanos, otros participantes en la ruta de la RH pueden estar potencialmente desregulados en cánceres, tales como FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAN1, SLX4/FANCP o ERCC1.

Por lo tanto, la expresión “deficiencia en la ruta de RH”, como se usa en el presente documento, se refiere a una condición en la que una o varias de las proteínas implicadas en la ruta de la RH para reparar ADN son deficientes o están inactivadas.

Abarca, pero sin limitación, la inactivación de al menos de uno de los siguientes genes: BRCA1, BRCA2, PALB2/FANCN, BRIP1/FANCJ, BARD1, RAD51, parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3), FANCA, FANCB, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCG, FANCI, FANCL, FANCM, FAN1, SLX4/FANCP y ERCC1.

Como se usa en el presente documento las expresiones “deficiencia en la ruta de RH” o “deficiencia tumoral en la ruta de RH” se usan indistintamente. De hecho, se refiere al estado genético de las células tumorales. Sin embargo, en el caso de mutaciones de línea germinal, dichas mutaciones pueden encontrarse por todo el genoma completo del paciente.

Como se usa en el presente documento, el término “inactivación”, cuando hace referencia a un gen, puede significar cualquier tipo de deficiencia de dicho gen. Abarca mutaciones de línea germinal en la secuencia codificante, mutaciones somáticas en la secuencia codificante, mutaciones en el promotor y metilación del promotor.

En una realización de la invención, la deficiencia en la ruta de RH es una mutación de *BRCA1*. Se han descrito ya varias mutaciones de *BRCA1* en la técnica y se sabe que están asociadas con ciertos tipos de cáncer, tales como cánceres de mama y de ovario<sup>55</sup>.

En otra realización de la invención, la deficiencia en la ruta de RH es una mutación de *BRCA2*<sup>56</sup>.

En otra realización más de la invención, la deficiencia en la ruta de RH es hipermetilación del promotor de *BRCA1*<sup>57</sup>. Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” tiene su significado general en la técnica. Se refiere a la condición patológica en mamíferos que se caracteriza por crecimiento celular desregulado.

Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos o un carcinoma. Preferentemente, el tumor sólido se selecciona de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer renal, melanoma maligno metastásico o invasivo, tumor cerebral, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de hígado. El carcinoma incluye carcinoma de vejiga, de mama, de colon, de riñón, de hígado, de pulmón, de ovario, de páncreas, de estómago, del cuello uterino, del tiroides o de la piel, incluyendo carcinoma de células escamosas. Sin embargo, la presente invención también contempla tumores hematopoyéticos tales como leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma por tricoleucitos, linfoma de Burkitt, leucemias mielógenas aguda y crónica y leucemia promielocítica.

En una realización, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello y melanoma.

En una realización preferida, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de páncreas y cáncer de pulmón.

En una realización más preferida, dicho cáncer es un cáncer de mama.

La muestra tumoral adecuada para llevar a cabo el método de la invención es típicamente una biopsia obtenida del tejido u órgano enfermo del paciente que padece cáncer.

#### Quantificación del número de reordenaciones

La etapa de cuantificar el número de reordenaciones por genoma en el ADN genómico de la muestra tumoral puede realizarse por cualquier método adecuado en la técnica.

5 Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han demostrado que los puntos de rotura relevantes son los que dan como resultado segmentos de ADN genómico de al menos 3 megabases. De hecho, se han descrito en los ejemplos posteriores puntos de corte preferidos comprendidos entre 9 y 11, aún más preferentemente aproximadamente 10 megabases, pero se obtuvieron resultados similares con valor de punto de corte entre 3 megabases y 20 megabases. De acuerdo con la invención, los puntos de rotura que dan como resultado segmentos de menos de estos puntos de corte no se tienen en cuenta.

10 El experto en la materia puede seleccionar fácilmente cualquier método para cuantificar reordenaciones genómicas y filtrar los puntos de corte que den como resultado segmentos de ADN genómico de menos de 3, preferentemente menos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 megabases.

15 En una realización, la etapa de cuantificación de reordenaciones se llevó a cabo por técnicas de secuenciación, tales como secuenciación de siguiente generación usando bibliotecas emparejadas, o lecturas más largas.<sup>58</sup>

20 En otra realización, la etapa de cuantificar reordenaciones se realiza cuantificando el número de variaciones del número de copias por genoma. Típicamente, esto puede realizarse mediante técnicas de hibridación tales como matriz de hibridación genómica comparativa (CGH) y matriz de Polimorfismo de un Único Nucleótido (SNP).

25 Los métodos adecuados para cuantificar reordenaciones incluyen, pero sin limitación, los descritos en Scouarnec y Gribble, Heredity, 2012, 108, 75-85.

#### 25 Evaluación de la ploidía

30 En una realización, el método de la invención comprende además una etapa en la que se evalúa la ploidía de la muestra tumoral.

35 Como se usa en el presente documento, el término "ploidía" tiene su significado general en la técnica. Se refiere al número medio de copias de cada locus en el genoma.

Típicamente, una célula sana (y por lo tanto una muestra tisular sana) es disploide, es decir, contiene dos copias/dos alelos de cada locus.

40 Sin desear quedado ligado a la teoría, se cree que ciertos tipos de cáncer se caracterizan por duplicación de genoma completo durante la progresión del cáncer, dando como resultado células tumorales sobre-diploides (tetraploides o más) (Ref 40).

45 Las muestras tumorales pueden dividirse en tumores diploides o tumores casi diploides por un lado y tumores sobre-diploides por otro.

Los inventores han observado que los genomas de tumores casi diploides se asociaron en más del 75 % de los casos con inactivación de BRCA1 (por mutación o por metilación del promotor).

50 Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que los tumores diploides o casi diploides son altamente predictivos de tumores deficientes en RH, al menos en carcinoma de mama de alto grado.

Típicamente, se considera que un tumor es "diploide o casi diploide" si el genoma de dicho tumor porta en promedio menos de 50 cromosomas y/o si tiene un índice de ADN cercano a 1.

Típicamente, un tumor se considera "sobre-diploide" si su genoma aporta más de o igual a 50 cromosomas y/o tiene un índice de ADN mayor de 1,2.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "índice de ADN" representa la relación de contenido de ADN de la célula tumoral y contenido de ADN de una célula normal.

60 El experto en la materia puede evaluar la ploidía de una muestra tumoral de acuerdo con cualquier técnica convencional en este campo. Las técnicas adecuadas para evaluar la ploidía incluyen, pero sin limitación:

- Medir la cantidad de ADN por célula, por ejemplo mediante Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia.

65 En esta técnica, el ADN se marca por incorporación de un agente intercalante tal como bromuro de etidio o DAPI. Las células se clasifican después según la intensidad de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN en cada célula.

- cariotipado,

Pueden obtenerse cariotipos convencionales tiñendo los cromosomas (con tinciones tales como Giemsa) y contando el número de cromosomas de cada tipo en una célula.

- cariotipado virtual usando matrices tales como matriz-CGH o matriz de Polimorfismos de un Único Nucleótido (matriz SNP).

Las matrices en sí mismas pueden ser de todo el genoma (sondas distribuidas sobre el genoma completa) o dirigidas (sondas para regiones genómicas que se sabe que están implicadas en una enfermedad específica) o una combinación de ambas. Además, las matrices usadas para cariotipado pueden usar sondas no polimórficas, sondas polimórficas (es decir, que contienen SNP) o una combinación de ambas. Las sondas no polimórficas pueden proporcionar solamente información del número de copias, mientras que las matrices de SNP pueden proporcionar tanto el número de copias como el estado de pérdida de heterocigosidad (LOH) en un ensayo. Las matrices de SNP de oligonucleótidos disponibles en el mercado pueden ser de fase sólida (Affymetrix, Santa Clara, CA, Estados Unidos) o basadas en perlas (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). A pesar de la diversidad de plataformas, en última instancia todas usan ADN genómico de células alteradas para recrear un cariotipo de alta resolución por ordenador. El producto final no tiene aún un nombre uniforme, y se ha denominado cariotipado virtual, cariotipado digital, alelocariotipado molecular y cariotipado molecular. Otros términos usados para describir las matrices usadas para cariotipado incluyen SOMA (micromatrices de oligonucleótidos de SNP) y CMA (micromatriz de cromosomas).

- Secuenciación de siguiente generación

Están disponibles métodos de alto rendimiento para la secuencia del genoma o la región codificante completa. Los enfoques de secuenciación profunda de exoma o genoma completo pueden generar perfiles de número de copias y desequilibrio alélico similares a o incluso más precisos que las matrices de SNP. [http://en.wikipedia.org/wiki/Virtual\\_Karyotype](http://en.wikipedia.org/wiki/Virtual_Karyotype) - cite\_note-14#cite\_note-14

Según una realización de la invención, la etapa de evaluar la ploidía de la muestra tumoral se lleva a cabo por una técnica seleccionada del grupo que consiste en FACS, cariotipado y matriz de SNP.

En una realización, tanto la etapa de evaluar la ploidía como la etapa de cuantificar el número de reordenaciones a gran escala se realizan por matriz de SNP.

En una realización preferida, tanto la etapa de evaluar la ploidía como la etapa de cuantificar el número de reordenación a gran escala se realizan por matrices de SNP, seguido de análisis de GAP.

La Impresión de Alteración Genómica (GAP) es una herramienta bioinformática que se ha desarrollado por Popova *et al.* (Genome Biology, 2009, 10:R128) para detección automática de números de copias segmentales absolutos y estado de genotipo en perfiles de genoma de cáncer complejos medidos con matriz de SNP. Este método rinde bien incluso para datos de poca calidad, bajo contenido tumoral y genomas tumorales altamente reordenados.

#### Método de dos etapas

En una realización de la invención, el método comprende la etapa de comparar el número de reordenaciones por genoma con un umbral, en el que un número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 3 megabases (preferentemente al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20) superiores a dicho umbral es indicativo de deficiencia en RH.

Típicamente, el umbral puede tener diferentes valores, dependiendo de la ploidía del tumor.

Por lo tanto, en una realización preferida, el método comprende la etapa de comparar el número de reordenaciones en el ADN genómico con un umbral, en el que dicho umbral tiene un primer valor (umbral1) si el tumor es diploide o casi diploide y en el que dicho umbral tiene un segundo valor (umbral2) si el tumor es sobre-diploide.

Típicamente, el umbral1 (como se determina usando segmentos de más de 10 megabases, siendo el valor umbral dependiente del tamaño de segmento elegido) puede ser de 15 Transiciones a Gran Escala (LST) por genoma, preferentemente 16, aún más preferentemente 17, 18, 19 o 20 LST por genoma.

Típicamente, el valor del umbral1 puede variar, dependiendo de cómo se define el número de reordenaciones o LST. Por lo tanto, en una realización de la invención, el umbral 1 para tumores diploides o casi diploides se define de la siguiente manera:

- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 6 megabases, el umbral1 puede ser 17, 18 o 19;

- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 7 megabases, el umbral1 puede ser 15, 16 o 17;
- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 8 megabases, el umbral1 puede ser 14;
- 5 - si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 9 megabases, el umbral1 puede ser 11, 12, 13 o 14;
- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 10 megabases, el umbral1 puede ser 11.

