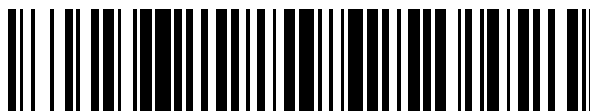


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 864**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6827 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/US2012/070747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12806870 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2798080**

54 Título: **Materiales y métodos para el diagnóstico y pronóstico de cáncer pancreatobiliar**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161581810 P

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

25.07.2019

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (50.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US y
MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SOKOLOVA, IRINA;
MORRISON, LARRY;
PESTOVA, EKATERINA;
FRITCHER, EMILY, BARR;
ROBERTS, LEWIS;
GORES, GREGORY;
HALLING, KEVIN y
KIPP, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 720 864 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 el diagnóstico y pronóstico de cáncer pancreatobiliar

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a métodos de diagnóstico, pronóstico, supervisión de recurrencia y evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico de cáncer, en particular, cáncer pancreatobiliar, la detección de anomalías genotípicas e hibridación *in situ*, así como a un conjunto de sondas y un kit útil en dichos métodos.

10

Antecedentes

Colangiocarcinoma (CCA), una malignidad que se produce en el epitelio del conducto biliar, y el carcinoma pancreático son los tipos de tumor más comunes propios del tracto pancreatobiliar. Estos cánceres están asociados con una alta mortalidad, con una tasa de supervivencia de cinco años de menos del 5 %. El carcinoma pancreático fue el décimo tipo de cáncer más común en los Estados Unidos en 2009, pero ocupó el cuarto puesto como causa de muerte entre los ciudadanos norteamericanos.

15

Si bien CCA es un tumor relativamente raro, su incidencia está aumentando a nivel mundial por razones aún sin aclarar. Las pruebas indican que la inflamación crónica predispone el epitelio biliar al desarrollo del carcinoma. Por lo tanto, los pacientes con colangitis esclerosante primaria (CEP) presentan un mayor riesgo de colangiocarcinoma. Los pacientes CEP suelen ser controlados por CPRE, incluyendo citología con cepillo de áreas sospechosas.

20

Los pacientes con malignidad pancreatobiliar suelen presentar los síntomas en una fase tardía cuando la posibilidad de éxito en la intervención es baja. La detección temprana ofrece a los pacientes la mejor oportunidad de extirpación quirúrgica, que es hoy en día la opción de tratamiento más viable.

25

La adquisición de un tejido adecuado y de diagnóstico durante la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) supone un desafío. El éxito de la biopsia puede verse obstaculizado por el desafiante emplazamiento anatómico de algunas estructuras. Las biopsias pancreatobiliares suelen ser reducidas, inadecuadas y/o carentes de células de diagnóstico. La evidencia patológica del tumor (p.ej., biopsia, citología con cepillo y aspiración con aguja fina (AAF)) es necesaria para confirmar la sospecha de un carcinoma; sin embargo, los ensayos de diagnóstico actuales tienen una sensibilidad limitada para la detección de malignidad. Es posible realizar una citología con cepillo durante la CPRE y, dado que es posible extraer una muestra de toda el área examinada en busca de un carcinoma, se puede proporcionar un diagnóstico de la malignidad cuando la histología es negativa, pero la sensibilidad de la citología de rutina está por debajo de lo óptimo. La tasa de detección de carcinoma a través de un análisis citológico de rutina de cepillos CPRE es relativamente baja (20 % en la Clínica Mayo). El uso de un análisis de imágenes digitales (AID) e hibridación y la hibridación fluorescente *in situ* (HFIS) en citologías con cepillo ha mejorado las tasas de detección de carcinoma con respecto a las citologías de rutina; sin embargo, se ha demostrado que ADI no es un predictor independiente de la malignidad y se ha abandonado (Fritcher et al., *Gastroenterology* 136(7): 2180-2186 (2009)). Se ha demostrado que HFIS utilizando sondas diseñadas originalmente para la detección de cáncer de vejiga (UroVysion™, Abbott Molecular, Des Plaines, IL) es un predictor independiente de la malignidad (Fritcher et al. (2009), *supra*). Sin embargo, mientras que HFIS detecta aproximadamente el doble de casos de carcinoma que la citología de rutina, no detecta la mitad de las muestras de cáncer. UroVysion™ contiene una sonda específica de locus dirigida al gen P16, que es un gen supresor de tumor localizado en un brazo corto del cromosoma 9 y que, según se sabe, está suprimido en una proporción de los carcinomas pancreatobiliares (Caldas et al., *Nature Genetics* 8(1): 27-32 (1994); véase también la fe de erratas en *Nature Genetics* 8(4): 410 (1994)); sin embargo, no se ha establecido un umbral de positividad y, por lo tanto, hasta donde llega el conocimiento de los autores de la solicitud, esta sonda no se está evaluando en la práctica clínica actual. Las modalidades de creación de imágenes, como tomografía computarizada, ecografía e imágenes por resonancia magnética (IRM), permiten la visualización del tracto pancreatobiliar. La diferenciación entre estructuras benignas y malignas utilizando imágenes no es siempre posible, sin embargo. Los niveles de marcador de tumor en suero, como CA-19-9, pueden ser elevados en pacientes con malignidad pancreatobiliar, pero dichos marcadores no son específicos para carcinoma y, por tanto, presentan una utilidad limitada.

30

35

40

45

50

55

Miyamoto et al. (*Oncology* 56(1): 73-82 (1999)) han investigado según informes la expresión de varios miembros de la familia de proteínas Bcl-2 en cáncer pancreático utilizando un análisis inmunohistoquímico en 30 adenocarcinomas ductales invasivos y 23 tumores papilar-mucinosos intraductales (TPMI) y análisis de inmunotransferencia de seis tejidos de cáncer y siete líneas de células de cáncer pancreático. Se observó, según los informes, Mcl-1 (secuencia 1 de leucemia de célula mielóide) en 90 % de los adenocarcinomas ductales invasivos y 88 % de los adenocarcinomas papilar-mucinosos intraductales. Los niveles de proteína Mcl-1 fueron uniformemente altos según los informes en todas las líneas celulares de cáncer pancreático.

60

McKay et al. (*HPB (Oxford)* 13(5): 309-319 (Mayo 2011; epub 10 de marzo de 2011)) utilizó hibridación genómica comparativa de matrices para identificar nuevas dianas terapéuticas posibles en CCA. Según los informes, se ganaron frecuentemente las regiones que cubren el gen de RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico),

65

entre otros. Harder et al. (World J. Gastroenterol. 15(36): 4511-4517 (28 sept. 2009)) han notificado que RFCE puede ser una prometedor diana terapéutica en pacientes con cáncer del tracto biliar avanzado. Yoshikawa et al. (Br. J. Cáncer 98(2): 418-425 (29 ene., 2008; epub 18 dic., 2007)) evaluaron según los informes 236 casos de CCA retrospectivamente utilizando análisis inmunohistoquímicos de RFCE, entre otros genes. Observaron una asociación entre la sobre-expresión de RFCE con metástasis del ganglio linfático de tipo macroscópico, fase tumor, invasión del vaso linfático e invasión perineural en colangiocarcinoma extrahepático (CCEH). Se observó, según los informes, que la expresión de RFCE constituía un factor de pronóstico significativo y un factor de riesgo para la recurrencia de tumor. Sobre la base de estos resultados, señalaron que la expresión de RFCE está asociada con la expresión de tumor en CCA (véase, también Ito et al., Pathol. Res. Pract. 197(2): 95-100 (2001)). Gwak et al. (J. Cáncer Res. Clin. Oncol. 131(10): 649-652 (Oct. 2005; epub 20 oct., 2005)) observaron supresiones en el exón 19 del gen RFCE encontrándolas más comúnmente en CAA intra-hepáticos o escasamente diferenciados.

Birnbaum et al. (Genes Chromosomes Cáncer 50(6): 456-465 (junio 2011; epub 15 marzo, 2011)) ha notificado una ganancia/amplificación del gen MYC, entre otros, en adenocarcinoma pancreático.

Frecuentemente se observa la alteración del gen P16, entre otros genes, en adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) (Delpu et al., Curr. Genomics 12(1): 15-24 (mar. 2011)) y neoplasma papilar mucinoso intraductal (NPMI) (Huo et al., Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 37(10): 670-675 (oct. 2008)). Karamitopoulou et al., han divulgado asimismo que P16 es, según los informes, un importante marcador de pronóstico en CCA (Am. J. Clin. Pathol. 130(5): 780-786 (nov. 2008)). Tonini et al., divulgan que existe una fuerte evidencia de que P16, entre otros, es un predictor independiente del resultado para el paciente con cáncer de páncreas (Expert Opin. Ther. Targets 11(12): 1553-1569 (dic. 2007)). Dichos cambios, surgen según el informe de forma gradual durante la carcinogénesis. Se han registrado frecuentes mutaciones somáticas y la supresión homocigótica del gen P16 (MTS1) en adenocarcinoma pancreático (Caldas et al. (1994), *supra*). Otros autores han notificado que dichos cambios se pueden utilizar para diferenciar entre cáncer e inflamación crónica (véase, p.ej., Thosani et al., Pancreas 39(8): 1129-1133 (Nov. 2010)).

En vista de lo expuesto, siguen siendo necesarios métodos de diagnóstico y pronóstico más sensibles, más fiables y más informativos para el tratamiento de cáncer pancreatobiliar. La presente divulgación trata de proporcionar un conjunto de marcadores, así como métodos de uso y un kit que comprende dicho conjunto de marcadores para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico de cáncer pancreatobiliar. Fue necesario un análisis exhaustivo de varios marcadores, tal como se describe en el presente documento, para determinar la mejor combinación de marcadores para una óptima detección de cáncer pancreatobiliar. Tanto éste como otros objetos y ventajas, así como las características de la invención, se pondrán de manifiesto con la descripción detallada que se proporciona en el presente documento.

Sumario

Se proporciona un método para detectar displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar, cáncer metastásico al tracto pancreatobiliar o deducir o un mayor riesgo de contraerlo, en un paciente. El método comprende el contacto de una muestra de células pancreatobiliarias, como una muestra recogida con cepillo durante la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) del paciente con un conjunto de sondas marcadas detectablemente que comprenden una sonda específica de locus para secuencia 1 de leucemia de célula mielóide (MCL1), una sonda específica de locus para receptor de factor de crecimiento epidérmico (RFCE), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16, en condiciones de hibridación y determinar la presencia de anomalías cromosómicas. La polisomía indica displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar, mientras que la tetrasomía, una pérdida de P16, una ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16 o una ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida concurrente de P16 hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar.

Se proporciona un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende una sonda específica de locus para MCL1, una sonda específica de locus para RFCE, una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16.

Se proporciona asimismo un kit. El kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite la detección de cáncer pancreatobiliar en un paciente, donde el conjunto de sondas comprende una sonda específica de locus para MCL1, una sonda específica de locus para RFCE, una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 y (b) instrucciones para detectar cáncer pancreatobiliar en un paciente, donde las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células pancreatobiliarias obtenidas del paciente la presencia de anomalías cromosómicas. Polisomía es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar, mientras que tetrasomía, pérdida de P16, ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16 o ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar.

Descripción de las figuras

Fig. 1 es un gráfico de barras del porcentaje de células frente a la sonda, donde las barras claras representan las normales y las barras oscuras representan carcinomas.

5 Fig. 2 es un gráfico de barras del número de copias de sonda medio frente a la sonda.

Fig. 3 es un gráfico de barras del porcentaje de células con pérdida homocigótica frente a sonda.

