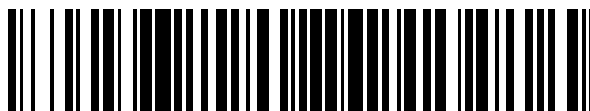


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 533**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/US2012/071380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12860530 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **23.11.2022 EP 2794907**

54 Título: **Métodos y materiales para evaluar la pérdida de heterocigosidad**

30 Prioridad:

**21.12.2011 US 201161578713 P**  
**01.06.2012 US 201261654402 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente modificada:  
**22.06.2023**

73 Titular/es:

**MYRIAD GENETICS, INC. (100.0%)**  
**320 Wakara Way**  
**Salt Lake City, UT 84108, US**

72 Inventor/es:

**ABKEVICH, VICTOR;**  
**GUTIN, ALEXANDER;**  
**TIMMS, KIRSTEN y**  
**LANCHBURY, JERRY**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

## DESCRIPCIÓN

Métodos y materiales para evaluar la pérdida de heterocigosidad

### 5 Antecedentes

#### 1. Campo técnico

Este documento se refiere a métodos y materiales implicados en la evaluación de muestras (por ejemplo, células de cáncer) para detectar la presencia de una pérdida de heterocigosidad (LOH) distintiva. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para determinar si una célula (por ejemplo, una célula de cáncer) contiene o no una LOH distintiva. Este documento también proporciona materiales y métodos para identificar células (por ejemplo, Células de cáncer) que tienen una deficiencia en la reparación dirigida por homología (HDR), así como materiales y métodos para identificar pacientes con cáncer que puedan responder a un régimen particular de tratamiento contra el cáncer. En todo este documento, a menos que se indique lo contrario, la deficiencia de HDR y la HRD (deficiencia de reparación homóloga) se utilizan como sinónimos.

#### 2. Información de antecedentes

El cáncer es un grave problema de salud pública, con 562.340 personas en los Estados Unidos de América muriendo de cáncer solo en 2009. American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 2009 (disponible en el sitio web de la American Cancer Society). Uno de los principales desafíos en el tratamiento del cáncer es descubrir características relevantes y clínicamente útiles del propio cáncer de un paciente y luego, basado en estas características, administrar un plan de tratamiento más adecuado para el cáncer del paciente. Si bien se han logrado avances en este campo de la medicina personalizada, todavía subsiste la necesidad significativa de mejores herramientas de diagnóstico molecular para caracterizar los cánceres de los pacientes. El documento WO2004075833 proporciona un método para predecir la respuesta a un régimen quimioterapéutico basado en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en tejidos cancerosos. Con más detalle, el método comprende predecir una respuesta a un régimen quimioterapéutico basado en la pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en tejido canceroso, dicho método comprende: (a) determinar el genotipo de tejido normal para la timidilato sintasa de un paciente; (b) determinar el genotipo de tejido tumoral para la timidilato sintasa de dicho paciente; (c) comparar el genotipo de tejido normal con el genotipo de tejido tumoral; (d) determinar si se ha producido una pérdida de heterocigosidad en el locus de timidilato sintasa en el tejido tumoral basándose en la comparación de la etapa (c); (e) predecir una respuesta al régimen quimioterapéutico basado en la pérdida de heterocigosidad en la muestra tumoral. Leunen et al., Human Mutation, 2009, vol. 30, páginas 1693 - 1702, enseña pérdidas y ganancias recurrentes en el cariotipo de pacientes con cáncer de mama hereditario, tales como, por ejemplo, alteraciones recurrentes del número de copias (RCNA). Los autores comparan dos grupos de pacientes, a saber, cánceres de mama mutados con BRCA1 frente a tumores de ovario esporádicos. El grupo de cáncer de mama hereditario mostró un mayor número de eventos para regiones largas de pérdida recurrente del número de copias. Las enseñanzas de Leunen et al. están limitados a alteraciones en el número de copias en al menos un cromosoma, lo que equivale a determinar los eventos de LOH, este último reflejando el estado de HRD de la célula.

#### Resumen

La invención se define a través de las reivindicaciones adjuntas.