10 Típicamente, el umbral2 (como se determina usando segmentos de más de 10 megabases, siendo el valor umbral dependiente del tamaño de segmento elegido) puede ser de 20 Transiciones a Gran Escala (LST) por genoma, preferentemente 21, aún más preferentemente 22, 23, 24 o 25 LST por genoma.

15 Típicamente, el valor del umbral2 puede variar, dependiendo de cómo se define el número de reordenaciones o LST. Por lo tanto, en una realización de la invención, el umbral 2 para tumores sobre-diploides se define de la siguiente manera:

- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 6 megabases, el umbral1 puede ser 32;
- 20 - si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 7 megabases, el umbral1 puede ser 27, 28 o 29;
- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 8 megabases, el umbral1 puede ser 26;
- 25 - si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 9 megabases, el umbral1 puede ser 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25;
- si el número de LST se define como el número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 10 megabases, el umbral1 puede ser 18, 19, 20, 21, 22.

30 Queda dentro de la capacidad del experto en la materia determinar los umbrales óptimos, dependiendo del tamaño de las LST, para alcanzar una especificidad y sensibilidad óptimas según el tipo tumoral. Por ejemplo, los umbrales óptimos para carcinoma de mama son 7/17/29, 8/14/26, 9/14/29 o 10/11/22, mientras que el umbral óptimo en carcinoma ovárico es 6/19/32 o 7/17/29 (número de LST/umbral1/umbral2).

35 De hecho, los inventores han descubierto que una norma de decisión de 2 etapas, en la que los pacientes se clasifican según la ploidía del tumor, y según el número de transiciones a gran escala en el genoma tumoral, fue capaz de predecir correctamente tumores deficientes en RH.

La invención se refiere por lo tanto a un método que comprende las etapas de:

- 40 - determinar la ploidía del tumor;
- comparar el número de reordenaciones por genoma con un umbral, en el que un número de reordenaciones que dan como resultado segmentos de al menos 3 megabases superior a dicho umbral es indicativo de deficiencia en RH.

45 Provechosamente, el método de acuerdo con la invención es capaz de predecir la deficiencia en la ruta de RH con buena especificidad (pocos falsos positivos) y buena sensibilidad (pocos falsos negativos).

Métodos para predecir la eficacia de un tratamiento y métodos de tratamiento

50 El método descrito anteriormente tiene varias aplicaciones clínicas importantes y directas.

En primer lugar, el perfil genómico tumoral puede usarse ahora como criterio para ensayos y consejo genético. Esto es especialmente importante en ausencia de contexto familiar de predisposición tumoral, una situación hallada en hasta la mitad de pacientes portadores de mutación<sup>53</sup>.

55 En segundo lugar, con la perspectiva terapéutica emergente que aprovecha los defectos en RH dirigiéndose a las rutas complementarias (por ejemplo, inhibidores de PARP (PARPi)<sup>13</sup>, y agentes alquilantes, que provocan daño de ADN), la cuestión de marcadores predictivos eficaces de BRCA<sup>16</sup> o deficiencia en RH se hace importante. La decepcionante eficacia de PARPi en BLC/TNBC no seleccionado<sup>54</sup> apoya la necesidad de estratificar mejor a los  
60 pacientes, lo que podría implementarse fácilmente usando este marcador basado en matriz de SNP.

Ya que es posible predecir si un paciente dado padece un cáncer que está asociado con deficiencia en la ruta de recombinación homóloga del ADN, también es posible seleccionar la terapia apropiada para dicho paciente.

65 De hecho, se cree que un tratamiento que provoque roturas de doble cadena en el ADN (tales como agentes alquilantes) o un tratamiento que inhiba la ruta de reparación de ADN alternativa (tal como PARPi) será más eficaz si

el tumor es deficiente para la ruta de RH.

Además, los inventores han mostrado que el número de LST es un buen predictor de respuesta al tratamiento con un agente alquilante tal como cisplatino (véase Ejemplo 3).

Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para predecir la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece cáncer, en el que dicho tratamiento comprende un PARPi y/o un agente alquilante, y en el que dicho método comprende la etapa que consiste en predecir la deficiencia en la ruta de RH como se ha descrito anteriormente.

La invención también se refiere a un PARPi y/o un agente alquilante para su uso en un método para tratar cáncer en un paciente en el que dicho cáncer está ligado a deficiencia en la ruta de la RH.

Como se usa en el presente documento la expresión "inhibidor de PARP" tiene su significado en general de la técnica. Se refiere a un compuesto que es capaz de inhibir la actividad de la enzima poliADP ribosa polimerasa (PARP), una proteína que es importante para reparar roturas monocatenarias ("muescas" en el ADN). Si dichas muescas persisten sin reparación hasta que se replique el ADN (lo que debe preceder a la división celular), entonces la replicación en sí misma provocaría la formación de roturas de doble cadena. Los fármacos que inhiben PARP provocan la formación de múltiples roturas bicatenarias de esta manera, y en tumores con mutaciones de BRCA1, BRCA2 o PALB2 estas roturas de doble cadena no pueden repararse eficazmente, lo que conduce a la muerte de las células.

Típicamente, el inhibidor de PARP de acuerdo con la invención puede seleccionarse del grupo que consiste en iniparib, olaparib, rucaparib, CEP 9722, MK 4827, BMN-673 y 3-aminobenzamida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente alquilante" o "agente antineoplásico alquilante" tiene su significado general en la técnica. Se refiere a compuestos que unen un grupo alquilo con ADN.

Típicamente, el agente alquilante de acuerdo con la invención puede seleccionarse de complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, clometina, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, ifosfamida, estramustina, carmustina, lomustina, fotemustina, estreptozocina, busulfán, pipobromán, procarbazona, dacarbazina, tiotepa y temozolomida.

La invención también se refiere a un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante, en el que dicho paciente se ha clasificado como poseedor de una deficiencia en la ruta de la RH como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende las etapas de:

- cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicha paciente, en el que el número de reordenaciones corresponde al número, por genoma, de puntos de rotura que dan como resultado segmentos de al menos 3 megabases, preferentemente al menos 4 megabases, aún más preferentemente al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 megabases.
- comparar dicho número de reordenaciones con un umbral predeterminado;
- administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante, si dicho paciente tiene varias reordenaciones superiores a dicho umbral.

Como se ha explicado anteriormente, dicho umbral puede diferir, dependiendo de si el tumor es un tumor diploide o casi diploide, o más bien un tumor sobre-ploide.

Dicho umbral también puede diferir, dependiendo del tamaño mínimo de los segmentos que se tienen en cuenta para determinar el número de reordenaciones (o "LST").

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente que aumenta el nivel de desoxiuridina se entiende una cantidad suficiente para tratar el cáncer, a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de un agente que aumente el nivel de desoxiuridina será decidido por el médico a cargo dentro del alcance del criterio médico razonable. La dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier sujeto particular que lo necesite dependerá de diversos factores incluyendo otros marcadores de predisposición al cáncer, factores de riesgo relacionados con el estilo de vida y la actividad del agente específico que aumenta el nivel de desoxiuridina para usar, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de administración, la vía de administración, la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de PARP y/o un agente

alquilante para usar en un método del tratamiento del cáncer en un paciente, en el que dicho cáncer está ligado a deficiencia en la ruta de RH.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o mucosa, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublinguales y orales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectal.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parental, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación temporalizada; y cualquier otra forma usada en la actualidad.

En una realización, el inhibidor de PARP y/o agente alquilante se administra en combinación con otro agente activo.

Típicamente, el inhibidor de PARP y el otro agente activo pueden formularse por separado. Como alternativa, pueden formularse juntos en una composición farmacéutica.

En una realización, el inhibidor de PARP y/o agente alquilante se administra a un paciente que se somete a radioterapia y/o cirugía para retirar el tumor.

La invención se describirá además por los siguientes ejemplos y figuras, que no se pretende que limiten el alcance de la protección definida por las reivindicaciones.

### Descripción de las figuras

**Figura 1.** Contenido de cromosoma y estado de BRCA1 en BLC. A. La distribución del contenido de cromosoma en el conjunto de BLC presentó dos modos, lo que demuestra 2 poblaciones de tumores con diferente estado de ploidía. B. Los tumores casi diploides (<50 cromosomas) y tumores sobre-diploides ( $\geq 50$  cromosomas) mostraron diferentes proporciones de tumores con *BRCA1* inactivado demostrados. WT corresponde a no *BRCA1*.

**Figura 2.** Inestabilidad genómica en BLC sobre-diploides como se estima por el número total de roturas y por LST. El número de LST diferenció claramente BLC no *BRCA1* de BLC con inactivación de *BRCA1* demostrada ( $p$ -valor<0,001, ensayo de Wilcoxon). El número total de roturas fue menos significativamente diferente entre comparación de no *BRCA1* frente a *BRCA1* y *meBRCA1* ( $p$ -valor<0,03, ensayo de Wilcoxon) y no fue diferenciador. *BRCA1*: mutación de *BRCA1* de línea germinal; *meBRCA1*: metilación de promotor de *BRCA1*; esporádico = sin *BRCA1*: ausencia de pruebas de inactivación de *BRCA1*.

**Figura 3.** La ploidía tumoral y el número de transiciones a gran escala (LST) son diferenciadores de la inactivación de *BRCA1* en los conjuntos experimental (izquierda) y de validación (derecha). Panel superior: el número de LST por tumor está indicado en relación con categorías de ploidía. Los puntos de corte casi diploides y casi tetraploides están indicados por una barra. Los estados de *BRCA1* y *BRCA2* conocidos se indican para mutaciones de línea germinal ("*BRCA1*" y "*BRCA2*"), metilación del promotor de *BRCA1* ("*meBRCA1*") y mutaciones en los tumores ("*tumBRCA1*"). Los tumores sin pruebas de inactivación de *BRCA1/2* se indican como "no *BRCA1*". Los ensayos exactos de Fisher se indican debajo de las tablas de contingencia; *BRCA1* se refiere a todos los BLC con *BRCA1* inactivado demostrados, no *BRCA1* se refiere a BLC sin pruebas de inactivación de *BRCA1*.

**Figura 4. Evaluaciones genómicas y funcionales de la BRCAdad en líneas celulares de tipo basal.** A. Las líneas celulares con fenotipo de tipo basal presentan características diferenciadoras de BRCAdad similares a BLC primarios. El estado conocido para *BRCA1* y *BRCA2* se indica para mutaciones de línea germinal ("*BRCA1*" y "*BRCA2*") y metilación del promotor de *BRCA1* ("*meBRCA1*"). Las líneas celulares sin pruebas de inactivación de *BRCA1/2* se describen como "no *BRCA1/2*". B. La formación de focos de RAD51 8 horas después de irradiación de 10 Gy ilustra la recombinación homóloga (RH) activa en líneas celulares no *BRCA1*, y por el contrario RH deficiente en líneas celulares mutadas para *BRCA1* o *BRCA2*. Los focos de 53BP1 en el mismo

experimento se muestran como un control para respuesta a daño de ADN. Barras de escala, 20  $\mu$ m). Se indica el número de LST así como el estado de BRCA1/2; mut, mutado; me, metilación del promotor; wt, tipo silvestre.