Descripción detallada

10 La presente divulgación proporciona un conjunto de marcadores, así como un método de uso y un kit que comprende el conjunto de marcadores para el diagnóstico, el pronóstico, la supervisión de la recurrencia y la evaluación del tratamiento terapéutico o profiláctico de cáncer pancreatobiliar. Para la presente divulgación son pertinentes los siguientes términos:

15 "Aproximadamente" se refiere a una variación entorno a +/-10 % con respecto al valor señalado. Debe entenderse que dicha variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, ya se haga o no referencia específica a él.

20 "Biomarcador," tal como lo definen los Institutos Nacionales de Salud es "una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas de una intervención terapéutica."

25 "Colangiocarcinoma (CCA)" es un cáncer de los conductos biliares que drenan la bilis desde el hígado. Es un adenocarcinoma o cáncer glandular relativamente raro que se considera incurable y es rápidamente letal a no ser que sea posible extirpar completamente todo(s) el(los) tumor(es).

30 "Sonda de enumeración de cromosomas (CEP)" o "sonda centromérica" es cualquier sonda que permite enumerar el número de cromosomas específicos en una célula. Normalmente, una sonda de enumeración de cromosomas reconoce y se une a una región cerca de un cromosoma específico (denominado "peri-centromérico" o en el centrómero de un cromosoma específico, normalmente una secuencia de ADN repetitiva (p.ej., ADN alfa satélite). Normalmente, se considera que el centrómero de un cromosoma representa ese cromosoma, ya que durante la división celular es necesaria una segregación fiel. La supresión o amplificación de una región cromosómica en particular puede diferenciarse de la pérdida o ganancia del cromosoma completo (aneusomía), en la que reside normalmente, comparando el número de señales correspondientes al locus en particular (número de copias) con el número de señales que corresponden al centrómero. Un método para realizar esta comparación es dividir el número de señales que representa el locus por el número de señales que representa el centrómero. Las relaciones de menos de uno indican una supresión o pérdida relativa del locus y las relaciones superiores a uno indican una amplificación o ganancia relativa del locus. De manera similar, puede realizarse la comparación entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo en dos brazos del cromosoma, para indicar ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma. Las personas expertas en la materia podrán deducir que es posible utilizar alternativamente una sonda de brazo cromosómico en lugar de una sonda centromérica para un cromosoma para aproximarse a la pérdida o ganancia cromosómica total. Sin embargo, dichas sondas no son tan precisas para enumerar cromosomas, ya que es posible que la pérdida de señales de dichas sondas no siempre indique una pérdida del cromosoma completo. Entre los ejemplos de sondas de enumeración de cromosoma se incluyen sondas CEP® distribuidas en el mercado por Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (antiguamente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

50 "Número de copias" es una medida del ADN, ya sea de un solo locus, de uno o más loci, o de un genoma completo. Un "número de copias" de dos es "de tipo silvestre" en un ser humano (por la diploidia, a excepción de los cromosomas sexuales). Un "número de copias" distinto de dos en un ser humano (a excepción de los cromosomas sexuales) se desvía del tipo silvestre. Estas desviaciones incluyen amplificaciones, es decir, un aumento del número de copias, y supresiones, es decir, disminución del número de copias e incluso ausencia de número de copias.

55 "Marcado", "marcado con un marcador detectable," y "marcado de manera detectable" se utilizan indistintamente en el presente documento para indicar que una entidad (p.ej., una sonda) puede ser detectada. "Marcador" y "marcador detectable" significan una fracción unida a una entidad para hacer que la entidad sea detectable, como por ejemplo, una fracción unida a una sonda para hacer que sea detectable la sonda tras la unión con una secuencia diana. La fracción por sí misma puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otra fracción. Se pretende que el uso de la expresión "marcado de manera detectable" abarque dicho marcaje. El marcador detectable se puede seleccionar de tal manera que el marcador genere una señal, que puede ser medida y cuya intensidad es proporcional a la cantidad de entidad unida. Se conoce una amplia variedad de sistemas de marcaje y/o detección de moléculas, como ácidos nucleicos, p.ej., sondas. Se pueden preparar ácidos nucleicos marcados mediante la incorporación o la conjugación de un marcador que es directamente o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos, químicos u otros medios. 65 Los marcadores detectables adecuados incluyen radioisótopos, fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, partículas magnéticas, partículas densas de electrones, marcadores

de masa, marcadores de espín, haptenos, y similares. En el presente documento son preferentes los fluoróforos y los agentes quimioluminiscentes.

5 "Sonda específica del locus" e "identificador específico de locus (LSI)" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento y se refieren a una sonda que se une selectivamente a un locus específico en una región de un cromosoma, p.ej., un locus que, según se ha determinado, para experimentar ganancia/perdida en la metástasis. Una sonda puede dirigirse a regiones codificantes o no codificantes, o ambas, incluyendo los exones, intrones, y/o secuencias reguladoras, como por ejemplo secuencias promotoras y similares.

10 "Muestra de ácido nucleico" se refiere a una muestra que comprende ácido nucleico en una forma adecuada para la hibridación con una sonda, como por ejemplo una muestra que comprende núcleos o ácidos nucleicos aislados o purificados de dichos núcleos. La muestra de ácido nucleico puede comprender ADN genómico total o parcial (p.ej., uno o varios cromosomas en particular), ARNm total o parcial (p.ej., cromosoma(s) o gene(s) en particular) o secuencia(s) seleccionada(s). Los cromosomas condensados (como, por ejemplo, los que están presentes en la interfase o metafase) son adecuados para su uso como dianas en la hibridación *in situ*, como por ejemplo HFIS.

15 "Cáncer pancreatobiliar" incluye todos los tipos de cáncer pancreatobiliar, como, por ejemplo, todos los tipos de carcinoma pancreático, p.ej., carcinoma de cabeza del páncreas y carcinoma del cuerpo del páncreas, así como colangiocarcinoma (CCA), tal como se ha descrito, p.ej., carcinoma del conducto biliar común y colangiocarcinoma hiliar y carcinoma de vesícula biliar.

20 "Límite predeterminado" y "nivel predeterminado" se refieren en general a un valor límite que se utiliza para evaluar los resultados del diagnóstico/pronóstico/eficacia terapéutica comparando los resultados del análisis frente al límite/nivel predeterminados, donde ya se ha ligado o asociado el límite/nivel predeterminados con varios parámetros clínicos (p.ej., gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etc.).

25 "Sonda", en el contexto de la presente divulgación, es un oligonucleótido o polinucleótido que se puede hibridar selectivamente con al menos una porción de una secuencia diana en condiciones que permiten o promueven la hibridación selectiva. En general, una sonda puede ser complementaria de la hebra de ADN codificante o efectora (+) de ADN o complementaria a la hebra de ADN no codificante o anti-sentido (-) (a veces denominada "complementaria inversa"). Las sondas pueden variar significativamente en su longitud. En algunas aplicaciones puede ser preferente una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, como por ejemplo aproximadamente 15 a aproximadamente 75 nucleótidos, p.ej., de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, mientras que puede ser preferente una longitud de aproximadamente 50-1x10⁵ nucleótidos para sondas cromosómicas y puede ser preferente una longitud de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 800.000 nucleótidos para las sondas específicas de locus.

30 "Hibridar de manera selectiva con" (así como "hibridación selectiva", "hibridar específicamente con", e "hibridación específica"), en el contexto de la presente divulgación, se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico, preferentemente, con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas. La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridara preferentemente con su secuencia diana, y en menor medida, o nada en absoluto, con otras secuencias no diana. Una "hibridación rigurosa" y unas "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de la hibridación de ácidos nucleicos (p.ej., en forma de matriz, hibridación de Southern, hibridación Northern, o HFIS) son dependientes de la secuencia y difieren en diferentes condiciones. Puede encontrarse una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY (1993) ("Tijssen"). En general, la hibridación y las condiciones de lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (a una concentración iónica y pH definidos) en la que 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente apareada. Las condiciones estrictamente 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 Southern o Northern es de 42 °C utilizando soluciones de hibridación convencionales (véase, p.ej., Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York (2001)).

50 "Secuencia diana", "región diana" y "diana de ácido nucleico" se refieren a una secuencia de nucleótidos que se encuentra en un emplazamiento cromosómico específico cuya pérdida y/o ganancia, por ejemplo, se está determinando.

La terminología utilizada en el presente documento tiene como fin únicamente describir realizaciones en particular y no se pretende de otro modo que sea exhaustiva.

65 **Métodos para detectar, diagnosticar, pronosticar, supervisar la recurrencia y supervisar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico de cáncer pancreatobiliar**

Se proporciona un método de detección de displasia de alto grado o cáncer pancreatobiliar o para deducir un mayor riesgo en un paciente. El método comprende el contacto de una muestra de células pancreatobiliares del paciente con un conjunto de sondas marcadas detectablemente que comprende una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 en condiciones de hibridación y determinación de la presencia de anomalías cromosómicas. Polisomía es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar, mientras que tetrasomía, pérdida de P16, ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16 o ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con la pérdida de P16 concurrente hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. En particular, polisomía (más de dos copias de dos o más loci por célula), como por ejemplo en ≥ 4 células, es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar y tetrasomía (cuatro copias en cada locus), como por ejemplo en ≥ 11 células o pérdida de P16 (ausencia de 9p21), como por ejemplo en al menos 5 % de células o ganancia de un solo locus (más de dos copias en un solo locus por célula) de MCL1, MYC o P16 en ≥ 8 células o ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente en ≥ 4 células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. El método puede utilizarse para distinguir cáncer de un estado inflamatorio benigno, para identificar una lesión precancerosa, para proporcionar una herramienta de reconocimiento prematuro para pacientes con colangitis esclerosante primaria CEP) de los que se tienen datos sobre el riesgo de CCA y para proporcionar información sobre anomalías cromosómicas y favorecer decisiones terapéuticas y/o proporcionar información de pronóstico, así como otros beneficios, tal como se describe en el presente documento.

Las muestras de células pancreatobiliares pueden obtenerse a través de cualquier método adecuado. Un método preferente es por cepillado durante la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE).

Este método puede llevarse a cabo utilizando cualquier método de detección adecuado conocido en la técnica. Preferentemente, este método se lleva a cabo utilizando hibridación *in situ*, como por ejemplo, hibridación de fluorescencia *in situ* (HFIS). Preferentemente, se marca detectablemente cada una de las sondas y cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente en la misma muestra, preferentemente, se marca detectablemente cada una de las sondas con un marcador diferenciado, por ejemplo un fluoróforo diferenciado.