En general, un aspecto de esta invención presenta un método para evaluar LOH en una célula de cáncer o ADN genómico de la misma. En algunas realizaciones, el método comprende, o consiste esencialmente en (a) detectar, en una célula de cáncer o ADN genómico derivado de ella, regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer (por ejemplo, cualquier par de cromosomas humanos que no sea un par de cromosomas sexuales X/Y humanos); y (b) determinar el número y el tamaño (por ejemplo, longitud) de dichas regiones de LOH. En algunas realizaciones, las regiones de LOH se analizan en varios pares de cromosomas que son representativos de todo el genoma (por ejemplo, se analizan suficientes cromosomas de modo que se espera que el número y el tamaño de las regiones de LOH sean representativos del número y tamaño de las regiones de LOH a través del genoma). En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente determinar el número total de regiones de LOH que son más largas que aproximadamente 1,5, 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más (preferiblemente 14, 15, 16 o más, más preferiblemente 15 o más) megabases, pero más cortas que la longitud del cromosoma completo respectivo dentro del cual se encuentra la región LOH (Regiones de LOH Indicadoras). Alternativa o adicionalmente, se determina la longitud total combinada de dichas Regiones de LOH Indicadoras. En algunas realizaciones específicas, si ese número total de Regiones de LOH Indicadoras o la longitud total combinada de las Regiones de LOH Indicadoras es igual o mayor que un número de referencia predeterminado, entonces dicha célula de cáncer o ADN genómico o un paciente que tiene dicha célula de cáncer o ADN genómico es identificado como que tiene una LOH distintiva con deficiencia de HDR.

También se proporciona un método alternativo para evaluar LOH en una célula de cáncer o ADN genómico de la misma que comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar, en una célula de cáncer o ADN genómico

derivada de la misma, regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos; y (b) determinar el número total y/o longitud combinada de regiones de LOH, en al menos un par de cromosomas humanos, que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10, 13, 14, 15, 16 o más, preferiblemente 15 o más) megabases. En algunas realizaciones específicas, si ese número total o longitud combinada es igual a o mayor que un número de referencia predeterminado, entonces dicha célula de cáncer o ADN genómico o un paciente que tiene dicha célula de cáncer o ADN genómico se identifica como que tienen una LOH distintiva con deficiencia de HDR.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir el estado de los genes BRCA1 y BRCA2 en una célula de cáncer. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar, en la célula de cáncer, el número total y/o longitud combinada de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases; y correlacionar el número total o longitud combinada que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de una deficiencia en el gen BRCA1 o BRCA2.

En otro aspecto, esta invención proporciona un método para predecir el estado de HDR en una célula de cáncer. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar, en la célula de cáncer, el número total y/o longitud combinada de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases; y correlacionar el número total o longitud combinada que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de una deficiencia en HDR.

En otro aspecto, esta invención proporciona un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, y/o un inhibidor PARP. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar, en una célula de cáncer del paciente con cáncer, el número y/o longitud combinada de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases; y correlacionar el número total o longitud combinada que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de que el paciente con cáncer responderá al régimen de tratamiento contra el cáncer. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento. El método comprende, o consiste esencialmente en, determinar, en una célula de cáncer del paciente con cáncer, el número total y/o longitud combinada de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases; y correlacionar el número total o longitud combinada que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de que el paciente con cáncer no responderá a un régimen de tratamiento que incluye paclitaxel o docetaxel.

En otro aspecto, esta invención se dirige a un método para tratar cáncer. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar, en una célula de cáncer de un paciente con cáncer o ADN genómico obtenido de la misma, el número total y/o longitud combinada de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases; y (b) administrar al paciente con cáncer un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP, si el número total o longitud combinada de regiones de LOH es mayor que un número de referencia. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En algunas realizaciones de uno cualquiera o más de los métodos descritos en los seis párrafos anteriores, se puede aplicar uno o más de los siguientes cuando sea apropiado. Las regiones de LOH se pueden determinar en al

menos dos, cinco, diez, o 21 pares de cromosomas humanos. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer de ovario, mama, o esófago. La primera longitud puede ser de aproximadamente 6, 12, o aproximadamente 15 o más megabases. El número de referencia puede ser 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 20 o mayor. El al menos un par de cromosomas humanos puede excluir el cromosoma humano 17. El agente que daña el ADN puede ser cisplatino, carboplatino, oxalapatino, o picoplatino, la antraciclina puede ser epirubicina o doxorubicina, el inhibidor de topoisomerasa I puede ser camptotecina, topotecan, o irinotecan, o el inhibidor PARP puede ser iniparib, olaparib o velapirib.