5 **Figura 5. Curvas de supervivencia para tumores ováricos con LST\_alta y LST\_baja.** Se estimó el p-valor mediante estadístico de ensayo de rangos logarítmicos.

**Figura 6. Curvas de supervivencia sin acontecimientos para tumores ováricos con LST\_alta y LST\_baja.** El p-valor se estimó por el estadístico de ensayo de rangos logarítmicos.

10 **Figura 7. LST\_10Mb en líneas celulares tumorales.**  
La ploidía calculada se indica (2N pseudo-diploide, 4N pseudo-tetraploide). Triángulo: estado de BRCA1/2 de tipo silvestre o desconocido; cuadrado: líneas celulares mutadas para BRCA2.

## Ejemplos

### 15 EJEMPLO 1

#### Materiales y métodos

#### 20 Pacientes y tumores

Se ensambló una serie de 3 BLC de grado indiferenciado de pacientes que se habían sometido a cirugía en el Institut Curie. Según las normas francesas se informó a los pacientes de la investigación y no expresaron oposición. Estuvo disponible material biológico de alta calidad en el banco biológico del Institut Curie para 85 muestras tumorales (algunas muestras se han descrito previamente)<sup>28-30</sup>. Esta serie se enriqueció con respecto a tumores que surgían en pacientes que portaban mutaciones de *BRCA1* deletéreas (35 tumores).

#### Inmunohistoquímica

30 Se realizó inmunotinción en secciones tisulares de 4  $\mu$ m como se ha descrito previamente:<sup>28,29</sup> ER, PR y ERBB2 (Novocastra), EGFR y KRT8/18 (Zymed, Invitrogen), KRT5/6 (Dako) y KRT14 (Biogenex). La positividad para cada marcador se determinó según directrices normalizadas.<sup>31</sup> La negatividad se definió como ausencia total de tinción para expresión de RE y RP, y como menos de 2+ de tinción para ERBB2.

35 El fenotipo de tipo basal se definió según criterios morfológicos, fenotípicos y/o moleculares incluyendo i) alto grado (clasificación de Elston-Ellis) y márgenes cercanos, ii) fenotipo triple negativo y expresión de KRT5/6/14/17 o EGFR evaluada por inmunohistoquímica.<sup>32</sup>

#### 40 Estado de metilación del promotor de *BRCA1*

La metilación del promotor de *BRCA1* se evaluó mediante PCR específica de metilo (PEM) después de conversión por bisulfito como se ha descrito previamente,<sup>33</sup> con modificaciones menores (secuencias de cebadores y protocolos están disponibles a petición).

#### 45 Estado de mutación de *BRCA1*

Se realizó pre-exploración para mutaciones del gen *BRCA1* usando Análisis de Mutación de Desapareamiento Potenciada (EMMA, Fluigent<sup>34</sup>; software EMMALYS P/N: 5331254102). Para perfiles de EMMA anómalos, los exones de *BRCA1* en cuestión se secuenciaron con didesoxinucleótidos (BigDye Terminator V1.1, Applied Biosystems, Foster City, CA), según protocolos convencionales (las secuencias de cebadores y protocolos están disponibles a petición). Las secuencias se examinaron con el Seqscape V2.5 (Applied Biosystems).

#### Análisis de datos transcriptómicos

55 Se obtuvieron datos transcriptómicos en la plataforma Affymetrix U133plus2 en el Institut Curie según el protocolo convencional. Se realizó normalización con el algoritmo BrainArray<sup>35</sup>. Se realizó agrupamiento no supervisado basándose en la identificación intrínseca<sup>36</sup>.

#### 60 Procesamiento de los perfiles genómicos

Se realizó el perfil genómico de 85 BLC usando dos plataformas: Illumina (Illumina SNP HapMap 300K Duo, 33 casos) y Affymetrix (Affymetrix SNP Chip 6.0, 52 casos).

65 *Plataforma Illumina:* Se realizó perfil genómico de las muestras tumorales por un proveedor de servicios (Integragen, Evry, Francia) en matrices de SNP Illumina 300K (Hap300-Duo humano). Los archivos de datos en bruto se procesaron por BeadStudio 3.3 en ajustes convencionales usando datos de apoyo proporcionados por Illumina

(HumanHap300v2\_A). Se procesaron señales específicas de alelo (X e Y en notación de BeadStudio) en relación de Log R y frecuencia de alelos B mediante el algoritmo tQN.<sup>37</sup>

*Plataforma de Affymetrix:* Se realizó hibridación en el Institut Curie en matriz de Affymetrix SNPChip6.0. Se procesaron los archivos de células mediante Genotyping Console 3.0.2. Los perfiles de relación Log2 y Diferencia de Alelos resultó del análisis del Número de Copias y LOH realizados con el archivo modelo de referencia HapMap270 (GenomeWideSNP\_6.hapmap270.na29) proporcionado por Affymetrix.

*Control de calidad:* Se descartaron 20 matrices de SNP debido a: baja calidad de hibridación (3 matrices); bajo contenido tumoral y/o interpretación de perfil ambigua (17 matrices). *Número de copias segmental y detección de genotipo:* Se extrajeron datos de matrices de SNP tanto de Illumina como de Affymetrix usando el método de GAP descrito y validado previamente: se detectaron números de copias segmentales, contenidos alélicos (recuentos de alelos importantes) y contaminación de células normales; las segmentaciones se optimizaron con respecto al estado genómico detectado.<sup>27</sup>

El reconocimiento del número de copias absoluto varió de 0 a 8 copias aplicándose a todos los segmentos que superaban el nivel de 8 copias el estado de 8 copias. Por lo tanto, se diferenciaron 22 posibles genotipos segmentales (número de copias / recuento de alelos principales): 1 copia A (o 1/1); 2 copias AA (2/2) y AB (2/1); 3 copias AAA (3/3), AAB (3/2); 4 copias AAAA (4/4), AAAB (4/3), AABB (4/2), etc.

*Número de cromosomas:* El número de cromosomas se estimó por la suma de los números de copias detectados en las regiones pericéntricas. El estado de la región pericéntrica de cada rama de cromosoma se definió por el segmento yuxtacentromérico correspondiente cuando este último contenía 500 SNP o más. Cuando no fueron medible, los valores ausentes se sustituyeron por el número de copias modal de la rama de cromosoma considerada (3,4±2,2 de 41 ramas de cromosoma por genoma se sustituyeron en la serie). Se validó el procedimiento de recuento de cromosomas comparando los números de cromosomas estimados frente a los números disponibles de cariotipo de datos de SKY para 25 líneas celulares de cáncer de mama {<http://www.lgcstandardsatcc.org/>}. La tasa de error fue de menos de 2 cromosomas por muestra (1,58±2,3).

*Recuentos de puntos de rotura:* El número de puntos de rotura en cada perfil genómico se estimó basándose en el perfil de número de copias interpretable resultante y después de filtrar variación de menos de 50 SNP. Las alteraciones intersticiales pequeñas se definieron como alteraciones <3 Mb rodeadas por los segmentos con estado idéntico para el genotipo y el número de copias. Se retiraron cuando se estimó el número total de puntos de rotura. Se calcularon las Transiciones de Estado a Gran escala (LST) después de suavizar y filtrar la variación de menos de 3 Mb de tamaño.

### Compilación de conjuntos de validación

La serie de validación comprende 55 muestras que incluyen TNBC de una cohorte de mujeres jóvenes con cáncer de mama (17 casos); BLC con elementos medulares (8 casos) y un BLC que surgió en un portador de mutación de *BRCA2*; BLC *BRCA1* de GEO GSE19177 (12 casos)<sup>38</sup>; tumores de tipo basal de GEO GSE32530 (4 casos)<sup>39</sup>; BLC *BRCA1* de Institut Bergonié (5 casos).

Las líneas celulares de tipo basal con perfil de matrices de SNP disponible comprendían 17 casos (15 casos hibridados en el Institut Curie y se obtuvieron 2 casos del sitio web del Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project).

### Resultados

#### Estado de *BRCA1* de carcinomas de tipo basal (BLC)

Una serie de 65 carcinomas de mama de tipo basal bien caracterizados incluían 23 tumores que aparecieron en pacientes que portaban mutaciones de *BRCA1* deletéreas (denominados en el presente documento "BLC *BRCA1*") y 42 BLC que aparecieron en pacientes sin pruebas de predisposición familiar de cáncer de mama/ovárico o que tuvieron resultados negativos para mutaciones de *BRCA1/2* (denominados en el presente documento "BLC esporádicos"). Los BLC esporádicos se ensayaron con respecto a la metilación del promotor de *BRCA1* y se descubrió que casi el 25 % eran positivos (11 de 41 ensayados, denominado en el presente documento "BLC *meBRCA1*"). No se descubrió ninguna prueba de metilación en los 31 casos restantes. Se confirmó el estado de *BRCA1* por la expresión génica en 35 de 36 casos ensayados con datos transcriptómicos disponibles. Los BLC *BRCA1* y *meBRCA1* comprenden el grupo de tumores con inactivación de *BRCA1* demostrada (34 casos), que se compararon adicionalmente con el grupo de BLC supuestamente no *BRCA1* (31 casos).

#### La casi diploidía en BLC tiene 75 % de valor predictivo positivo de inactivación de *BRCA1*

Para obtener información sobre las alteraciones genómicas específicas de BLC, se realizó un perfil genómico usando matrices de SNP, que proporcionan dos mediciones complementarias: variación del número de copias y

desequilibrio alélico. La metodología de Impresión de Alteración Genómica (GAP) para extraer datos de matrices de SNP<sup>27</sup> permitió a los inventores obtener los perfiles genotípicos segmentarios (es decir, números de copias exactos y contenidos alélicos: A, AB, AA, AAB, AAA,...) para cada muestra. Se infirieron características genómicas generales tales como número de cromosomas, índice de ADN, número de roturas de cromosomas y proporciones de genoma en cada estado genómico a partir de los perfiles genotípicos segmentarios.

Los recuentos de cromosomas estimados por genoma mostraron una distribución bimodal (Figura 1, panel superior) similar a los demostrados para los genomas en diversos tipos de cánceres<sup>40</sup>. Se consideró que los genomas tumorales que portaban menos de 50 cromosomas y con el índice de ADN cercano a 1 tenían ploidía de dos y se denominaron en lo sucesivo “genomas casi diploides” (23 casos). Siguiendo la hipótesis de la duplicación de genoma completo durante la progresión del cáncer que explica el segundo modo en la distribución de cromosomas<sup>40</sup> se consideró que los genomas tumorales que portaban más de 50 cromosomas e índice de ADN mayor de 1,2 tenían una ploidía de cuatro y se denominaron en lo sucesivo “genomas sobre-diploides” (42 casos).