Cuando se llevan a cabo estos métodos por hibridación *in situ*, en la que se marca detectablemente cada una de las sondas (y cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente en la misma muestra, marcadas diferenciadamente), como por ejemplo por HFIS, en la que se marca cada una de las sondas (y cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente en la misma muestra marcada de forma diferenciada) con un fluoróforo, se pueden llevar a cabo los métodos en una muestra de células pancreatobiliares que son recientes (las células recientes se pueden cultivar durante 1-3 días y se puede añadir un bloqueante como Colcemid, al cultivo para bloquear las células en metafase, durante lo cual se condensan en gran medida los cromosomas y se pueden visualizar), congeladas o fijadas (p.ej., fijada en formalina e incluida en parafina), tratarse (p.ej., con ARNasa y pepsina) para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico diana (p.ej., ADN) y reducir la unión no específica y someterse después a hibridación con una o más sondas, lavado para eliminar las sondas no unidas y detección de sondas hibridadas. Por ejemplo, se puede aplicar una suspensión de células en una sola capa sobre un portaobjetos y medirse la densidad celular con un microscopio óptico o de contraste de fases, hasta obtener la densidad de células deseada. Se puede sumergir el portaobjetos en solución salina de citrato sódico durante 10 minutos a 37 °C, 0,05 % de pepsina en HCl durante 13 minutos a 37 °C, PBS durante cinco minutos a temperatura ambiente, 1 % formaldehído durante cinco minutos a temperatura ambiente y PBS durante cinco minutos a temperatura ambiente, pasarse a través de alcohol graduado y secarse. Se puede montar una sección (aproximadamente 5 μm de espesor) de una muestra fijada en formalina e incluida en parafina (FFPE) de células pancreatobiliares sobre un portaobjetos, como por ejemplo un portaobjetos cargado positivamente SuperFrost Plus (distribuido por ThermoShandon, Pittsburgh, PA), hornear a 56 °C durante toda la noche, desparafinar, sumergir en 1 x solución salina de citrato sódico, pH 6,3, a 80 °C durante 35 minutos y lavarse con agua durante tres minutos. Después de la digestión con proteasa (4 mg de pepsina/ml y HCl 0,2 N) a 37 °C durante 15 minutos, se puede aclarar la sección en agua durante tres minutos, pasar a través de etanol graduado y secarse. Preferentemente, la hibridación con una o más sondas, tal como se ha descrito, utilizando una sección o portaobjetos de FFPE con suspensión de células (es decir, portaobjetos de citología) se lleva a cabo a 37 °C durante 16-18 horas en un horno de co-desnaturalización automático (HYBrite o ThermoBrite Denaturation/Hybridization System, Abbot Molecular, Inc., Des Plaines, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (dichos métodos implican normalmente la desnaturalización de las sondas y ácidos nucleicos diana). Tras la hibridación, la sección o portaobjetos de citología se coloca preferentemente en un tampón de lavado (2 x solución salina de citrato sódico/0,3 % de NP40; distribuido por Abbott Molecular, Inc.), a temperatura ambiente durante 2-10 minutos para retirar el cubreobjetos y se sumerge después en tampón de lavado a 73 °C durante dos minutos, se seca y se monta con solución anti-desvanecimiento de diclorhidrato hidrato de 4'6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Abbott Molecular, Inc.). Preferentemente, se analiza el portaobjetos con un microscopio epi-fluorescencia equipado con filtros pasobanda simples (Abbott Molecular, Inc.).

Antes de la detección, se pueden pre-seleccionar opcionalmente las muestras de célula sobre la base de anomalías citológicas aparentes. La preselección sirve para identificar células sospechosas, lo cual permite que

el reconocimiento se focalice en dichas células. La preselección permite un reconocimiento más rápido y aumenta la probabilidad de que no se pierda un resultado positivo. Se pueden colocar las células de una muestra biológica sobre un portaobjetos de microscopio y explorar a simple vista en cuanto a las anomalías citológicas comúnmente asociadas con células displásicas y neoplásicas. Dichas anomalías incluyen anomalías del tamaño nuclear, la forma nuclear y la tinción nuclear, tal como se evalúa con colorantes de contraste de núcleos con colorantes y tintes de ácidos nucleicos, como yoduro de propidio o diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), generalmente tras la hibridación de sondas de los ADN diana. Normalmente, las células neoplásicas albergan núcleos que son alargados, de forma irregular y/o que presentan un patrón de tinción moteado. El yoduro de propidio, utilizado normalmente a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un tinte específico de ADN de fluorescencia roja que se puede observar en una longitud de onda del pico de emisión de 614 nm. DAPI, utilizado normalmente a una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml, es un colorante específico de ADN de fluorescencia azul que se puede observar a una longitud de onda del pico de emisión de 452 nm con un filtro DAPI con un bajo aumento. En este caso, se someten a recuento en cuanto a las pérdidas y/o ganancias cromosómicas solamente las células preseleccionadas para la detección. Preferentemente, se seleccionan para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas células preseleccionadas en el orden de al menos 100, preferentemente, más, cuando resulta haber muchas células con nucleicos anormales utilizando el filtro DAPI.

Alternativamente, puede localizarse un área en un tejido que da evidencia de cierto nivel de displasia o una lesión sospechosa utilizando el filtro DAPI con un bajo aumento e inspeccionarse a fondo en cuanto a la presencia de núcleos que albergan números de copias anormales de cualquier sonda. En una célula normal, se detectarán dos copias de una sonda dada. En una célula anormal, se detectarán más o menos copias de una sonda dada. Preferentemente, se seleccionan para la enumeración las áreas con los cambios más significativos del número de copias. Siempre que sea posible, se seleccionan numerosas áreas anormales y, dentro de cada área anormal, se analizan al menos aproximadamente 10 núcleos al azar con alta potencia (objetivo de 64 x o 100 x) de tal manera que se analicen aproximadamente 100 núcleos. Preferentemente, los núcleos son no-solapantes y albergan suficientes señales brillantes.

Alternativamente, las células para detección pueden seleccionarse independientemente de las características citológicas o histológicas. Por ejemplo, se pueden evaluar todas las células no solapantes de un área determinada o áreas de un portaobjetos de microscopio en cuanto a las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Según un ejemplo más, se pueden seleccionar las células en un portaobjetos, p.ej., células que presentan una morfología alterada, del orden de al menos aproximadamente 50 y más preferentemente al menos aproximadamente 100, en número que aparecen en orden consecutivo sobre un portaobjetos de microscopio para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

Se hace el recuento de las copias de MCL1 (1q21), RFCE (7p12), MYC (8q24) y P16 (9p21).

Por tanto, dichos métodos comprenden el contacto de una muestra de células pancreatobiliares obtenidas de un paciente, p.ej., una muestra de ácido nucleico, con un conjunto de sondas marcadas detectablemente que comprende una sonda específica de locus para MCL1, una sonda específica de locus para RFCE, una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 en condiciones que permiten (o promueven) la unión de la sonda selectivamente con su secuencia de ácido nucleico diana y forma un complejo de hibridación estable. Dichos métodos comprenden además la detección de la formación de complejos de hibridación y el recuento del número de complejos de hibridación. Teniendo en cuenta el número de complejos de hibridación que comprenden MCL1 (1q21), RFCE (7p12), MYC (8q24) y P16 (9p21), el método comprende además la determinación del número de copias de MCL1 (1q21), RFCE (7p12), MYC (8q24) y P16 (9p21). Si se desea, se puede comparar el número de copias con el número de copias esperado o "normal" (es decir, 2 copias), donde un número de copias superior a 2 (es decir, para una ganancia) y un número de copias inferior a 2 (es decir, para una pérdida), según sea apropiado, indica que la célula es anormal por HFIS. La presencia de más de dos copias o dos o más loci es indicativa de polisomía. La presencia de polisomía en ≥ 4 células es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. Un aumento del número de copias de un solo locus, como por ejemplo más de dos copias de un solo locus, es indicativo de ganancia de un solo locus. Una ganancia de un solo locus en ≥ 8 células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. Un aumento del número de copias de un solo locus con pérdida de P16 concurrente, como, por ejemplo, más de dos copias de un solo locus y cero o una copia de P16, es indicativa de ganancia de un solo locus con pérdida de P16 concurrente. Una ganancia de un solo locus con pérdida de P16 concurrente en >4 células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. La presencia de cuatro copias de todos los loci es indicativa de tetrasomía. La presencia de tetrasomía en ≥ 11 células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. La ausencia de señales P16 es indicativa de pérdida de P16. La ausencia de P16 en al menos 5 % de las células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar.

Si bien la desparafinación, el pretratamiento, la tinción y el lavado del portaobjetos de rutina pueden llevarse a cabo de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, el uso de un sistema automático, sin embargo, como por

ejemplo el proceso VP 2000 Process (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) disminuye la cantidad de tiempo necesario para preparar los portaobjetos para evaluación. Los portaobjetos se pueden preparar en grandes lotes (p.ej., 50 portaobjetos), en contraposición con lotes pequeños (p.ej., 4 portaobjetos) cuando se utilizan frascos Coplin para el lavado tras la hibridación. Por otra parte, la calificación de portaobjetos se puede automatizar totalmente por creación de imágenes automática, reduciendo así la cantidad de tiempo invertido necesario para el análisis de las muestras. La total automatización permite también el uso de un algoritmo de imagen que captura más células anormales más frecuentemente y con mayor consistencia. Asimismo, si bien es posible utilizar cualquier método adecuado para la preparación de portaobjetos conocido en la técnica, preferentemente, se preparan los portaobjetos utilizando ThinPrep 2000 (Hologic, Inc., Bedford, MA), que genera monocapas de células más uniformes y consistentes.

Otros métodos ya conocidos en la técnica o que están en vías de desarrollo actualmente pueden requerir o prefieren el uso de una muestra de células pancreatobiliares distinta a las células fijadas en formalina e incluidas en parafina, p.ej., células recientes o congeladas, células homogenizadas, células lisadas o ácidos nucleicos aislados o purificados (p.ej., una "muestra de ácido nucleico" como, por ejemplo, ADN) a partir de células pancreatobiliares (se pretende que "muestra de células pancreatobiliares", tal como se utiliza en el presente documento, abarque todas las formas de una muestra de células pancreatobiliares que permiten determinar el número de copias y ganancia/pérdida). Los núcleos también pueden extraerse de secciones espesas de muestras incluidas en parafina para reducir truncamientos de artefactos y eliminar material incluido extraño. Normalmente, una vez obtenidas, se recogen y se procesan las muestras biológicas antes de la hibridación aplicando métodos convencionales conocidos en la técnica. Dicho procesamiento incluye normalmente el tratamiento con proteasa y la fijación adicional en una solución de aldehído, como por ejemplo formaldehído.

Entre los ejemplos de métodos que se pueden utilizar en este punto, se incluyen, pero sin limitarse a ellos, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (Q-PCR), Q-PCR en tiempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA), exploración densitométrica de productos PCR, PCR digital, opcionalmente, con pre-amplificación del(los) gen(es) y/o región(es) cromosómicas para las que se determina el número de copias (véase p.ej., Vogelstein et al., PNAS USA 96: 9236-9241 (1999); solicitud de patente estadounidense No. 2005/0252773; y publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2009/0069194), hibridación genómica comparativa (CGH; véase, p.ej., Kallioniemi et al., Science 258: 818-821 (1992); y publicación de solicitud de patente internacional No. WO 93/18186), análisis de microsatélite o análisis de alelotipo de Southern, transferencia de puntos, matrices, micromatrices (Carter, Nature Genetics Supplement 39: S16-S21 (julio 2007)), hibridación múltiple de sonda amplificable (MAPH), amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA; véase, p.ej., Schouten et al., Nucleic Acids Res. 30: e 57 (2002)), cromatografía de líquidos de alto rendimiento desnaturalizante (dHPLC; Kumar et al., J. Biochem. Biophys. Methods 64(3): 226-234 (2005)), hibridación específica de alelo dinámica (DASH), medición de longitudes de sondas fluorescentes sobre ADN genómico peinado (Herrick et al., PNAS 97(1): 222-227 (2000)), pirosecuenciación de referencia (RQPS; Liu et al, Cold Spring Harb protoc doi: 10.1101/pdb.prot5491 (2010)), mapeo de extremos fósmidos en una secuencia de referencia (tecnología basada en capilar), secuenciación microelectroforética y nanoporos (véase, por ejemplo, Service, Science 311: 1544-1546 (2006); y Shendure et al, Nat Genet Rev. 5: 335-344 (2004)), y similares.