En otro aspecto, esta invención presenta el uso de uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP, en la fabricación de un medicamento útil para tratar un cáncer en un paciente identificado como que tiene una célula de cáncer determinada por tener un total de 5, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 o más Regiones de LOH Indicadoras. Las regiones de LOH Indicadoras se pueden determinar en al menos dos, cinco, diez, o 21 pares de cromosomas humanos. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer de ovario, mama, o esófago. Las regiones de LOH Indicadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 6, 12, o 15 o más megabases. Las regiones de LOH Indicadoras pueden estar presentes en un cromosoma diferente del cromosoma humano 17. El agente que daña el ADN puede ser un fármaco de quimioterapia a base de platino, la antraciclina puede ser epirubicina o doxorubicina, el inhibidor de topoisomerasa I puede ser camptotecina, topotecan, o irinotecan, o el inhibidor PARP puede ser iniparib, olaparib o velapirib. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En otro aspecto, esta invención presenta el uso de una pluralidad de oligonucleótidos capaces de hibridar a una pluralidad de regiones polimórficas de ADN genómico humano, en la fabricación de un kit de diagnóstico útil para determinar el número total o longitud combinada de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas de una célula de cáncer humana obtenida de un paciente con cáncer, y para detectar (a) una mayor probabilidad de una deficiencia en el gen BRCA1 o BRCA2 en la célula de cáncer, (b) una mayor probabilidad de una deficiencia en HDR en la célula de cáncer, o (c) una mayor probabilidad de que el paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, o un inhibidor PARP. Las regiones de LOH Indicadoras se pueden determinar en al menos dos, cinco, diez, o 21 pares de cromosomas humanos. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer de ovario, mama, o esófago. Las regiones de LOH Indicadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 6, 12, o 15 o más megabases. Las regiones de LOH Indicadoras pueden estar presentes en un cromosoma diferente de cromosoma humano 17.

En otro aspecto, esta invención presenta un sistema para determinar estado de LOH de una célula de cáncer de un paciente con cáncer. El sistema comprende, (a) un analizador de muestras configurado para producir una pluralidad de señales sobre el ADN genómico de al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer, y (b) un subsistema de ordenador programado para calcular, con base en la pluralidad de señales, el número o longitud combinada de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas humanos. El subsistema de ordenador se puede programar para comparar el número o longitud combinada de Regiones de LOH Indicadoras a un número de referencia para determinar (a) una probabilidad de una deficiencia en genes BRCA1 y/o BRCA2 en la célula de cáncer, (b) una probabilidad de una deficiencia en HDR en la célula de cáncer, o (c) una probabilidad de que el paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, o un inhibidor PARP. El sistema puede comprender un módulo de salida configurado para mostrar la probabilidad de (a), (b), o (c). El sistema puede comprender un módulo de salida configurado para mostrar una recomendación para el uso del régimen de tratamiento contra el cáncer. Las regiones de LOH Indicadoras se pueden determinar en al menos dos, cinco, diez, o 21 pares de cromosomas humanos. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer de ovario, mama, o esófago. Las regiones de LOH Indicadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 6, 12, o 15 o más megabases. Las regiones de LOH Indicadoras pueden estar presentes en cromosomas diferentes de un cromosoma humano 17. El agente que daña el ADN puede ser un fármaco de quimioterapia a base de platino, la antraciclina puede ser epirubicina o doxorubicina, el inhibidor de topoisomerasa I puede ser camptotecina, topotecan, o irinotecan, o el inhibidor PARP puede ser iniparib, olaparib o velapirib.

En otro aspecto, la invención proporciona un producto de programa de ordenador incorporado en un medio legible por ordenador que, cuando se ejecuta en un ordenador, proporciona instrucciones para detectar la presencia o ausencia de cualquier región de LOH a lo largo de uno o más de los cromosomas humanos diferentes de los cromosomas sexuales X e Y humanos, y la región de LOH que tiene una longitud de aproximadamente 1.5 o más (o 5, 10 o más, preferiblemente 15 o más) megabases pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH; y determinar el número total o longitud combinada de las regiones de LOH en el uno o más pares de cromosomas. El producto de programa de ordenador puede incluir otras instrucciones. Las regiones de LOH Indicadoras se pueden determinar en al menos dos, cinco, diez o 21 pares de cromosomas humanos. La célula de cáncer puede ser una célula de cáncer de ovario, mama, o esófago. Las regiones de LOH Indicadoras pueden tener una longitud de aproximadamente 6, 12, o 15 o más megabases. Las regiones de LOH Indicadoras pueden estar presentes en cromosomas diferentes de un cromosoma humano 17. El agente que daña el ADN puede ser un fármaco de quimioterapia a base de platino, la antraciclina puede ser epirubicina o doxorubicina, el inhibidor de topoisomerasa I puede ser camptotecina, topotecan, o irinotecan, o el inhibidor PARP puede ser iniparib, olaparib