Resulta interesante que los 23 tumores casi diploides portaban de forma casi uniforme mutación de línea germinal o inactivación epigenético de *BRCA1* (20/23) a diferencia de los tumores sobre-diploides, que tenían un ligero enriquecimiento de BLC no *BRCA1* (28/42) (Figura 1, panel inferior). Teniendo en cuenta el hecho de que la mutación de línea germinal de *BRCA1* es responsable de casi el 10 % de los carcinomas de tipo basal<sup>41</sup> se estimó que el valor predictivo positivo de estado casi diploide genómico era del 75 %.

### Las reordenaciones cromosómicas a gran escala diferencian carcinomas de tipo basal *BRCA1* y no *BRCA1*

El número total de puntos de rotura detectados en el genoma de cáncer caracteriza el nivel de inestabilidad genómica. Sin embargo, la comparación general de tumores *BRCA1* frente a no *BRCA1* no mostró ninguna diferencia significativa ( $p$  valor = 0,28). En el subgrupo de 42 BLC sobre-diploides, 14 tumores con *BRCA1* inactivado presentaron un número total de puntos de rotura elevado (intervalo [57 - 224],  $140,6 \pm 45,7$ ), mientras que 28 tumores no *BRCA1* mostraron heterogeneidad significativa (intervalo [8 - 213],  $101,2 \pm 50,6$ ) y se enriquecieron en los valores bajos en comparación con tumores *BRCA1* ( $p < 0,017$ , ensayo de rangos de Wilcoxon). Sin embargo, el gran solapamiento en los números de puntos de rotura evitó la demarcación precisa.

Para obtener una estimación robusta y diferenciadora de la inestabilidad genómica se evaluó el número de Transiciones de Estado a gran Escala (LST) calculando roturas cromosómicas entre regiones adyacentes de al menos 10 Mb (que comprenden ~3000 SNP en Affymetrix SNP6.0).

El número de LST en el subgrupo de tumores sobre-diploides tuvo una distribución bimodal con una clara distancia entre dos modos ( $12,5 \pm 4,9$  y  $35,5 \pm 6,7$ ) que separa 18 BLC no *BRCA1* de la mezcla que contiene 14 tumores con *BRCA1* inactivado y 10 tumores sin mutación de línea germinal *BRCA1* ni metilación del promotor de *BRCA1* (Figura 2). En el subgrupo de 23 BLC casi diploides, que contenían principalmente tumores *BRCA1*, las LST tuvieron distribución unimodal ( $28,0 \pm 6,5$ ) con dos tumores no *BRCA1* dentro de una desviación típica (24 y 28 LST) y un BLC no *BRCA1* por debajo de dos desviaciones típicas del promedio (12 LST). Resulta interesante que todos los tumores con LST bajas no tuvieron ninguna prueba de inactivación de *BRCA1* y presentaron pocas roturas cromosómicas y un alto nivel de aneuploidía (3 muestras) o alteraciones de tipo incendio (16 muestras).

Para concluir, las LST reflejaron bien los patrones genómicos generales de los tumores, a diferencia del número total de los puntos de rotura y proporcionaron los valores diferenciadores para predicción de estado de *BRCA1*.

### Una norma de decisión de dos etapas detecta de forma uniforme inactivación de *BRCA1* en BLC.

Basándose en las distribuciones de LST descritas anteriormente, se aplicaron dos umbrales para predicción de BRCAdad, más de 15 LST por genoma en los casos de casi diploidía y más de 20 LST en los casos de sobre-diploidía, que predicen BRCAdad con 100 % de sensibilidad ( $p$  valor =  $4 \times 10^{-5}$ , ensayo de Fisher).

Además, todos los casos de “Falsos Positivos” (denominados en lo sucesivo BLC “de aspecto *BRCA1*”) tuvieron un número alto similar de LST a los casos de “Verdaderos Positivos” (con estado de *BRCA1* inactivado demostrado), que de hecho cuestionaba su estado de falso positivo y podría demostrar otros mecanismos de defecto de recombinación homóloga incluyendo mutaciones de *BRCA1* o *BRCA2*. Dichas mutaciones se buscaron en 28 BLC esporádicos con material disponible incluyendo 13 casos con el patrón de aspecto *BRCA1*. Se descubrieron mutaciones de *BRCA1* deletéreas en seis casos que pertenecían todos a tumores de aspecto *BRCA1* ( $p$  valor = 0,02). Se descubrieron mutaciones de *BRCA2* deletéreas en tres casos que pertenecían todos a tumores de aspecto de *BRCA1*. Con estos hallazgos la especificidad alcanzó el 89 % ( $p$  valor =  $1,4 \times 10^{-11}$ , ensayo de Fisher) en el conjunto experimental considerado de BLC (Figura 3A).

Se ensambló una serie de validación de 55 BLC/TNBC, incluyendo 15 casos con mutaciones de línea germinal de *BRCA1*, 15 casos con metilación del promotor de *BRCA1*, 1 caso con una mutación de línea germinal de *BRCA2* y 24 casos esporádicos. Los datos de matrices de SNP se procesaron usando el mismo flujo de trabajo. La predicción

de la inactivación de *BRCA1* presentó sensibilidad de 100 % (se predijo que los 30 casos de *BRCA1* inactivado eran de aspecto *BRCA1*) y especificidad del 80 % (se predijo que 11 casos eran de aspecto *BRCA1* sin ninguna prueba aún de inactivación de *BRCA1*) (Figura 3B;  $p$  valor=  $1,7 \cdot 10^{-6}$ , ensayo de Fisher). Es notable que el tumor con *BRCA2* mutado era casi diploide con un alto número de LST, siguiendo claramente de este modo un patrón de aspecto *BRCA1*.

**Los sistemas modelo apoyaron los elementos diferenciadores observados en los tumores primarios**

Se analizó una serie de 17 líneas celulares de tipo basal, incluyendo MDA-MB-436 y HCC1937 que portaba mutaciones de *BRCA1*<sup>42</sup> y HCC38 con metilación del promotor de *BRCA1*<sup>43</sup>. Los resultados obtenidos siguieron la tendencia hallada en tumores primarios: en primer lugar la única celular casi diploide hallada fue la MDA-MB-436 con *BRCA1* mutado; en segundo lugar entre las líneas celulares sobre-diploides, HCC1937 y HCC38 portaban el mayor número de roturas cromosómicas a gran escala, lo que de nuevo es coherente con su estado de *BRCA1* inactivado. No obstante, y como se esperaba teniendo en cuenta el establecimiento de línea celular y el mantenimiento a largo plazo en cultivo, se descubrió que el punto de corte que separa las líneas celulares no *BRCA1* se desplazó a 23 LST (Figura 4). Una línea celular HCC1599 tenía un número de LST muy cercano a líneas celulares con *BRCA1* inactivado, mientras que no estaba asociada con mutación de *BRCA1/2*<sup>44</sup>. Para clarificar la función de *BRCA1* y con más precisión la ruta de recombinación homóloga, se midieron focos de RAD51 8 horas después de radiaciones ionizantes en línea celulares de BLC. Todas las líneas celulares sin patrón de aspecto *BRCA1* tuvieron la acumulación de focos de RAD51 esperada, mientras que no se observó ningún foco en las líneas celulares con patrón de aspecto *BRCA1*, incluyendo HCC1599 (datos no mostrados).

En conclusión, los inventores han mostrado que es posible predecir la deficiencia tumoral en la ruta de recombinación homóloga (RH) del ADN en un paciente que padece cáncer, cuantificando el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente, en el que el número de reordenaciones corresponde al número, por genoma, de puntos de rotura que dan como resultado segmentos de al menos 10 megabases.

Se obtuvieron resultados similares usando un valor de punto de corte entre 3 megabases y 20 megabases para la definición de Transiciones a Gran Escala.

**EJEMPLO 2 – Rendimiento del número de LST que predice BRCAdad en todos los tipos de carcinomas de mama.**

Se consideró La serie de 426 tumores de mama (carcinomas ductales invasivos incluyendo tumores HER2 positivos, luminales (por ejemplo que expresan receptores para estrógeno o progesterona), carcinoma de mama triple negativo/de tipo basal (por ejemplo, que no expresa receptores de hormonas y que no sobreexpresa HER1) así como subtipos poco habituales tales como carcinomas medulares o carcinomas micro-papilares del Institut Curie. La serie se enriqueció con tumores con *BRCA1* y *BRCA2* mutado. Los puntos de corte en el número de LST que predice BRCAdad se infirieron basándose en esta serie (Tabla 1). Las Tasas de Falso Positivo y Verdadero Positivo (FPR y TPR) muestran la calidad de predictor basado en LST de BRCAdad.

**Tabla 1. Puntos de corte para predicción de BRCAdad de cáncer de mama basándose en el número de LST**

LST_S Mb, S	Ploidía 2: (P=68, N=182)			Ploidía 4: (P=53, N=123)		
	Punto de corte*	FPR	TPR	Punto de corte	FPR	TPR
6	19(17)	0,04	0,99	32 (32)	0,10	1
7	17(15)	0,05	0,99	29 (27)	0,07	0,98
8	14(14)	0,06	1	26 (26)	0,08	1
9	14(11)	0,04	0,99	25 (19)	0,07	0,98
10	11 (11)	0,07	1	22(18)	0,06	0,98

\*Los puntos de corte corresponden a máx(TPR-FRP); los puntos de corte entre paréntesis corresponden a sensibilidad 100. P: Número de positivos, es decir tumores con *BRCA1/2* mutado; N: Numero de negativos, es decir número de tumores con *BRCA1/2* de tipo silvestre o estado no disponible; TPR: Tasa de verdadero positivo; FPR: Tasa de falso positivo.

**EJEMPLO 3 – El número de LST es un buen predictor de la respuesta al tratamiento**

Se procesaron dos conjuntos de datos públicamente disponibles de ensayo clínico de tratamiento con Cisplatino de pacientes con tumores de mama triple negativos [base de datos de GEO GSE28330] [59] y se calculó el número de LST\_10Mb para cada tumor con buena calidad de perfil medido. Los perfiles genómicos se midieron por dos tipos de microplaca: Affymetrix Oncoscan 70K (Conjunto de datos 2) y Oncoscan 300K (Conjunto de datos 1). Estuvo disponible información acerca del estado mutacional de *BRCA1/2* para algunos tumores. La respuesta al tratamiento se midió mediante puntuación de Miller-Payne, en la que 4 y 5 se consideran "respuesta positiva", mientras que las puntuaciones <4 se consideraron "sin respuesta" [59]. Se presentan resultados caso a caso y de sumario en la Tabla

2 y las Tablas 3-5 (se realizaron comparaciones estadísticas mediante el ensayo exacto de Fisher). En conclusión, (i) casi todos los casos de BRCA1/2 inactivado (17/18) conocidos y 15 tumores con estado de BRCA1/2 de tipo silvestre o desconocido se clasificaron como LST\_alta (Tabla 3); (ii) la inactivación de BRCA1/2 no significa siempre respuesta a Cisplatino (Tabla 4); (iii) LST\_10Mb es un mejor predictor de respuesta a cisplatino que el estado de BRCA1/2 (Tabla 4-5).