La desnaturalización de las dianas de ácido nucleico para el análisis mediante hibridación *in situ* y métodos similares normalmente se realiza de una manera tal como para preservar la morfología celular. Por ejemplo, el ADN cromosómico puede ser desnaturalizado con un pH alto, calor (p.ej., temperaturas de aproximadamente 70-95 °C), disolventes orgánicos (p.ej., formamida) y combinaciones de los mismos. Las sondas, por el contrario, pueden desnaturalizarse con calor en cuestión de minutos.

Después de la desnaturalización, se lleva a cabo la hibridación. Las condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico incluyen generalmente las combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un método de hibridación determinado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones pueden ser determinadas fácilmente por las personas expertas en la materia. Dichas condiciones implican normalmente temperatura controlada, fase líquida y el contacto entre una sonda y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores, incluyendo la concentración de sonda, la longitud de la diana, el contenido de G-C en la diana y la sonda, la composición del disolvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente, se puede someter la sonda y la diana juntos a condiciones de desnaturalización mientras están en contacto entre sí, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación se puede lograr con la posterior incubación de la sonda/muestra, por ejemplo, en una fase líquida de una mezcla con una relación en volumen de aproximadamente 50:50 de 2-4 x SSC y formamida, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55 °C durante un periodo de tiempo, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferentemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 40 °C durante un periodo de tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente de bloqueo, como, por ejemplo, el ácido nucleico de bloqueo no marcado, tal como se describe en la patente estadounidense No. 5.756.696. Se pueden emplear fácilmente otras condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, tal como podrán deducir fácilmente las personas expertas 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).

5 Una vez completado un periodo de incubación adecuado, puede eliminarse la unión no específica de sondas cromosómicas a la muestra de ADN a través de una serie de lavados. La temperatura y concentraciones de sal se seleccionan 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 puede determinarse mediante la hibridación sistemática de sondas con muestras de composición genética conocida. En general, los lavados de alta rigurosidad se pueden llevar a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a 10 aproximadamente 80 °C con aproximadamente 0,2 x SSC a aproximadamente 2 x SSC y aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de un detergente no iónico, como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de rigurosidad menor, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura inferior con un aumento de la concentración de sal.

15 Cuando se utilizan sondas o composiciones de sondas marcadas con fluoróforo, el método de detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Se puede utilizar cualquier método de imagen microscópica adecuado en combinación con los métodos en el presente documento para observar múltiples fluoróforos. En el caso en el que se emplea la microscopía de 20 fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden visualizar bajo luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiados. Alternativamente, se pueden utilizar sistemas de imágenes digitales automáticos, como los sistemas MetaSystems, BioView o Applied Imaging, junto con la enumeración de la señal y los algoritmos de adquisición de datos.

25 Dependiendo del método empleado, se puede utilizar un sistema de análisis de imagen digital para facilitar la visualización de los resultados y para mejorar la sensibilidad de detección de pequeñas diferencias en la intensidad de fluorescencia. Un ejemplo de sistema es QUIPS (un acrónimo de sistema de procesamiento de imágenes cuantitativo), que es un sistema de análisis de imágenes automático basado en un microscopio de fluorescencia normal equipado con una etapa automática, control de foco y rueda de filtros (Ludl Electronic Products, Ltd., 30 Hawthorne, NY). La rueda de filtros está montada en la trayectoria de excitación de fluorescencia del microscopio para la selección de la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en el bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin cambio de registro de imágenes. El microscopio tiene dos puertos de cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, CA) para la visualización de imágenes de vídeo sensibles a alta velocidad, que se utiliza para encontrar 35 áreas de interés en un portaobjetos así como para enfocar. El otro puerto de la cámara tiene una cámara CCD refrigerada (modelo 200 de Photometrics Ltd., Tucson, AZ), que se utiliza para la adquisición de la imagen real con alta resolución y sensibilidad. La cámara CCD refrigerada está interconectada con una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un bus VME. Toda la adquisición de imágenes a todo color se controla mediante un paquete de software de procesamiento de imágenes SCIL-Image (Centro de 40 Procesamiento de Imágenes Delft, Delft, Países Bajos).

En la matriz CGH (aCGH) las sondas están inmovilizadas en distintos emplazamientos sobre un sustrato y no están marcadas (véase, p.ej., la publicación de solicitud de patente internacional No. WO 96/17958). En cambio, los ácidos nucleicos de la muestra, que comprenden ácido(s) nucleico(s) diana están marcados. Cada uno de los ácidos 45 nucleicos de la muestra está marcado antes de la hibridación o los complejos de hibridación están marcados de forma detectable. En aCGH a dos colores o a todo color, la matriz de sondas se hibrida simultáneamente o secuencialmente con dos o más colecciones de ácidos nucleicos diana marcados de forma diferente.

Estos métodos se pueden utilizar para pronosticar cáncer pancreatobiliar, supervisar la eficacia del tratamiento profiláctico o terapéutico (p.ej., la administración inhibidores de tirosina quinasa a pacientes con tumores que sobre- 50 expresan RFCE) de cáncer pancreatobiliar y la supervisión de la recurrencia de cáncer pancreatobiliar. Pueden aplicarse los métodos para confirmar los métodos obtenidos con otros métodos de detección. Con la aplicación de estos métodos puede evaluarse el riesgo de cáncer en pacientes con lesiones pre-cancerosas, así como la agresividad del cáncer (p.ej., más anormalidades cromosómicas y/o anormalidades cromosómicas más extendidas en células de efecto de campo). Dichos métodos pueden emplearse asimismo para favorecer las decisiones del 55 tratamiento, p.ej., vigilancia activa, cirugía o terapia (p.ej., la administración de inhibidores de tirosina quinasa a pacientes con tumores que sobre-expresan RFCE) y decisiones de tratamiento con adyuvantes. Si se desea, se pueden emplear los métodos descritos en el presente documento en combinación con otras pruebas, como por ejemplo, citología de rutina, histología, ensayo de antígeno específico de próstata (PSA), nomograma, metilación, 60 mutación y similares.

Por lo tanto, el método puede comprender además diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente del que se ha obtenido la muestra de análisis. Si el método comprende además evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente del que se ha obtenido la muestra 65 de análisis, el método comprende además opcionalmente modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del

paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método puede adaptarse para su uso en un sistema automático o en un sistema semi-automático.

5 Generalmente, puede emplearse un nivel predeterminado como referencia con respecto al cual se evalúan los resultados obtenidos en el ensayo de una muestra de células pancreatobiliares para detectar anomalías cromosómicas. Generalmente, al realizar dicha comparación, se obtiene el nivel predeterminado realizando un ensayo, en particular, un número de veces suficiente y en las condiciones apropiadas, de tal manera que se pueda asociar o vincular una anomalía cromosómica en particular (presencia o nivel) con una fase o criterio de valoración en particular, de la enfermedad, el trastorno o la afección o con indicaciones en particular. Normalmente, el nivel predeterminado se obtiene con los ensayos de los sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos).

15 En particular, con respecto a un nivel predeterminado, tal como se emplea para supervisar la progresión y/o tratamiento, la anomalía cromosómica (presencia o nivel) puede ser "sin cambios", "favorable" (o "alterada favorablemente"), o "desfavorable" (o "alterada desfavorablemente"). "Elevado" o "mayor" se refieren a un nivel de anomalía cromosómica en una muestra de células pancreatobiliares que es superior a un nivel o intervalo típico o normal (p.ej., nivel predeterminado), o es más alto que otro nivel o intervalo de referencia (p.ej., muestra anterior o basal). El término "menor" o "reducido" se refiere a un nivel de alteración cromosómica en una muestra de células pancreatobiliares que es menor que un nivel o intervalo (por ejemplo, nivel predeterminado) típico o normal, o es inferior a otro nivel o intervalo de referencia (p. ej., muestra anterior o basal). El término "alterado" se refiere a un nivel de anomalía cromosómica en una muestra de células pancreatobiliares que se altera (aumenta o disminuye) sobre un nivel o intervalo típico o normal (p.ej., nivel predeterminado) o sobre otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra anterior o basal).

25 El nivel o intervalo típico o normal para una alteración cromosómica determinada se define de acuerdo con la práctica normal. Dado que los niveles de anomalías cromosómicas en algunos casos serán muy bajos, se pueden considerar que se ha producido lo que se conoce como un nivel alterado o alteración cuando hay cualquier cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal, o nivel o intervalo de referencia, que no puede ser explicado por error experimental o variación de la muestra. Por lo tanto, el nivel medido en una muestra en particular se compara con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de lo que se conoce como sujeto normal. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo sin enfermedad detectable y un paciente o población "normal" o de "control" es el/la que presenta una enfermedad no detectable, respectivamente, por ejemplo. Además, dado que las anomalías cromosómicas no se encuentran rutinariamente en altos niveles en la mayoría de la población humana, un "sujeto normal" puede ser considerado un individuo sin ningún aumento sustancial del nivel detectable de una anomalía cromosómica determinada, y un paciente o población "normal" (a veces denominado "control") es el/la que no presenta sustancialmente ningún aumento sustancial del nivel detectable de una anomalía cromosómica determinada. Un "sujeto aparentemente normal" es aquel en el que las anomalías cromosómicas no se han evaluado o están siendo evaluadas. Se dice que el nivel de una anomalía cromosómica determinada es "elevado" cuando no se puede detectar normalmente la anomalía cromosómica, pero se detecta en una muestra de análisis, así como cuando el analito está presente en la muestra de análisis a un nivel superior al normal. Por lo tanto, entre otras cosas, la divulgación proporciona un método de reconocimiento de un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, cáncer pancreatobiliar.

El método también puede implicar la detección de otros marcadores y similares.

45 Los métodos descritos en el presente documento pueden aplicarse también para determinar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer pancreatobiliar o no. Específicamente, dicho método puede comprender las etapas de:

- 50 (a) determinar las anomalías cromosómicas en una muestra de células pancreatobiliares de un sujeto (p.ej., aplicando los métodos descritos en el presente documento, o métodos conocidos en la técnica); y
 (b) comparar los niveles de anomalías cromosómicas determinados en la etapa (a) con niveles predeterminados, donde, si los niveles de anomalías cromosómicas determinados en la etapa (a) son favorables con respecto a los niveles predeterminados, se determina entonces que el sujeto tiene un menor riesgo de tener cáncer pancreatobiliar. Sin embargo, si los niveles de anomalías cromosómicas determinados en la etapa (a) son desfavorables con respecto a los niveles predeterminados, entonces se determina que el sujeto tiene o está en riesgo de tener cáncer pancreatobiliar.

Asimismo, se proporciona en el presente documento un método de supervisión de la progresión del cáncer pancreatobiliar en un sujeto. De manera óptima, el método comprende las etapas de:

- 60 (a) determinar anomalías cromosómicas en una muestra de células pancreatobiliares de un sujeto;
 (b) determinar los niveles de anomalías cromosómicas en una muestra posterior de células pancreatobiliares del sujeto;
 y
 65 (c) comparar los niveles de anomalías cromosómicas, tal como se ha determinado en la etapa (b) con los niveles de anomalías cromosómicas tal como se determina en la etapa (a), donde, si los niveles en la etapa

(b) no se han modificado o son desfavorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces se determina que continúa, progresa o empeora el cáncer pancreatobiliar en el sujeto. En comparación, si los niveles tal como se determina en la etapa (b) son favorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces es probable que el cáncer pancreatobiliar se haya interrumpido, haya retrocedido o mejorado en el sujeto.