o velapirib.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico. El kit comprende, o consiste esencialmente en, al menos 500 oligonucleótidos capaces de hibridar a una pluralidad de regiones polimórficas de ADN genómico humano; y un producto de programa de ordenador proporcionado en este documento. El producto de programa de ordenador se puede incorporar en un medio legible por ordenador que, cuando se ejecuta en un ordenador, proporciona instrucciones para detectar la presencia o ausencia de cualquier región de LOH a lo largo de uno o más de los cromosomas humanos diferentes de los cromosomas sexuales X e Y humanos, y la región de LOH que tiene una longitud de aproximadamente 1.5 o más (o 5 o 10 o más, preferiblemente aproximadamente 15 o más) megabases pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH; y determinar el número total y/o longitud combinada de la región de LOH en el uno o más pares de cromosomas.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar células de cáncer de un paciente para la presencia de una LOH distintiva. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con la LOH distintiva.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar células de cáncer de un paciente para la presencia de un estado deficiente de HDR. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con el estado deficiente de HDR.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar células de cáncer de un paciente para la presencia de una mutación genética dentro de un gen de una ruta de HDR. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con la mutación genética.

En otro aspecto, este documento presenta un método para determinar si un es probable que un paciente responda a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende administrar radiación o un fármaco seleccionado del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como susceptible de responder al régimen de tratamiento contra el cáncer.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen una LOH distintiva, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con la LOH distintiva.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen un estado de deficiencia de HDR, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen el estado de deficiencia de HDR, en las que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en las que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con el estado deficiente de HDR.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen una mutación genética dentro de un gen de una ruta de HDR, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la mutación genética, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con la mutación genética.

En otro aspecto, este documento presenta un método para evaluar un paciente para una probabilidad de responder a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende administrar radiación o un fármaco seleccionado del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen una LOH distintiva, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar, con base al menos en parte en la presencia de la LOH distintiva, al paciente como susceptible de responder al régimen de tratamiento contra el cáncer.

En otro aspecto, este documento presenta un método para realizar un análisis de diagnóstico de una célula de cáncer de un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con una LOH distintiva.

En otro aspecto, este documento presenta un método para realizar un análisis de diagnóstico de una célula de cáncer de un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con un estado deficiente de HDR.

En otro aspecto, este documento presenta un método para realizar un análisis de diagnóstico de una célula de cáncer de un paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como que tiene células de cáncer con una mutación genética dentro de un gen de una ruta de HDR.

En otro aspecto, este documento presenta un método para realizar un análisis de diagnóstico de una célula de cáncer de un paciente para determinar si es probable que el paciente con cáncer responda a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende administrar radiación o un fármaco seleccionado del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) detectar la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de la célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) identificar al paciente como susceptible de responder al régimen de tratamiento contra el cáncer.

En otro aspecto, este documento presenta un método para diagnosticar un paciente como que tiene células de cáncer que tienen una LOH distintiva. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen la LOH distintiva, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con la LOH distintiva.

En otro aspecto, este documento presenta un método para diagnosticar un paciente como que tiene células de cáncer con un estado deficiente de HDR. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen el estado de deficiencia de HDR, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen el estado de deficiencia de HDR, en las que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en las que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con el estado deficiente de HDR.

En otro aspecto, este documento presenta un método para diagnosticar un paciente como que tiene células de cáncer con una mutación genética dentro de un gen de una ruta de HDR. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen la mutación genética, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la mutación genética, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar el paciente como que tiene células de cáncer con la mutación genética.

En otro aspecto, este documento presenta un método para diagnosticar un paciente como que es un candidato para un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende administrar radiación o un fármaco seleccionado del grupo que consiste de agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I, e inhibidores PARP. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar que el paciente comprende células de cáncer que tienen una LOH distintiva, en las que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases, y (b) diagnosticar, con base al menos en parte en la presencia de la LOH distintiva, al paciente como susceptible de responder al régimen de tratamiento contra el cáncer.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se establecen en la descripción y los dibujos acompañantes a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

### Descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico que traza dosificaciones de alelo de células de cáncer de mama de un paciente con cáncer de mama a lo largo del cromosoma 1 según se determina utilizando una matriz de SNP. La flecha indica una transición entre una región de heterocigosidad y una región de LOH.