5

**Tabla 2. Resultados individuales**

Conjunto de datos	ID	Calidad de reconocimiento	BRCA1/2	Respuesta de Miller-Payne	LST	Respuesta
1	DFHCC 06.202 45R	buena		5	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 15	buena	mut	5	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 41	buena		5	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 7	buena	mut	5	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 17	buena		5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 9T	buena	no	5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 18T	buena	mut	5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 3T	buena	no	5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 29T	buena	no	5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 5T	buena	mut	5	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 17T	buena	met	5	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 6	buena	met	4	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 48	buena	met	4	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 7T	buena	met	4	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 8T	buena	met	4	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 40	buena		4	Alta	Sí
2	DFHCC 04.183 10T	buena	no	4	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 3	buena		4	Alta	Sí
1	DFHCC 06.202 27	buena		4	Baja	Sí
1	DFHCC 06.202 13	buena	met	3	Alta	No
1	DFHCC 06.202 5	buena		3	Baja	No
1	DFHCC 06.202 4	buena	met	3	Alta	No
2	DFHCC 04.183 23T	buena	met	3	Alta	No
2	DFHCC 04.183 11T	buena	no	3	Alta	No
2	DFHCC 04.183 25T	buena	met	3	Alta	No
2	DFHCC 04.183 1T	buena	met	3	Alta	No
1	DFHCC 06.202 37	buena		3	Baja	No
1	DFHCC 06.202 20	buena	mut	2	Alta	No
1	DFHCC 06.202 42	buena	mut	2	Alta	No
1	DFHCC 06.202 21	buena		2	Alta	No
2	DFHCC 04.183 14T	buena	no	2	Alta	No
2	DFHCC 04.183 24T	buena	no	2	Baja	No
2	DFHCC 04.183 22T	buena	no	2	Baja	No
2	DFHCC 04.183 28T	buena	no	2	Baja	No
1	DFHCC 06.202 24	buena		2	Baja	No
1	DFHCC 06.202 10	buena		1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 32	buena		1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 35	buena		1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 46	buena		1	Baja	No
2	DFHCC 04.183 13T	buena	no	1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 34	buena		1	Alta	No
1	DFHCC 06.202 29	buena		1	Alta	No
1	DFHCC 06.202 45L	buena		1	Alta	No
2	DFHCC 04.183 4T	buena	no	1	Alta	No
2	DFHCC 04.183 12T	buena	no	1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 18	buena		1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 9	buena		1	Baja	No
2	DFHCC 04.183 16T	buena	no	1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 14	buena		1	Baja	No
2	DFHCC 04.183 6T	buena		1	Baja	No
1	DFHCC 06.202 28	buena		0	Baja	No
2	DFHCC 04.183 21T	buena	no	0	Alta	No
2	DFHCC 04.183 27T	buena	no	0	Baja	No
2	DFHCC 04.183 26T	buena	met	0	Baja	No

Conjunto de datos	ID	Calidad de reconocimiento	BRCA1/2	Respuesta de Miller-Payne	LST	Respuesta
2	DFHCC_04.183_15T	mala	met	0		No
2	DFHCC_04.183_20T	mala	no	2		No
2	DFHCC_06.202_33	buena		NA		
2	DFHCC_06.202_43	buena		NA		
2	DFHCC_06.202_50	buena		NA		
2	DFHCC_06.202_39	mala		2		No
2	DFHCC_06.202_39	mala		2		No

**Tabla 3. Sumario de LST frente a BRCA1/2**

TODOS	LST_alta	LST_baja	p<0,0001
BRCA1/2	18	1	
NO BRCA1/2 o NA	15	20	

5

**Tabla 4. Sumario de BRCA1/2 frente a respuesta**

TODOS	Sensibles	No sensibles	p<0,06
BRCA1/2	9	8	
NO BRCA1/2 o NA	10	27	

**Tabla 5. Sumario de LST frente a respuesta**

TODOS	LST_alta	LST_baja	p<0,0001
No sensibles	15	20	
Sensibles	18	1	

**EJEMPLO 4 – LST en carcinoma ovárico**

10 Se realizó el perfil de una serie de carcinomas ováricos de alto grado del Institut Curie mediante matrices de SNP (Affymetrix CytoScanHD). Todos los pacientes se trataron por quimioterapias que incluían sales de platino. Los genomas tumorales se anotaron como LST\_alta (50 casos) y LST\_baja (20 casos) basándose en la LST\_6 Mb con los puntos de corte de 19 y 32 LST para tumores casi diploides y casi tetraploides respectivamente. La comparación de Supervivencia General y Supervivencia sin Acontecimientos mostró mejor resultado para pacientes con tumores LST\_alta, lo que indica mejor respuesta a tratamiento (Figuras 5-6).

**EJEMPLO 5 – LST en líneas celulares tumorales**

20 Se analizaron una serie de líneas celulares tumorales con estado de BRCA conocido y con datos de matrices de SNP disponibles. Se calcularon LST\_10Mb y se ligaron las muestras con alta LST a inactivación de BRCA2 en líneas celulares de carcinoma del cuello uterino y pancreático. Dos líneas celulares pulmonares sin mutaciones de BRCA1/2 conocidas tienen un alto nivel de LST, supuestamente debido a la metilación de BRCA1 descrita en esta enfermedad [60] (Figura 7). Esta validación del método en líneas celulares tumorales de diversos orígenes y estado de diferenciación indica que la medición de LST y predicción de la BRCAidad puede aplicarse en todos los tipos de tumores.

**Referencias**

30 1. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO: Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol* 26:2568-81, 2008  
 2. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C: Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur Cancer* 45 Supl 1:27-40, 2009  
 3. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, *et al*: Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:1482-5, 2003  
 35 4. Bergamaschi A, Kim YH, Wang P, *et al*: Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 45:1033-40, 2006  
 5. Melchor L, Honrado E, Garcia MJ, *et al*: Distinct genomic aberration patterns are found in familial breast cancer associated with different immunohistochemical subtypes. *Oncogene* 27:3165-75, 2008  
 40 6. Natrajan R, Weigelt B, Mackay A, *et al*: An integrative genomic and transcriptomic analysis reveals molecular pathways and networks regulated by copy number aberrations in basal-like, HER2 and luminal cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 2009  
 7. Gudmundsdottir K, Ashworth A: The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene* 25:5864-74, 2006  
 45 8. Roy R, Chun J, Powell SN: BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12:68-78, 2012

9. Turner N, Tutt A, Ashworth A: Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 4:814-9, 2004
10. Chin SF, Teschendorff AE, Marioni JC, *et al*: High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. *Genome Biol* 8:R215, 2007
- 5 11. Stefansson OA, Jonasson JG, Johannsson OT, *et al*: Genomic profiling of breast tumours in relation to BRCA abnormalities and phenotypes. *Breast Cancer Res* 11:R47, 2009
12. Joosse SA, Brandwijk KI, Mulder L, *et al*: Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 50:71-81, 2011
13. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, *et al*: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917-21, 2005
- 10 14. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, *et al*: Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434:913-7, 2005
- 15 15. Fong PC, Boss DS, Yap TA, *et al*: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 361:123-34, 2009
16. Vollebergh MA, Jonkers J, Linn SC: Genomic instability in breast and ovarian cancers: translation into clinical predictive biomarkers. *Cell Mol Life Sci* 69:223-45, 2012
17. Focken T, Steinemann D, Skawran B, *et al*: Human BRCA1-Associated Breast Cancer: No Increase in Numerical Chromosomal Instability Compared to Sporadic Tumors. *Cytogenet Genome Res* 135:84-92, 2011
18. Johannsdottir HK, Jonsson G, Johannsdottir G, *et al*: Chromosome 5 imbalance mapping in breast tumors from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and sporadic breast tumors. *Int J Cancer* 119:1052-60, 2006
- 20 19. Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, *et al*: Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. *Cancer Res* 57:1222-7, 1997
20. Melchor L, Alvarez S, Honrado E, *et al*: The accumulation of specific amplifications characterizes two different genomic pathways of evolution of familial breast tumors. *Clin Cancer Res* 11:8577-84, 2005
- 25 21. Wessels LF, van Welsem T, Hart AA, *et al*: Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. *Cancer Res* 62:7110-7, 2002
22. Waddell N, Arnold J, Cocciardi S, *et al*: Subtypes of familial breast tumours revealed by expression and copy number profiling. *Breast Cancer Res Treat*, 2009
23. Jonsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J, *et al*: Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. *Breast Cancer Res* 12:R42, 2010
- 30 24. Joosse SA, van Beers EH, Tielen IH, *et al*: Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res Treat* 116:479-89, 2009
25. Lips EH, Mulder L, Hannemann J, *et al*: Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol* 22:870-6, 2011
- 35 26. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, *et al*: An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Ann Oncol* 22:1561-70, 2011
27. Popova T, Manie E, Stoppa-Lyonnet D, *et al*: Genome Alteration Print (GAP): a tool to visualize and mine complex cancer genomic profiles obtained by SNP arrays. *Genome Biol* 10:R128, 2009
- 40 28. Manie E, Vincent-Salomon A, Lehmann-Che J, *et al*: High frequency of TP53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res* 69:663-71, 2009
29. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, *et al*: Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 9:R24, 2007
- 45 30. Marty B, Maire V, Gravier E, *et al*: Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 10:R101, 2008
31. Azoulay S, Lae M, Freneaux P, *et al*: KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* 18:1623-31, 2005
- 50 32. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, *et al*: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367-74, 2004
33. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, *et al*: Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92:564-9, 2000
34. Houdayer C, Moncoutier V, Champ J, *et al*: Enhanced mismatch mutation analysis: simultaneous detection of point mutations and large scale rearrangements by capillary electrophoresis, application to BRCA1 and BRCA2. *Methods Mol Biol* 653:147-80, 2010
- 55 35. Dai M, Wang P, Boyd AD, *et al*: Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of Gene-Chip data. *Nucleic Acids Res* 33:e175, 2005
36. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, *et al*: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8418-23, 2003
- 60 37. Staaf J, Vallon-Christersson J, Lindgren D, *et al*: Normalization of Illumina Infinium whole-genome SNP data improves copy number estimates and allelic intensity ratios. *BMC Bioinformatics* 9:409, 2008
38. Waddell N, Arnold J, Cocciardi S, *et al*: Subtypes of familial breast tumours revealed by expression and copy number profiling. *Breast Cancer Res Treat* 123:661-77, 2010
39. DeRose YS, Wang G, Lin YC, *et al*: Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med* 17:1514-20, 2011
- 65 40. Storchova Z, Kuffer C: The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J Cell Sci* 121:3859-66, 2008

41. Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, *et al*: The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 9:86, 2009
42. Elstrodt F, Hollestelle A, Nagel JH, *et al*: BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res* 66:41-5, 2006
- 5 43. Xu J, Huo D, Chen Y, *et al*: CpG island methylation affects accessibility of the proximal BRCA1 promoter to transcription factors. *Breast Cancer Res Treat* 120:593-601, 2010
44. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, *et al*: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268-74, 2006
- 10 45. Garcia AI, Buisson M, Bertrand P, *et al*: Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med* 3:279-90, 2011
46. Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, *et al*: miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell* 41:210-20, 2011
47. Plo I, Laulier C, Gauthier L, *et al*: AKT1 inhibits homologous recombination by inducing cytoplasmic retention of BRCA1 and RAD51. *Cancer Res* 68:9404-12, 2008
- 15 48. Van Loo P, Nordgard SH, Lingjaerde OC, *et al*: Allele-specific copy number analysis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:16910-5, 2010
49. Pujana MA, Han JD, Starita LM, *et al*: Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet* 39:1338-49, 2007
- 20 50. Xu X, Weaver Z, Linke SP, *et al*: Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol Cell* 3:389-95, 1999
51. Brodie KM, Henderson BR: Characterization of BRCA1 centrosome targeting, dynamics and function: A role for the nuclear export signal, CRM1 and Aurora A kinase. *J Biol Chem*, 2012
52. Kais Z, Parvin JD: Regulation of centrosomes by the BRCA1-dependent ubiquitin ligase. *Cancer Biol Ther* 7:1540-3, 2008
- 25 53. Moller P, Hagen AI, Apold J, *et al*: Genetic epidemiology of BRCA mutations--family history detects less than 50% of the mutation carriers. *Eur J Cancer* 43:1713-7, 2007
54. O'Shaughnessy J, Telli M, Swain S, *et al*: Phase 3 Study of Iniparib (I) Plus Gemcitabine (G) and Carboplatin (C) in Metastatic Triple-negative Breast Cancer (mTNBC) - Results of an Exploratory Analysis by Prior Therapy *European Journal of Cancer* 47:S338, 2011
- 30 55. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W y *et al*. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266:66-71.
56. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C y Micklem G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378, 789-92.
- 35 57. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB y Herman JG. (2000). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92, 564-9.
58. Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, Greenman CD, Jia M, Latimer C, Teague JW, Lau KW, Burton J, Quail MA, Swerdlow H, Churcher C, Natrajan R, Sieuwerts AM, Martens JW, Silver DP, Langerod A, Russnes HE, Foekens JA, Reis-Filho JS, van 't Veer L, Richardson AL, Borresen-Dale AL, Campbell PJ, Futreal PA y Stratton MR. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, 462, 1005-10.
- 40 59. Birkbak, N.J., Wang, Z.C., Kim, J.Y., Eklund, A.C., Li, Q., Tian, R., Bowman-Colin, C., Li, Y., Greene-Colozzi, A., Iglehart, J.D., *et al*. (2012). Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNAdamaging agents. *Cancer Discovery* 2, 366-375.
- 45 60. Lee, M.-N., Tseng, R.-C., Hsu, H.-S., Chen, J.-Y., Tzao, C., Ho, W.L., y Wang, Y.-C. (2007). Epigenetic inactivation of the chromosomal stability control genes BRCA1, BRCA2, and XRCC5 in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 832-838.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para predecir la deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN en un paciente que padece cáncer,
- 5 que comprende la etapa de cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente, en el que el número de reordenaciones corresponde al número, por genoma, de puntos de rotura que da como resultado segmentos de al menos 3 megabases, que comprende además la etapa de comparar el número de reordenaciones por genoma con un umbral, en el que un número de reordenaciones por genoma superior a dicho umbral es indicativo de deficiencia en RH.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la deficiencia en la ruta de Recombinación Homóloga de ADN es una inactivación de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en BRCA1, BRCA2, PALP2/FANCN, BRIP1/FANCJ, BARD1, RAD51 y parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3).
- 15 3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la deficiencia se debe a mutación de línea germinal o mutación somática de *BRCA1*, mutación de línea germinal con mutación somática de *BRCA2* o metilación de promotor de *BRCA1*.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, carcinoma de cabeza y cuello y melanoma.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el cáncer es cáncer de mama, preferentemente carcinoma de mama de tipo basal.
- 25 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número de puntos de rotura que da como resultado segmentos de al menos 3 megabases por genoma se cuantifica cuantificando el número de variaciones del número de copias por genoma.
- 30 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la cuantificación del número de variaciones del número de copias por genoma se lleva a cabo por matriz de hibridación genómica comparativa (CGH) o matriz de Polimorfismo de un Único Nucleótido (SNP).
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de evaluar la ploidía de la muestra tumoral.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la ploidía de la muestra tumoral se evalúa por un método seleccionado del grupo que consiste en clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y matriz de Polimorfismo de un Único Nucleótido (matriz de SNP).
- 40 10. Un método para predecir la deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN en un paciente que padece cáncer, que comprende las etapas que consisten en:
- 45 - determinar la ploidía de la muestra tumoral;
- cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente;
- comparar el número de reordenaciones por genoma con un umbral, en el que un número de reordenaciones que da como resultado segmentos de al menos 3 megabases superior a dicho umbral es indicativo de deficiencia en RH
- 50 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de cuantificar el número de reordenaciones en el ADN genómico de una muestra tumoral obtenida de dicho paciente y/o la etapa de evaluar la ploidía de la muestra tumoral se realiza por matriz de SNP.
- 55 12. Un método para predecir la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece cáncer, en el que dicho tratamiento comprende un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante, y en el que dicho método comprende la etapa que consiste en predecir la deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN en dicho paciente de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 60 13. Un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante para su uso en un método para tratar el cáncer en un paciente en el que se ha predicho que dicho paciente tiene una deficiencia en la ruta de recombinación homóloga (RH) de ADN de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 65 14. Un inhibidor de PARP y/o un agente alquilante para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho inhibidor de PARP y/o agente alquilante se selecciona del grupo que consiste en iniparib, olaparib, rucaparib, CEP

9722, MK 4827, BMN-673, 3-aminobenzamida, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, clormetina, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, ifosfamida, estramustina, carmustina, lomustina, fotemustina, estreptozocina, busulfán, pipobromán, procarbazona, dacarbazina, tiotepa y temozolomida.