Opcionalmente, el método comprende además comparar los niveles de anomalías cromosómicas, tal como se determina en la etapa (b), por ejemplo, con niveles predeterminados. Además, opcionalmente, el método comprende el tratamiento del sujeto, por ejemplo, con una o más composiciones farmacéuticas, radiación y/o terapia hormonal, durante un período de tiempo si la comparación muestra que los niveles, tal como se determina en la etapa (b), por ejemplo, están desfavorablemente alterados con respecto a los niveles predeterminados.

Asimismo también, se pueden utilizar los métodos para supervisar el tratamiento en un sujeto que recibe el tratamiento, p.ej., con una o más composiciones farmacéuticas, radiación y/o terapia hormonal. Específicamente, dichos métodos implican proporcionar una primera muestra de células pancreatobiliares de un sujeto antes de que el sujeto haya sido tratado. A continuación, se determinan los niveles de anomalías cromosómicas en la primera muestra de células pancreatobiliares (por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento o tal como se conoce en la técnica). Después de determinar los niveles de anomalías cromosómicas, opcionalmente, se comparan los niveles a continuación con los niveles predeterminados. Si los niveles, tal como se determina en la primera muestra de células pancreatobiliares son más bajos que los niveles predeterminados, entonces no se trata al sujeto. Sin embargo, si los niveles determinados en la primera muestra de células pancreatobiliares son más altos que los niveles predeterminados, entonces se trata al sujeto durante un período de tiempo. La persona experta en la materia podrá determinar el período de tiempo que se trata al sujeto (por ejemplo, el período de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferentemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

Durante el curso del tratamiento, se obtienen una segunda y después posteriores muestras de células pancreatobiliares del sujeto. El número de muestras y el momento en el que se obtienen dichas muestras del sujeto no son críticos. Por ejemplo, se podría obtener una segunda muestra siete (7) días después de que el sujeto es tratado por primera vez, se podría obtener una tercera muestra dos (2) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, se podría obtener una cuarta muestra tres (3) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, se podría obtener una quinta muestra cuatro (4) semanas después de que el sujeto es tratado por primera vez, etc.

Una vez que se ha obtenido la segunda muestras y las muestras posteriores del sujeto, se determinan los niveles de anomalías cromosómicas en la segunda muestra y las muestras posteriores (p.ej., empleando los métodos descritos en el presente documento o tal como se conoce en la técnica). A continuación, se comparan los niveles tal como se determinan en la segunda muestra y en las muestras posteriores con los niveles tal como se determinan en la primera muestra (p.ej., la muestra que se comparó opcionalmente originalmente con el nivel predeterminado). Si los niveles tal como se determinan en la etapa (c) son favorables cuando se comparan con los niveles determinados en la etapa (a), entonces es probable que se haya interrumpido, haya retrocedido o haya mejorado el cáncer pancreatobiliar, y el sujeto debe continuar con el tratamiento. Sin embargo, si los niveles determinados en la etapa (c) son invariables o desfavorables cuando se comparan con los niveles tal como se determinan en la etapa (a), entonces se determina que el cáncer pancreatobiliar continúa, progresa o empeora, y el sujeto debe tratarse con una mayor dosis de composición farmacéutica, radiación, u hormona, por ejemplo, o debe tratarse al sujeto de manera diferente.

En general, para ensayos en los que se puede repetir la prueba (por ejemplo, supervisión de la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda muestra de análisis o muestra posterior en un período en el tiempo después de que se haya obtenido la primera muestra de análisis del sujeto. Específicamente, puede obtenerse una segunda muestra de análisis del sujeto minutos, horas, días, semanas o años después de que se haya obtenido la primera muestra de análisis del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de análisis puede obtenerse del sujeto en un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente

18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1,5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2,5 años, aproximadamente 3,0 años, aproximadamente 3,5 años, aproximadamente 4,0 años, aproximadamente 4,5 años, aproximadamente 5,0 años, aproximadamente 5,5 años, aproximadamente 6,0 años, aproximadamente 6,5 años, aproximadamente 7,0 años, aproximadamente 7,5 años, aproximadamente 8,0 años, aproximadamente 8,5 años, aproximadamente 9,0 años, aproximadamente 9,5 años o aproximadamente 10,0 años después de que se haya obtenido la primera muestra de análisis del sujeto.

Por otra parte, la presente divulgación se refiere también a métodos para determinar si un sujeto predispuesto a padecer o que padece cáncer pancreatobiliar se beneficiará del tratamiento. En particular, la divulgación se refiere a métodos de diagnóstico y productos complementarios. Por lo tanto, el método de "supervisión del tratamiento de la enfermedad en un sujeto" tal como se describe en el presente documento puede abarcar además, óptimamente, la selección o identificación de candidatos para la terapia.

Por lo tanto, en casos particulares, la divulgación también proporciona un método para determinar si un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener cáncer pancreatobiliar es un candidato para la terapia. Generalmente, el sujeto es alguien que ha experimentado algún síntoma de la enfermedad o que realmente ha recibido un diagnóstico de tener o estar en riesgo de tener, dicha enfermedad, y/o que presenta niveles desfavorables de anomalías cromosómicas, tal como se describe en el presente documento.

El método comprende opcionalmente un ensayo tal como se describe en el presente documento, donde se evalúan los niveles de anomalías cromosómicas antes y después del tratamiento de un sujeto. La observación de niveles desfavorables de anomalías cromosómicas tras el tratamiento confirma que el sujeto no se beneficia de recibir más tratamiento o un tratamiento continuado, mientras que la observación de los niveles favorables de anomalías cromosómicas tras el tratamiento confirma que el sujeto se beneficia de recibir un tratamiento adicional o continuado. Esta confirmación ayuda a gestionar los estudios clínicos y proporcionar una mejor atención al paciente.

Sondas

Se proporciona asimismo un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende, o consiste en, una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 2 de leucemia de células mieloides), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16.

Las sondas adecuadas para su uso como sondas específicas de locus se hibridan con una región específica en un cromosoma que contiene un gen. La sonda específica de locus para el gen MCL1 (1q21) puede hibridarse con todo el gen MCL2 o una porción del mismo en q21 en el cromosoma 1 (es decir, 1q21). Los estudios que se han publicado recientemente en relación con el gen MCL1 indican que este gen media TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionada con factor de necrosis de tumor) resistencia a células CCA (Werneburg et al., J. Biol. Chem. 282(30): 28960-28970 (2007)). TRAIL es un prometedor agente para la terapia contra el cáncer y por tanto, el estado de MCL1 en un tumor del paciente puede ser una valiosa información para adoptar decisiones terapéuticas.

La sonda específica de locus para EGFR se puede hibridar con el gen RFCE en p12 en el cromosoma 7 (es decir, 7p12). Se ha dirigido RFCE con éxito a inhibidores de tirosina quinasa en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña y cáncer de páncreas avanzado (DeHaan et al., Hum. Pathol. 38(3): 491-499 (marzo 2007)) y, por tanto, es otro gen de posible importancia terapéutica en el contexto de carcinoma pancreatobiliar. Por otra parte, RFCE está localizado en el cromosoma 7 y se ha demostrado que la ganancia del cromosoma 7 (es decir trisomía 7) en células pancreatobiliares es un factor de riesgo para la presencia de malignidad, ya que aproximadamente la mitad de los pacientes con trisomía 7 tienen un diagnóstico de carcinoma (Fritcher et al. (2009), *supra*; Moreno Luna et al., Gastroenterology 131(4): 1064-1072 (2006)).

La sonda específica de locus para MYC (8q24) puede hibridarse con todo el gen MYC gene o una porción del mismo en q24 en el cromosoma 8 (es decir, 8q24). La sonda específica de locus para el gen P16 (9p21) puede hibridarse con todo el gen P16 o una porción del mismo en p21 en el cromosoma 9 (es decir, 9p21).

Las sondas adecuadas para su uso como sondas cromosómicas se hibridan con ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de cromosomas de primate contienen una familia compleja de

repeticiones en tándem largo de ADN, que están compuestas de una longitud de repetición de monómero de aproximadamente 171 pares e base (pb) que se denomina ADN α -satélite. Las sondas cromosómicas tienen aproximadamente $10^{-1} \times 10^5$ nucleótidos de longitud. Las sondas más largas comprenden normalmente fragmentos más pequeños de aproximadamente 100-500 nucleótidos de longitud.

5 Las sondas de enumeración de cromosomas (CEP) y las sondas específicas de locus que se dirigen a una región o subregión de cromosoma se pueden obtener en el mercado o las pueden preparar fácilmente las personas expertas en la materia. Dichas sondas pueden obtenerse en el mercado de Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL), Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) o Cytocell (Oxfordshire, RU). Las sondas cromosómicas se pueden preparar por ejemplo
10 de ácidos péptido nucleicos (APN), ADN humano clonado, como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (CAB) y cromosomas artificiales P1 (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humanas. Se puede obtener una región de interés por amplificación PCR o clonación. En otra realización, las sondas cromosómicas pueden ser oligosondas. Alternativamente, se pueden preparar sondas cromosómicas por síntesis de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

15 Cuando se desea dirigir un locus de gen en particular, pueden ser preferentes sondas que se hibridan a lo largo de toda la longitud del gen dirigido, aunque no es necesario. Se puede diseñar una sonda específica de locus para su hibridación con un oncogen o gen supresor de tumor, cuya aberración genética se correlaciona con metástasis, p.ej., MYC.

20 Las sondas pueden prepararse a través de cualquier método conocido en la técnica. Las sondas se pueden sintetizar o producir por recombinación. Dichas sondas pueden oscilar en su longitud entre aproximadamente 25.000 pares de base y aproximadamente 80.000 pares de base.

25 Preferentemente, las sondas están marcadas detectablemente y cuando se utilizan dos o más sondas simultáneamente o secuencialmente en la misma muestra, preferentemente, cada sonda está marcada diferenciadamente. Preferentemente, las sondas están marcadas detectablemente con fluoróforos. Entre los ejemplos de fluoróforos preferentes, se incluyen pero sin limitarse a ellos ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), 5-carboxi-X-rodamina, 6-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-carboxifluoresceína, 6-
30 carboxifluoresceína, fluorescein-5-isotiocianato (FITC), ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-isotiocianato, tetrametilrodamina-6-isotiocianato, 5-carboxitetrametilrodamina, 6-carboxitetrametilrodamina, ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico, ácido N-4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-3-indacene propiónico, eosin-5-isotiocianato, eritrosina-5-isotiocianato, SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.), SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.), TEXAS RED (Molecular Probes, Inc.), amarillo Lucifer y acetilazida azul CASCADE (Molecular Probes, Inc.). El marcador utilizado en particular no es crítico; deseablemente, sin embargo, el marcador en particular no interfiere con la hibridación *in situ* de la sonda y la detección del marcador sobre cualquier otra sonda. El marcador se puede detectar en el número de copias más bajo posible para maximizar la sensibilidad del ensayo y se puede detectar por encima de cualquier señal de fondo. Asimismo, es deseable que el marcador proporcione una señal muy localizada, proporcionando así
40 un alto grado de resolución espacial.

La unión de fluoróforos a las sondas de ácido nucleico es muy conocida dentro de la técnica y se puede llevar a cabo a través de cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido en particular, por ejemplo, e incorporarse el nucleótido marcado en la sonda aplicando técnicas convencionales como desplazamiento de mella, cebado aleatorio (Rigby et al., J. Mol. Biol. 113: 237 (1997)), marcado PCR, marcado del extremo, marcado directo por modificación química de restos en particular, como por ejemplo restos citosina (patente estadounidense No. 5.491.224), y similares. Alternativamente, se puede unir covalentemente el fluoróforo a nucleótidos con brazos de engarce activados que se han incorporado en la sonda, por ejemplo, a través de un engarce a los nucleótidos desoxicitidina de la sonda que se ha transaminado. Los métodos para marcar sondas se describen en la patente estadounidense No. 5.491.224, y 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).

55 Las personas especializadas en la técnica reconocerán que es posible utilizar otros agentes y colorantes en lugar de fluoróforos como fracciones que contienen marcador. Entre los agentes luminiscentes se incluyen por ejemplo fracciones que contienen marcadores radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Entre los agentes que se pueden detectar con luz visible se incluyen colorantes de cianina. Alternativamente, se pueden emplear las fracciones de detección que se pueden visualizar por medios indirectos. Por ejemplo, se pueden marcar sondas con biotina o digoxigenina utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica y procesar después para su detección. La visualización de una sonda que contiene biotina puede conseguirse a través de la posterior unión de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso la visualización y discriminación de sondas puede conseguirse tal como se describe más adelante.

65 Las sondas cromosómicas hibridadas con regiones diana se pueden visualizar alternativamente a través de reacciones enzimáticas de fracciones de marcador con sustratos adecuados para la producción de productos de color insolubles. Cada una de las sondas se puede discriminar de las demás sondas dentro del conjunto mediante la

selección de una fracción de marcador diferenciada. La sonda que contiene biotina dentro de un conjunto puede detectarse a través de la subsiguiente incubación de avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP o peroxidasa de rábano rusticano (HRP) y un sustrato adecuado. 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y azol de nitro tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para fosfatasa alcalina, mientras que diaminobenzoato sirve como sustrato para HRP.

5

Kit

Se proporciona asimismo un kit. El kit comprende (a) un conjunto de sondas que permite la detección de un cáncer pancreatobiliar en un paciente y (b) instrucciones para detectar, diagnosticar, pronosticar y evaluar un tratamiento terapéutico/profiláctico de cáncer pancreatobiliar en un paciente. Por tanto, el kit puede comprender (a) un conjunto de sondas que permite la detección de cáncer pancreatobiliar en un paciente, donde el conjunto de sondas comprende o consiste en una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides 1), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 y (b) instrucciones para detectar cáncer pancreatobiliar en un paciente, donde las instrucciones comprenden determinar en una muestra de células pancreatobiliares del paciente la presencia de anomalías cromosómicas, donde la polisomía es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar, y la tetrasomía, pérdida de P16, ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16, o ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer de pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. En particular, la polisomía (más de dos copias/células de dos o más loci), como por ejemplo en ≥ 4 células, es indicativa de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. Una ganancia de un solo locus (más de dos copias/células) de MCL1, MYC o P16, como por ejemplo en ≥ 8 células, una ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente, como por ejemplo en > 4 células o tetrasomía (cuatro copias de cada locus), como por ejemplo en ≥ 11 células o pérdida de P16 (ausencia de P16), como por ejemplo en al menos 5 % de las células hace deducir un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar. Dichos kits pueden comprender además agentes bloqueantes u otras sondas, diversos marcadores, o agentes de marcaje para facilitar la detección de sondas, reactivos para hibridación (p.ej., tampones) cobertor metafase, y similares.

30

Ejemplos

Los ejemplos que se exponen a continuación sirven para ilustrar la presente divulgación. No se pretende que los ejemplos limiten el alcance de la invención reivindicada, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas en absoluto.

35

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la selección de sondas candidato.

40

Se llevó a cabo una revisión de la bibliografía para identificar alteraciones cromosómicas comunes propias de los tumores pancreatobiliares sobre la base de varios estudios de hibridación genómica comparativa (HGC) (Miller et al., J. Exp. Clin. Cáncer Res. 28: 62 (2009); Shiraishi et al., Oncology 60(2): 151-161 (2001); y Lee et al., J. Korean Med. Sci. 19(5): 682-687 (2004)). Se diseñaron y fabricaron nuevas sondas. UroVysion™ (Abbott Molecular, Des Plaines, IL), se evaluó también una sonda disponible en el mercado con fines comparativos. El primer conjunto de sondas consistió en una sonda específica de locus para RFCE (7p12) marcada con SpectrumRed™, una sonda específica de locus para MYC (8q24) marcada con SpectrumGreen™, una sonda específica de locus para P16 (9p21) marcada con SpectrumGold™ y una sonda centromérica para cromosoma 9 (sonda de enumeración de cromosomas 9 (CEP9®)) marcada con SpectrumAqua™. El segundo conjunto de sondas consistió en una sonda específica de locus para P53 (17p13) marcada con SpectrumRed™, una sonda centromérica para cromosoma 17 (CEP17®) marcada con SpectrumAqua™, una sonda específica de locus para ERBB2 (17q11) marcada con SpectrumGreen™ y una sonda específica de locus para AURKA (20q13) marcada con SpectrumGold™. El tercer conjunto de sondas consistió en una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides; 1q21.2) marcada con SpectrumRed™, una sonda específica de locus para D5S721 (5p15) marcada con SpectrumAqua™, una sonda específica de locus para CCND1 (ciclina D1; 11q13) marcada con SpectrumGold™ y una sonda específica de locus para TEL (12p13) marcada con SpectrumGreen™. El conjunto de sondas UroVysion™ consiste en una sonda centromérica para cromosoma 3 (CEP3®) marcada con SpectrumRed™, una sonda centromérica para cromosoma 7 (CEP7®) marcada con SpectrumGreen™, una sonda específica de locus para P16 (9p21) marcada con SpectrumGold™ y una sonda centromérica para cromosoma 17 (CEP17®) marcada con SpectrumAqua™.

60

Se llevó a cabo un estudio de selección de sondas para evaluar la calidad y precisión de la sonda para detectar carcinoma pancreatobiliar. Si bien la aplicación clínica pretendida con este ensayo es cepillado pancreatobiliar obtenido durante CPRE, se evaluaron muestras de extirpación de tumor ya que las células de interés están presentes de forma fiable en un gran número. Se identificaron resecciones de hígado (n = 14), conducto biliar (n = 1) y páncreas (n = 14) fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) que contenían carcinoma. Cada una de las

65

resecciones fue de un único paciente. Se prepararon cuatro portaobjetos para cada caso para análisis HFIS. Un patólogo evaluó con microscopio cada H&E (hematoxilina y eosina) correspondiente y se marcaron las áreas de interés (tumor y conductos benignos). De las 29 resecciones, se identificaron 16 áreas de CCA (dos áreas fueron de la misma resección/paciente) y se identificaron 14 áreas de adenocarcinoma pancreático. Se identificaron nueve conductos benignos dentro de nueve muestras de resección. Se marcaron simultáneamente las áreas de interés en los portaobjetos de tejido sin teñir y se hibridaron con tres conjuntos de sondas HFIS candidato y UroVysion™. Se utilizó un portaobjetos por separado para cada conjunto de sondas. Se evaluaron los portaobjetos hibridados utilizando un microscopio de fluorescencia equipado con filtros para visualizar cada uno de los cuatro fluoróforos de sonda. Se localizó el área de interés del portaobjetos HFIS y se evaluaron 50 células dentro de ése área. Se registró el número de señales para cada una de las áreas de las cuatro sondas por célula.

Todas las sondas fueron de alta calidad excepto la sonda específica de locus para P53 (17p13). La sonda fue muy pequeña y no específica. Por consiguiente, fue difícil con frecuencia diferenciarla y evaluarla.

Las ganancias de locus observadas en las muestras de tumor incluidas en parafina se muestran en la Figura 1, que es un gráfico de barras del porcentaje de células frente a la sonda. Se evaluó para cada sonda la proporción de células con ganancia del número de copias (> 2 copias por célula) entre 1.500 células de tumor. Se evaluó la proporción de células con ganancia del número de copias (> 2 copias por célula) entre 300 células normales. Tal como se muestra en la Figura 1, las cinco sondas que presentaron la máxima proporción de ganancia en las muestra de tumor incluyeron 8q24, 1q21, 7p12, 17q12 y 11q13.

En la Figura 2 se muestra el número de copias de sonda medio observado por sonda. Tal como se muestra en la Figura 2, las cinco sondas que presentaron el número de copias medio máximo incluyeron 8q24, 17q12, 20q13, 1q21 y 7p12.

En la Figura 3 se muestra la proporción de células con pérdida homocigótica. Se evaluó para cada sonda la proporción de células de tumor con pérdida homocigótica de cada locus (0 copias por célula) entre 1.500 células de tumor. Se evaluó para cada sonda la proporción de células normales con pérdida homocigótica de cada locus (0 copias por célula). Tal como se muestra en la Fig. 3, la sonda que presentó la máxima proporción de células con pérdida homocigótica fue 9p21. Más de un 40 % de células de carcinoma en este estudio tuvo una pérdida homocigótica.

Se llevó a cabo el análisis estadístico para determinar los valores límite óptimos para la detección de carcinoma empleando patrones de señal de todas las células registradas. Se utilizaron los nueve conductos benignos para representar el número de señales presentes en el tejido pancreatobiliar normal. Se llevaron a cabo los análisis ROC (característica operativa del receptor) para determinar los valores límite que mejor discriminaban las anomalías cromosómicas (ganancias y pérdidas) en células de tumor a partir de células con un contenido cromosómico normal para cada sonda sin falsos positivos (es decir, especificidad de 100 %), tal como se muestra en la Tabla 1. Para ser conservador, se aumentó el límite para 1q21 y 11q13 de 2 % (1 célula) a 4 % (2 células).

Tabla 1. Valores límite para cada sonda en muestras de tumor incluidas en parafina

Locus de sonda	Límite (%)	Ganancia o pérdida
1q21	4	Ganancia
CEP3®	8	Ganancia
5p15	8	Ganancia
7p12	18	Ganancia
CEP7®	38	Ganancia
8q24	24	Ganancia
9p21	14	Pérdida homocigótica
9p21 (UroVysion)	11	Pérdida homocigótica
CEP9®	8	Ganancia
11q13	4	Ganancia
12p13	18	Ganancia
17p13	8	Pérdida homocigótica
CEP17®	10	Ganancia
CEP17® (UroVysion)	4	Ganancia
17q12	10	Ganancia
20q13	10	Ganancia

Sobre la base de estos datos, se seleccionó la sonda específica de locus para P16 (9p21). La siguiente etapa del análisis estadístico de selección de sonda fue calcular la sensibilidad de varias combinaciones de sonda oncogénicas de tres sondas utilizando los límites establecidos de la Tabla 1 con una especificidad diana de 100 %. En la Tabla 2 se enumera el rendimiento de 25 combinaciones de sondas con una alta sensibilidad, así como UroVysion™ (CEP3®, CEP7® y CEP17®) con fines comparativos. Se muestra la sensibilidad de cada una de las sondas con la adición de la sonda específica de locus para P16 (9p21).

Tabla 2. Sensibilidad de varias combinaciones de tres sondas de loci de oncogén y sensibilidad con adición de sonda específica de locus para P16 (9p21) con especificidad de diana del 100 %.