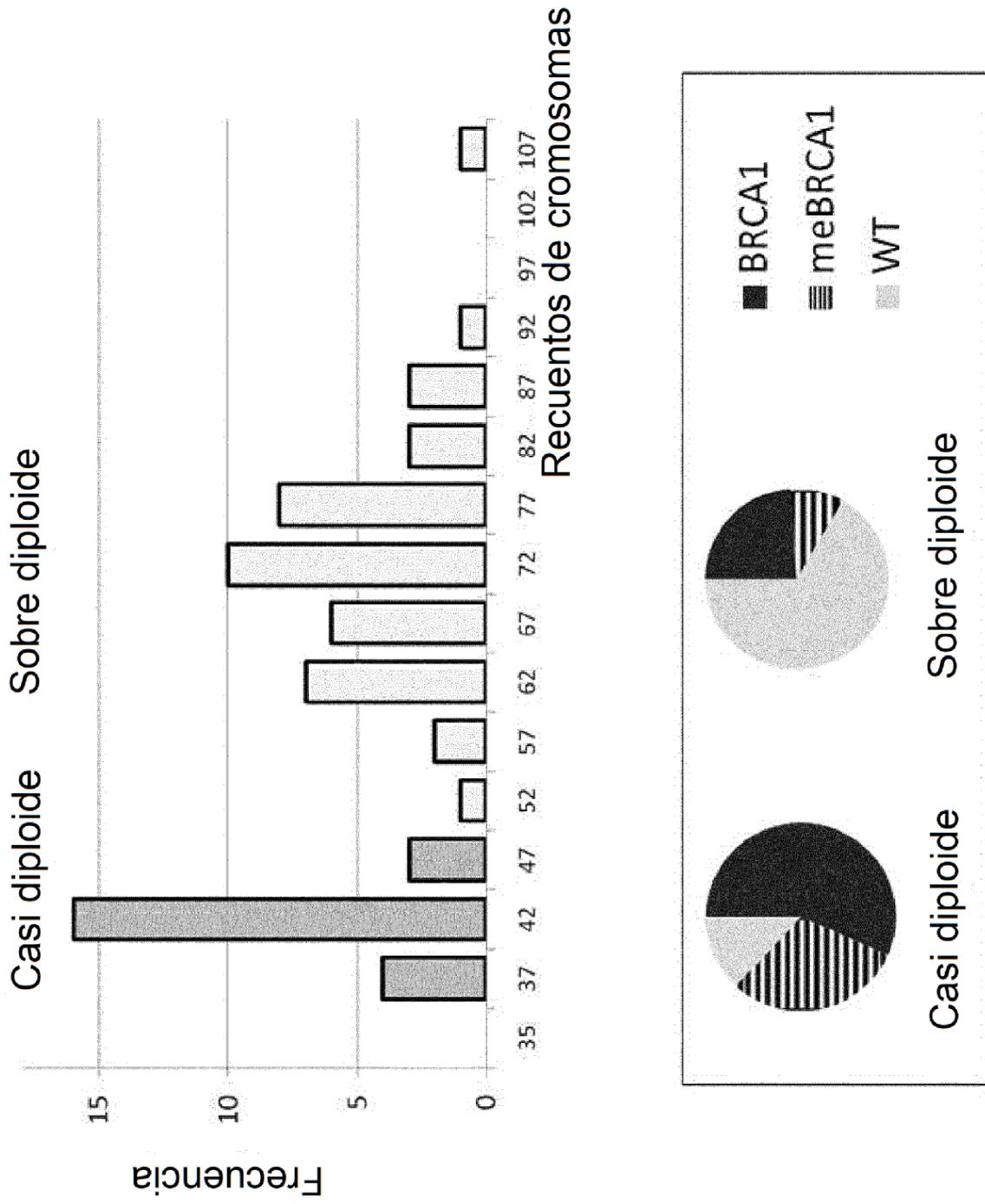


Figura 1

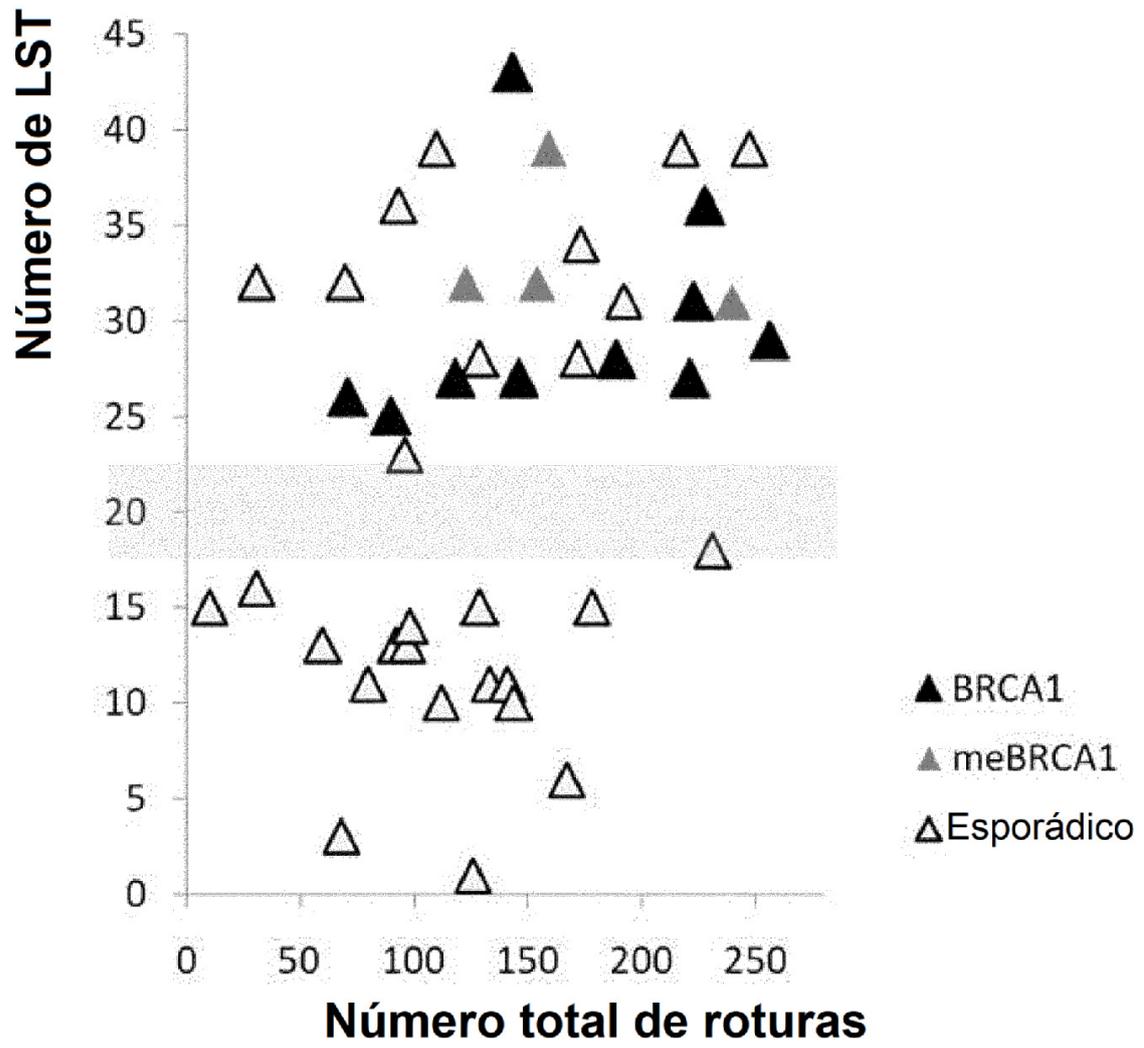


Figura 2

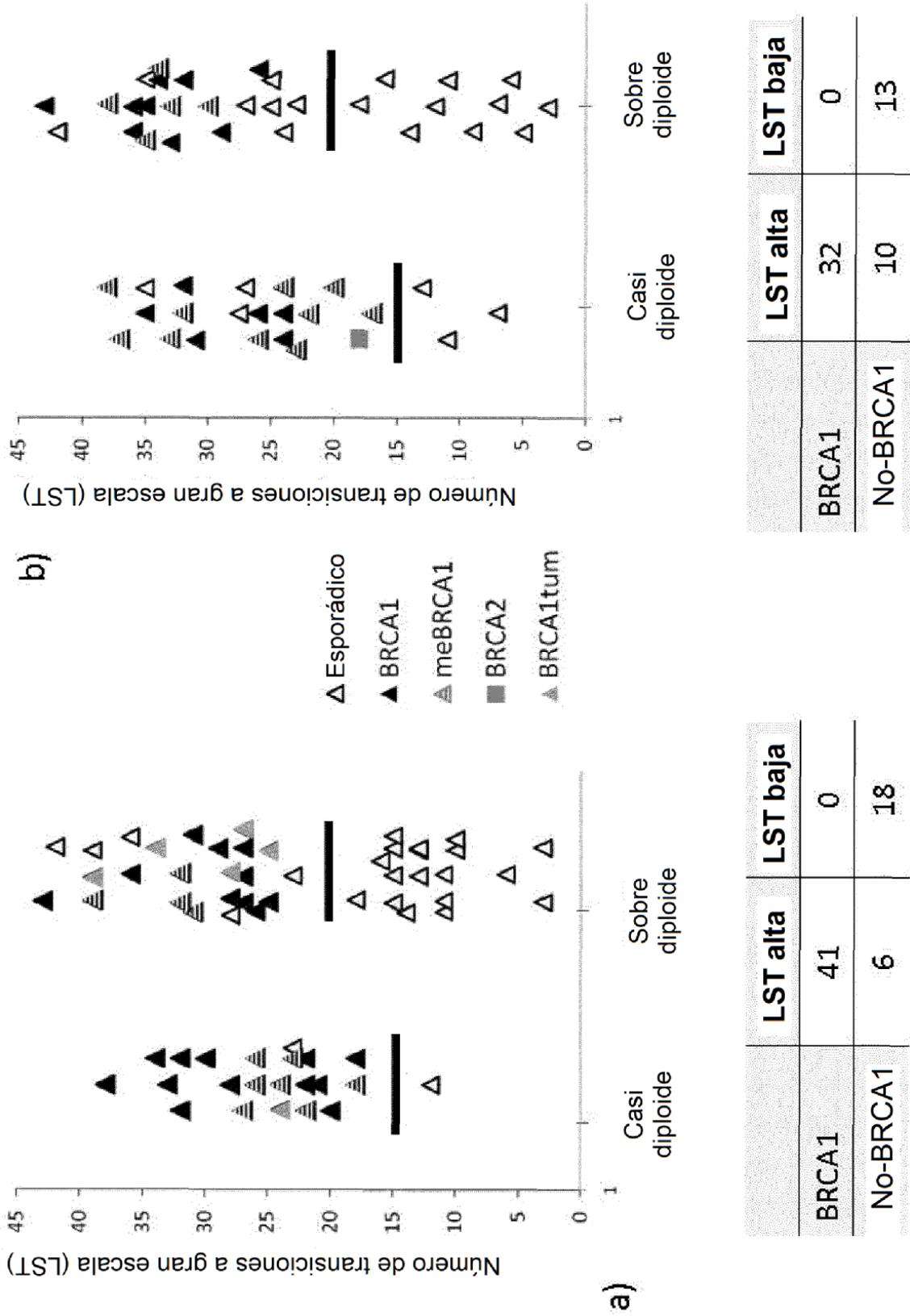


Figura 3

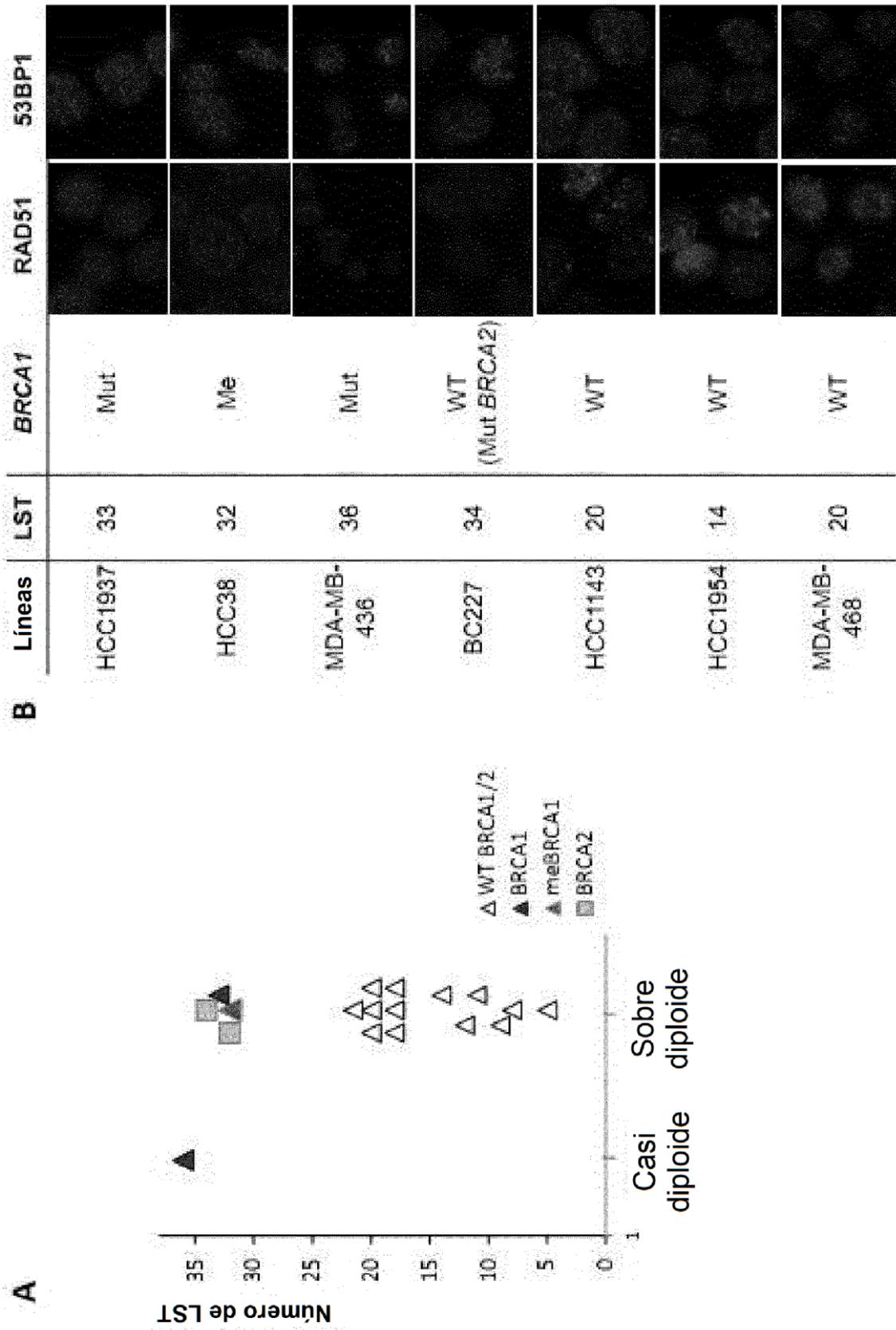