ID Combo	Locus 1 Oncogén (ganancia)	Locus 2 Oncogén (ganancia)	Locus 3 Oncogén (ganancia)	Locus 4 Oncogén (pérdida)	Sensibilidad (%) de 3 loci (solo oncogénico) N=30	Sensibilidad (%) de 4 loci (oncogénico y 9p21) N=30	Especificidad N=9
28	1q21	17q12	11q13	9p21	28 (93,3)	29 (96,7)	9 (100)
16	1q21	7p12	11q13	9p21	27 (90,0)	29 (96,7)	9 (100)
22	1q21	8q24	11q13	9p21	27 (90,0)	29 (96,7)	9 (100)
32	7p12	8q24	11q13	9p21	27 (90,0)	29 (96,7)	9 (100)
18	1q21	7p12	17q12	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
24	1q21	8q24	17q12	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
26	1q21	17q12	5p15	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
27	1q21	17q12	7p12	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
29	1q21	17q12	12p13	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
30	1q21	17q12	20q	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
34	7p12	8q24	17q12	9p21	27 (90,0)	28 (93,3)	9 (100)
19	1q21	7p12	20q	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
25	1q21	8q24	20q	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
14	1q21	7p12	5p15	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
15*	1q21	7p12	8q24	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
17	1q21	7p12	12p13	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
20	1q21	8q24	5p15	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
21	1q21	8q24	7p12	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
23	1q21	8q24	12p13	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
31	7p12	8q24	5p15	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
33	7p12	8q24	12p13	9p21	26 (86,7)	28 (93,3)	9 (100)
37	7p12	17q12	11q13	9p21	25 (83,3)	29 (96,7)	9 (100)
36	7p12	17q12	5p15	9p21	25 (83,3)	28 (93,3)	9 (100)
UroVysion	CEP3	CEP7	CEP17	9p21	24 (80,0)	29 (96,7)	9 (100)
35	7p12	8q24	20q	9p21	23 (76,7)	27 (90,0)	9 (100)
38	7p12	17q12	12p13	9p21	22 (73,3)	27 (90,0)	9 (100)
*conjunto de sondas final							

Tabla 3. Sensibilidad del conjunto de sondas final cuando aumenta el número de sondas con respecto al número de muestras positivas para todas las sondas

Sonda(s)	Sensibilidad N (%)	No. de muestras "+" de todas las sondas
7p12	17 (56,8)	17
7p12 + 8q24	20 (66,7)	15
7p12 + 8q24 + 1q21	26 (86,7)	15
7p12 + 8q24 + 1q21 + 9p21	28 (93,3)	3

La sonda específica de locus para MYC (8q24) detectó ganancias con el máximo número de copias lo más frecuentemente en comparación con todas las demás sondas analizadas. El conjunto de sondas que incluyó MCL1 (1q21), RFCE (7p12), MYC (8q24) y P16 (9p21) presentó una sensibilidad mayor (86,7 %) que las sondas centroméricas de UroVysion™ (80,0 %). La sensibilidad de este conjunto de sondas (93,3 %) detectó solamente un caso menos de carcinoma con respecto a UroVysion™ (96,7 %).

Ejemplo 2

Este ejemplo describe el análisis de Cepillado CPRE utilizando las Sondas HFIS seleccionadas en el Ejemplo 1.

El objetivo de este estudio fue seleccionar límites para considerar una muestra anormal por HFIS utilizando muestras de cepillado pancreatobiliar de pacientes con un seguimiento clínico-patológico. A continuación, se comparará el rendimiento el nuevo conjunto de sondas para la detección de malignidad con el rendimiento de UroVysion™.

Los pacientes con estenosis pancreatobiliar sospechosos de carcinoma fueron sometidos a CPRE como parte de la práctica clínica en la Clínica Mayo durante lo cual se obtuvo un cepillado de la estenosis y se envió al Laboratorio de Citología Molecular. Se formularon los cepillados en aglomerados de células y se llevó a cabo el análisis HFIS utilizando el conjunto de sondas UroVysion™. Se consiguió en el laboratorio el aglomerado de células residual, cuando estuvo presente. Se identificaron retrospectivamente muestras de 97 pacientes únicos cuyos cepillados habían sido recibidos consecutivamente en el Laboratorio de Citología Molecular de la Clínica Mayo en 2005. Los

5 criterios de inclusión fueron: (a) clasificación definitiva de la estenosis como benigna o maligna en el seguimiento, (b) aglomerado de células residual disponible y (c) menos de un año de seguimiento clínico para pacientes sin carcinoma. La referencia para el carcinoma incluyó evidencia patológica (p.ej., biopsia, aspiración de aguja fina (AAF) y citología de rutina) y/o evidencia clínica (tumor o masa en la imagen, progresión del cáncer con metástasis evidente) de la malignidad. Para los pacientes con más de una muestra de procedimientos CPRE por separado, solamente se utilizó el primer cepillado/cepillado más temprano para el análisis. Cuando no estuvo disponible la muestra de cepillado más temprana, se utilizó el cepillado de la siguiente visita consecutiva.

10 Se generó una mezcla de sondas final que contenía cuatro sondas HFIS seleccionadas en el Ejemplo 1 con la siguiente formulación: MCL1 (1q21) etiquetados con SpectrumGold™, RFCE (7p12) etiquetado con SpectrumGreen™, MYC (8q24) etiquetado con SpectrumAqua™ y P16 (9p21) etiquetado con SpectrumRed™.

15 Se vertió la suspensión de células de cada aglomerado de células preparado en un portaobjetos de vidrio utilizando una pipeta y se hibridó con el conjunto de sondas final. Se codificaron las muestras con un número de identificación de estudio para asegurar la evaluación con ocultación de las muestras. Se analizaron los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia, que tenía filtros para la visualización para cada sonda fluorescente por separado para determinar el patrón de señal HFIS para cada célula. Partiendo de un extremo de cada muestra, se enumeraron y registraron los patrones de señal de 100 células epiteliales consecutivas. Los patrones HFIS incluyeron disomía (2 señales para cada sonda (pérdida de 9p21 homocigótica (0 copias de sonda 9p21), ganancia de un solo locus (> 2 copias de un locus), ganancia de un solo locus con pérdida de 9p21 concurrente (>2 copias de un locus con 0 o 1 copia de 9p21), tetrasomía (4 copias por sonda) y polisomía (>2 copias de 2 o más sondas). Tras el recuento de 100 células, se reconoció al continuación el resto de la muestra y se registró cualquier patrón HFIS anormal, cuando estuvo presente. Se consideró que una muestra no servía para diagnóstico cuando estuvieron presentes menos de 100 células o si las señales de hibridación o bien no estuvieron presentes o bien estaban oscurecidas.

25 Se categorizó cada una de las células de acuerdo con su patrón de señal HFIS. Para cada muestra se utilizó el recuento de 100 células para calcular el porcentaje de células con pérdida de 9p21 homocigótica. Para las demás anomalías HFIS (ganancia de un solo locus, ganancia de un solo locus con pérdida concurrente de 9p21, tetrasomía y polisomía), se tabuló el número absoluto de células anormales. Se consideró como benignos (normales) a los pacientes sin carcinoma para el análisis estadístico. Se generó una curva ROC para cada anomalía HFIS para seleccionar un límite que tenía la máxima sensibilidad al mismo tiempo que se mantenía una alta especificidad.

30 Para el estudio había 52 hombres y 45 mujeres, con una edad media de 57 años (intervalo de 20-86 años). Cuarenta y cinco pacientes (46 %) tenían colangitis esclerosante primaria (CEP). Cincuenta y cinco pacientes (57 %) presentaban un diagnóstico de carcinoma incluyendo colangiocarcinoma (CCA; n = 36), adenocarcinoma pancreático (n = 10), adenocarcinoma de vesícula biliar (n = 4), adenocarcinoma de colon metastásico (n = 2), adenocarcinoma de mama metastásico (n = 1), plasmacitoma (n = 1) y trastorno linfoproliferativo después de trasplante (n = 1). Siete muestras no presentaron resultados de HFIS diagnosticados por la falta de celularidad (n = 4), material oscurecido (n = 2) o falta de señales de hibridación (n = 1).

45 Sobre la base de los análisis de la curva Roc de pérdida homocigótica de 9p21 en enumeraciones de 100 células, se seleccionó el número absoluto de células con ganancia de un solo locus de 1q21, número absoluto de células con ganancia de un solo locus de 8q24, número absoluto de células con ganancia de un solo locus de 9p21, número absoluto de células con ganancia de un solo locus y pérdida de 9p21 concurrente (hemicigótica y homocigótica), número absoluto de células con tetrasomía y número absoluto de células con polisomía, valores límite óptimos en cuanto a la positividad utilizando el conjunto de sondas HFIS 1q21, 7p12, 8q24 y 9p21 sobre cepillados pancreatobiliares. En la Tabla 4 se muestran los límites.

50 Tabla 4. Valores límite para la positividad utilizando conjunto de sondas HFIS (1q21, 7p12, 8q24 y 9p21) en cepillados pancreatobiliares

Anormalidad HFIS	Valor límite
pérdida de 9p21 homocigótica	≥5/100 células
ganancia de un solo locus (1q21, 8q24, 9p21)	≥8 células
ganancia de un solo locus con pérdida de 9p21 concurrente (hemicigótica o homocigótica)	≥4 células
Tetrasomía	≥11 células
Polisomía	≥ 4 células

55 La aplicación de los valores límite para el nuevo conjunto de sondas tuvo como resultado 41 muestras positivas. En la Tabla 5 se muestra el número de muestras para cada anomalía HFIS correspondiente detectada utilizando el nuevo conjunto de sondas y los valores límite 5. Las muestras (n = 14) que alcanzaron valores límite de polisomía así como cualquier otra anomalía HFIS se categorizaron como polisomía. Las muestras (n = 2) que alcanzaron valores límite para la ganancia de un solo locus con pérdida de 9p21 concurrente así como ganancia de un solo locus se categorizaron como ganancia de un solo locus con pérdida de 9p21 concurrente.

Tabla 5. Anormalidades HFIS detectadas con el nuevo conjunto de sondas (1q21, 7p12, 8q24 y 9p21) sobre cepillados pancreatobiliares

Resultado HFIS	N	Número con carcinoma (%)
Negativo	50	13 (26)
pérdida de 9p21 homocigótica	1	1 (100)
ganancia de un solo locus (1q21, 8q24, 9p21)	3	2 (67)
ganancia de un solo locus con pérdida de 9p21 concurrente (hemicigótica o homocigótica)	4	4 (100)
Tetrasomía	1	1 (100)
Polisomía	32	28 (88)

Un total de 90 muestras tuvo resultados HFIS de diagnóstico con ambos conjuntos de sondas. Cuando se consideró el conjunto de sondas UroVysion™, polisomía fue la única anormalidad HFIS anormalidad considerada positiva según la práctica clínica normal. UroVysion™ fue verdaderamente positivo en 21 muestras, dos de las cuales fueron negativas con el nuevo conjunto de sondas. El nuevo conjunto de sondas HFIS fue verdaderamente positivo en 36 muestras, 18 de las cuales fueron negativas con UroVysion™. Las características de rendimiento del nuevo conjunto de sondas HFS (cuando se utilizaron los valores límite de la Tabla 4) en comparación con UroVysion™ para la detección de malignidad pancreatobiliar se muestran en la Tabla 6. El nuevo conjunto de sondas fue significativamente más sensible que UroVysion™ (73 % frente a 41 %, respectivamente). Un caso fue falso positivo con UroVysion™, mientras que cinco casos fueron falsamente positivo con el nuevo conjunto de sondas.

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de UroVysion™ en comparación con el nuevo conjunto de sondas para la detección de malignidad pancreatobiliar en muestras de cepillado

	N	Nuevo Conjunto de sondas	UroVysion™	Valor P (Prueba McNemar)
Sensibilidad	49	36 (73 %)	20 (41 %)	<0,001
Especificidad	41	36 (88 %)	40 (98 %)	0,046

Por lo tanto, se aplicó un nuevo conjunto de sondas HFIS que contiene sondas dirigidas a 1q21 (MCL1), 7p12 (RFCE), 8q24 (MYC) y 9p21 (P16) a las muestras de cepillado pancreatobiliar para la selección de los valores límite (Tabla 4). La sensibilidad asociada para la detección de malignidad pancreatobiliar fue significativamente mayor ($P < 0,001$) con el nuevo conjunto de sondas en comparación con el conjunto de sondas HFIS utilizado actualmente (es decir, UroVysion™). El nuevo conjunto de sondas detectó 16 pacientes más (32 %) con cáncer en comparación con UroVysion™. Se identificó a cinco pacientes sin malignidad como positivos con el nuevo conjunto de sondas, uno de los cuales se consideró también positivo con UroVysion™. La especificidad del nuevo conjunto de sondas en comparación con UroVysion™ fue significativamente diferente ($P = 0,046$).

Ejemplo 3

En este ejemplo se demuestra la validación de los límites empleados en el análisis de cepillado CPRE con las sondas HFIS en el Ejemplo 2.

Se evaluó un conjunto de muestras de cepillado del paciente por separado. Se comparó el rendimiento del nuevo conjunto de sondas con UroVysion™ y la citología de rutina para la detección de carcinoma.

Para la práctica normal, se recogieron los cepillados CPRE para citología de rutina y UroVysion™ HFIS. Se identificaron retrospectivamente aglomerados de células residuales de 112 pacientes únicos y consecutivos evaluados entre 2006 y 2008. Los criterios de inclusión y la referencia de malignidad fueron los mismos que los utilizados en el Ejemplo 2.

Según la práctica normal, se dividió cada muestra a partes iguales para citología de rutina y UroVysion™ HFIS en el Laboratorio de Citología Molecular de la Clínica Mayo. Para la citología de rutina, se tiñó con Pap un portaobjetos ThinPrep y un citopatólogo lo evaluó como negativo, atípico, sospechoso o positivo en cuanto a la malignidad. Se vertió manualmente una suspensión de células en un portaobjetos para hibridación con el conjunto de sondas FISH UroVysion™. Se consideraron positivos los portaobjetos HFIS cuando estuvieron presentes si ≥ 4 células polisómicas.

Se utilizaron retrospectivamente aglomerados de células residuales para preparar portaobjetos vertidos manualmente para hibridación con el conjunto de sondas HFIS pancreatobiliares. Se llevaron a cabo la preparación de portaobjetos, hibridación HFIS y análisis tal como se describe en el Ejemplo 2. Se aplicaron los valores límite del estudio de límite de cepillado (Tabla 4) a los recuentos de células generados del análisis de muestras de validación de cepillado para crear un resultado HFIS pancreatobiliar para cada muestra.

Hubo 67 hombres y 45 mujeres en el estudio, con una edad media de 58 años (intervalo, 23-94 años). Cuarenta y cinco de los pacientes (46 %) tenían CEP. Sesenta y cinco de los pacientes (58 %) presentaban un diagnóstico de carcinoma incluyendo CCA ($n = 49$), adenocarcinoma pancreático ($n = 8$), cáncer metastásico ($n = 4$),

adenocarcinoma de vesícula biliar (n = 3) y adenocarcinoma ampular (n = 1). Los resultados de la citología de rutina (Tabla 7) incluyeron 55 (49 %) negativo, 24 (21 %) atípico, 15 (13 %) sospechoso y 18 (16 %) positivo. En la Tabla 7 se muestra la proporción de muestras con carcinoma para la categoría de diagnóstico de citología de rutina.

5 Tabla 7. Proporción de muestras con carcinoma sobre la base de los resultados de la citología de rutina en 112 cepillados pancreatobiliares

Resultado de citología de rutina	No. con carcinoma
Negativo (n = 55)	24 (44 %)
Atípico (n = 24)	9 (38 %)
Sospechoso (n = 15)	14 (93 %)
Positivo (n = 18)	18 (100 %)

Los resultados HFIS (Tabla 8) incluyeron 50 (46 %) con polisomía; 4 (4 %) con tetrasomía; 6 (5 %) con ganancia de un solo locus de 1q21, 8q24 o 9p21; y 52 (46 %) negativo. En la Tabla 8 se enumera la proporción de muestras con carcinoma por categoría de diagnóstico HFIS.

10 Tabla 8. Proporción de muestras con carcinoma sobre la base de anomalías HFIS detectadas con el conjunto de sondas pancreatobiliares (1q21, 7p12, 8q24, 9p21) en 112 cepillados pancreatobiliares

Resultados del conjunto de sondas HFIS pancreatobiliares	No. con carcinoma
Negativo(n = 52)	12 (23 %)
Ganancia de un solo locus 1q21, 8q24 o 9p21 (n=6)	4 (67 %)
Ganancia de un solo locus 1q21, 7p12 o 8q24 con pérdida de 9p21 concurrente (n=0)	NA
Tetrasomía (n = 4)	1 (25 %)
Polisomía (n = 50)	48 (96 %)
NA = no aplicable	

15 En la Tabla 9 se muestran las características de rendimiento del conjunto de sondas HFIS pancreatobiliar (cuando se utilizaron los valores límite de la Tabla 4), UroVysion™ y citología de rutina en el conjunto de validación de cepillados. Según la práctica clínica normal con el conjunto de sondas UroVysion™, se consideró positiva la polisomía para los cálculos estadísticos para ambos conjuntos de sondas. Se consideraron pertinentes en la práctica clínica solamente los resultados de citología de rutina positivos. Por lo tanto, se consideraron negativos para la estadística los resultados de la citología atípicos y sospechosos. El conjunto de sondas pancreatobiliares fue significativamente más sensible que la citología de rutina (74 % frente a 28 %, P<0,0001) y UroVysion™ (74 % frente a 51 %, P=0,0003) con especificidad similar. Se detectaron cuarenta casos de cáncer adicionales con tres falsos positivos menos con el conjunto de sondas pancreatobiliares comparado con .UroVysion™.

25 Tabla 9: Cepillados de validación límite HFIS: Sensibilidad y especificidad de citología de rutina. Conjunto de sondas UroVysion™ y HFIS pancreatobiliares para la detección de malignidad pancreatobiliar en muestras de cepillado

	N	Citología de rutina**	UroVysion*	Conjunto de sondas pancreatobiliares*	Citología de rutina frente a conjunto de sondas pancreatobiliares (valor P)	UroVysion frente a conjunto de sondas pancreatobiliares (valor P)
Sensibilidad	65	18 (28 %)	33 (51 %)	48 (74 %)	<0,0001	0,0003
Especificidad	47	47 (100 %)	42 (89 %)	45 (96 %)	NS	NS
*polisómico considerado positivo						
** resultados atípicos y sospechosos considerados negativos						
NS = no significativo						

Los resultados de este estudio indican que los valores límite HFIS generados para el conjunto de sondas pancreatobiliares en muestras de cepillado CPRE son apropiados. La aplicación de estos valores límite a una cohorte de pacientes independiente tuvo como resultado una sensibilidad significativamente más alta que UroVysion™ o la citología de rutina con especificidad similar. Estos datos no solo validan los valores límite, sino que también demuestran la utilidad clínica del conjunto de sondas HFIS pancreatobiliares.

La invención, tal como se define en las reivindicaciones que se describen a modo ilustrativo en el presente documento pueden ponerse en práctica en ausencia de cualquiera de los (elemento(s) o limitación(es) que se divulga(n) específicamente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, cada vez que se utilizan las expresiones “que comprende”, “que consiste esencialmente en” o “que consiste en” pueden reemplazarse por cualquiera de las otras dos expresiones. Asimismo, las formas singulares “un/a” y “el/la” incluyen las referencias en plural a no ser que el contexto dicte lo contrario. Por tanto, por ejemplo, las referencias a “el método” incluyen uno o más métodos y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento y/o que podrán deducir las personas expertas en la material tras la lectura de la divulgación.

Los términos y expresiones que se han empleado se emplean como términos de la descripción y no como limitación. A este respecto, cuando se definen ciertos términos en el epígrafe "Definiciones" y se definen, describen o explican de otro modo a lo largo de la "Descripción detallada", se pretende que dichas definiciones, descripciones y explicaciones en su totalidad se atribuyan a dichos términos. Tampoco se pretende que el uso de dichos términos y expresiones excluya cualquier equivalencia de las características que se presentan y describen ni porciones de las mismas. Asimismo, aunque se utilizan epígrafes secundarios, como por ejemplo "Definiciones" a lo largo de la Descripción detallada" dicho uso sirve simplemente como referencia y no se pretende que limite la divulgación de esa sección a dicha sección solamente; sino que, cualquier divulgación que se haga en un epígrafe secundario tiene como objeto constituir una divulgación en todos y cada uno de los demás apartados.

5

10

15

Debe reconocerse que es posible introducir diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por tanto, debe entenderse que aunque se ha divulgado específicamente la presente divulgación en el contexto de las realizaciones preferentes y las características opcionales, las personas expertas en la materia podrán recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento. Dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar o un aumento de riesgo de los mismos en un paciente, método que comprende:

- 5 (i) contacto de una muestra de células pancreatobiliarias del paciente con un conjunto de sondas marcadas detectablemente que consiste en una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 en condiciones de hibridación, y
- 10 (ii) determinación de la presencia de anomalías cromosómicas en la muestra, donde

- (a) displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar es indicado por polisomía (es decir, más de dos copias de dos o más loci por célula) en más de 4 células, y
- 15 (b) un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar es indicado por (i) tetrasomía en más de 11 células, (ii) pérdida de P16 en al menos 5 % de células, (iii) ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16 en más de 8 células o (iv) ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente en más de 4 células,

20 tras lo cual, se detecta displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar o un aumento del riesgo de los mismos en el paciente.

2. El uso de un conjunto de sondas que consiste en una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16 para realizar el método de la reivindicación 1.

3. Un kit que comprende:

- 30 (i) un conjunto de sondas que permite la detección de cáncer pancreatobiliar en un paciente, que consiste en una sonda específica de locus para MCL1 (secuencia 1 de leucemia de células mieloides), una sonda específica de locus para RFCE (receptor de factor de crecimiento epidérmico), una sonda específica de locus para MYC y una sonda específica de locus para P16;
- (ii) uno o más agentes bloqueantes, un marcador, un agente de marcaje, un reactivo de hibridación, un tampón y/o un cobertor de metafase;
- 35 (iii) instrucciones para detectar cáncer pancreatobiliar en un paciente, que comprenden determinar la presencia de anomalías cromosómicas en una muestra de células pancreatobiliarias obtenidas del paciente; y donde

- (a) displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar es indicada por polisomía en más de 4 células, y
- 40 (b) un mayor riesgo de displasia de alto grado, cáncer pancreatobiliar o cáncer metastásico en el tracto pancreatobiliar es indicado por (i) tetrasomía en más de 11 células, (ii) pérdida de P16 en al menos 5 % de células, (iii) ganancia de un solo locus de MCL1, MYC o P16 en más de 8 células o (iv) ganancia de un solo locus de MCL1, RFCE o MYC con pérdida de P16 concurrente en más de 4 células.