Figura 4

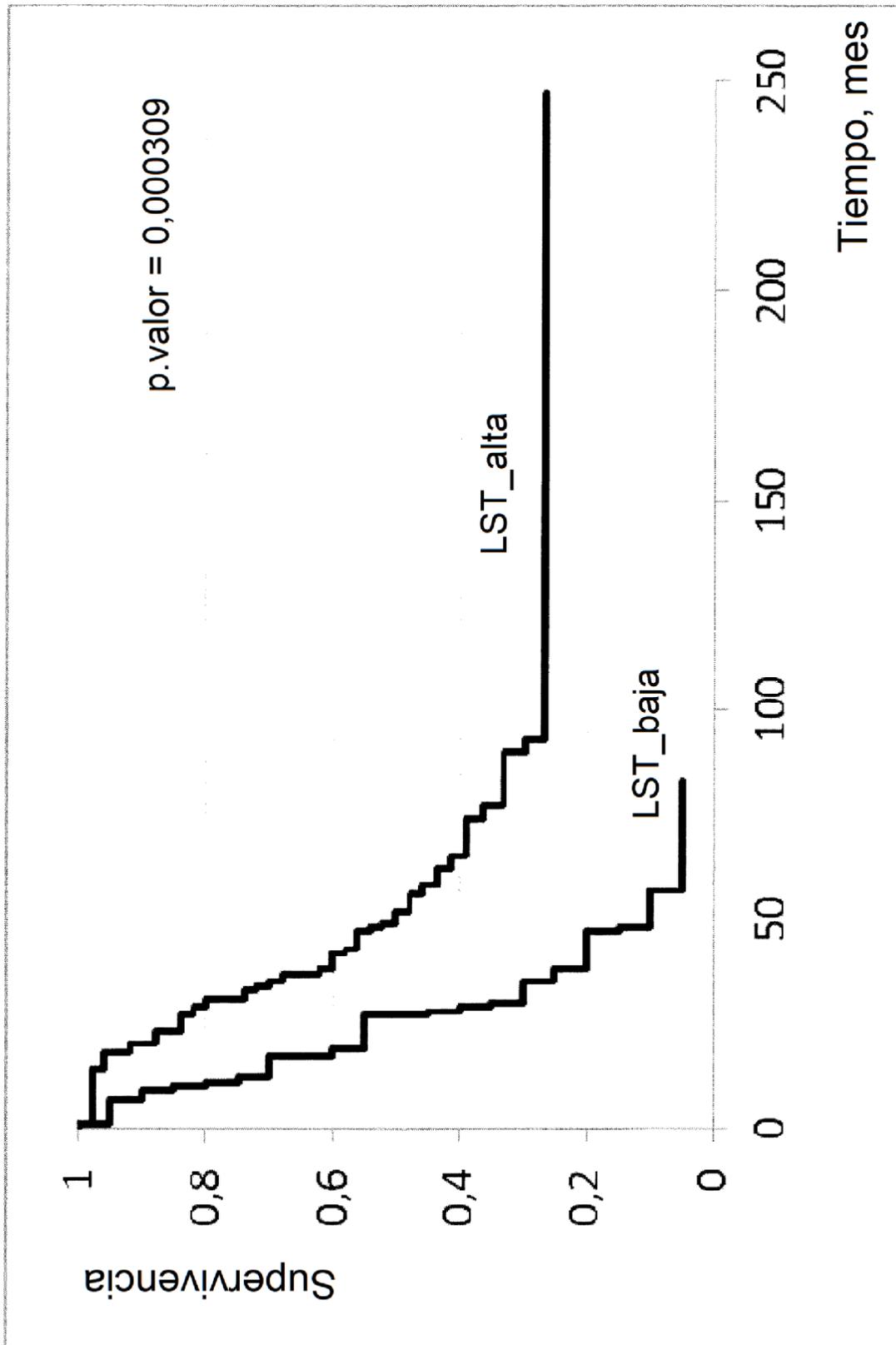


Figura 5

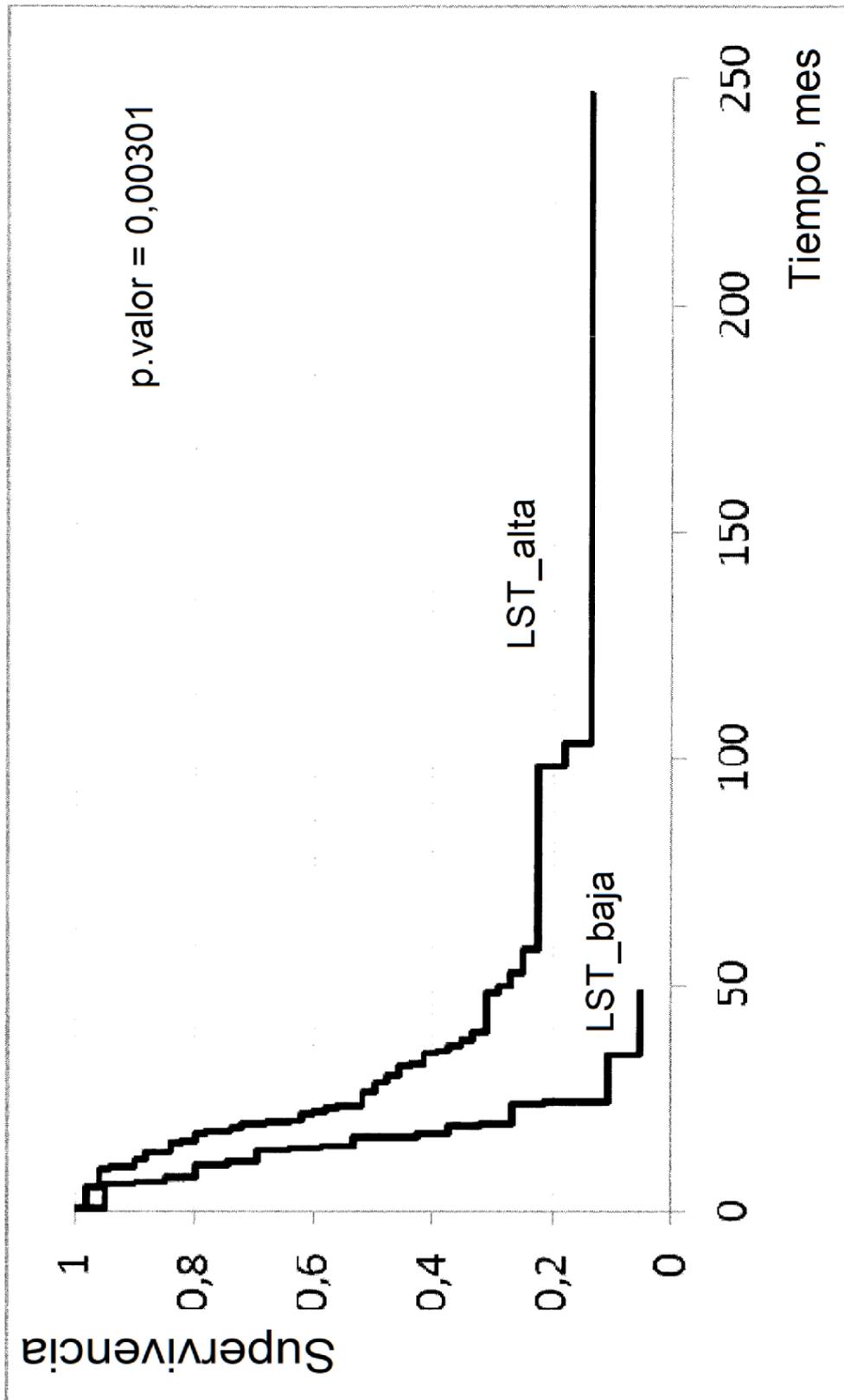


Figura 6

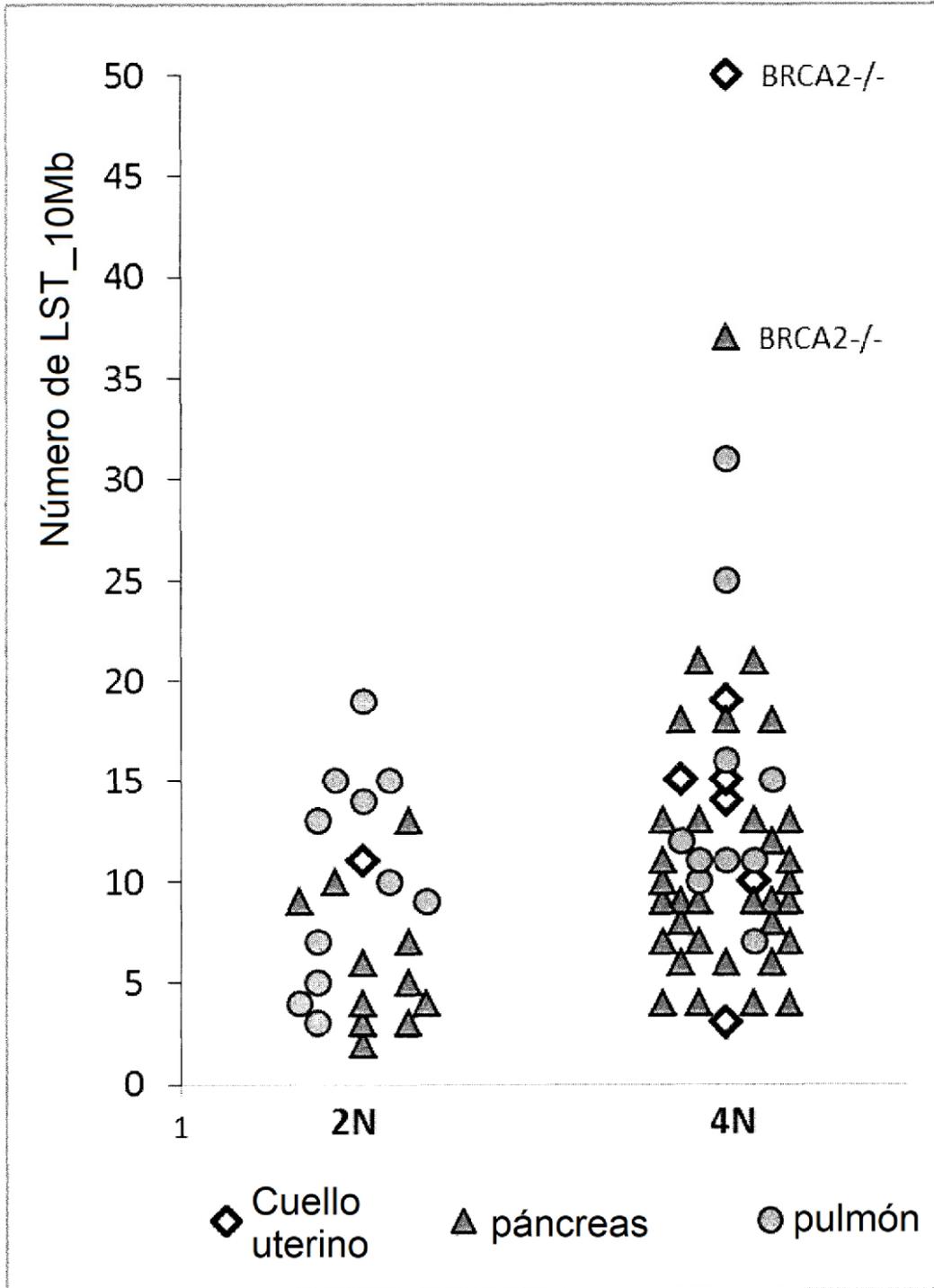


Figura 7