La **Figura 2** es un gráfico que traza dosificaciones de alelo de células de cáncer de mama para el mismo paciente con cáncer de mama como en la Figura 1 a lo largo del cromosoma 1 según se determina utilizando secuenciación de alto rendimiento. La flecha indica una transición entre una región de heterocigosidad y una región de LOH.

La **Figura 3** es un diagrama de flujo de un proceso de ejemplo para evaluar el genoma de una célula (por ejemplo, una célula de cáncer) para una LOH distintiva.

La **Figura 4** es un diagrama de un ejemplo de un dispositivo de ordenador y un dispositivo de ordenador móvil que se puede utilizar para implementar las técnicas descritas en este documento.

La **Figura 5** es un gráfico que traza la distribución de longitud de regiones de LOH detectadas en células de cáncer de ovario de 62 pacientes humanos. La longitud ajustada se refiere a la fracción de brazos de cromosomas cubiertos por regiones de LOH.

La **Figura 6** es un gráfico que traza el número de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo para un conjunto de entrenamiento de muestras de células de cáncer de ovario con genes BRCA1 y BRCA2 intactos o deficientes. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras con dicho número de regiones de LOH.

La **Figura 7** es un gráfico que traza el número de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo para un conjunto de entrenamiento y validación de muestras de células de cáncer de ovario con genes BRCA1 y BRCA2 intactos o deficientes. El tamaño de los círculos es proporcional al número de

muestras con dicho número de regiones de LOH.

La **Figura 8** es un gráfico que traza el número de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo para muestras de células de cáncer de ovario con mutaciones BRCA somáticas, con mutaciones BRCA de línea germinal, con baja expresión de BRCA1 o con BRCA intacto (BRCA normal). El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras con dicho número de regiones de LOH.

La **Figura 9** es una tabla que muestra el porcentaje de muestras de cáncer de ovario que son deficientes en BRCA, deficientes en HDR/BRCA intactas y HDR intacta.

La **Figura 10** es un gráfico que traza el número de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo para las estirpes celulares de cáncer para los cánceres indicados. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras con dicho número de regiones de LOH.

La **Figura 11** es un gráfico que traza el número de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo para muestras de cáncer de pulmón.

La **Figura 12** es un gráfico que traza el porcentaje de los cánceres o estirpes celulares de cáncer indicadas que tienen una deficiencia de HDR.

La **Figura 13** contiene gráficos que trazan los valores de  $IC_{50}$  ( $\log_{10}(IC_{50})$ ) de camptotecina, así como los valores promedio de  $\log_{10}(IC_{50})$  para compuestos de platino (oxaliplatino, cisplatino y carboplatino), o antraciclinas (doxorubicina y epirubicina) cuando se exponen a 29 estirpes celulares de cáncer de mama que tienen el número indicado de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo o los valores  $IC_{50}$  ( $\log_{10}(IC_{50})$ ) de paclitaxel cuando se exponen a 27 estirpes celulares de cáncer de ovario que tienen el número indicado de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más corto que el cromosoma completo. Las líneas discontinuas colocan un número umbral a las nueve.

La **Figura 14** es una versión etiquetada de un gráfico de la Figura 13 que traza los valores promediados  $\log_{10}(IC_{50})$  de los compuestos de platino (oxaliplatino, cisplatino y carboplatino) cuando se exponen a 29 estirpes celulares de cáncer de mama que tienen el número indicado de regiones de LOH más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo.

La **Figura 15** es un diagrama de flujo de un proceso computacional de ejemplo para identificar loci y regiones de LOH.

La **Figura 16** muestra la fracción de longitudes de regiones de LOH frente a la longitud de estas regiones ajustadas sobre la longitud del brazo cromosómico. El valor ajustado más grande en esta figura es igual a dos correspondientes a LOH en el cromosoma completo.

La **Figura 17** muestra la puntuación de HRD en muestras tumorales. Círculos azules: muestras de BRCA1 deficientes o BRCA2. Círculos rojos: muestras intactas BRCA1 y BRCA2. El área combinada bajo círculos azules y rojos es la misma. El área de cada círculo individual es proporcional al número de muestras con el número correspondiente de regiones de LOH.

**Figura 17a.** Puntuación de HRD para la primera cohorte (46 de 152 muestras eran deficientes en BRCA1 o BRCA2).

**Figura 17b.** Puntuación de HRD para la segunda cohorte (19 de 53 muestras eran deficientes en BRCA1 o BRCA2).

**Figura 17c.** Puntuación de HRD para la tercera cohorte (146 de 435 muestras eran deficientes en BRCA1 o BRCA2).

**Figura 17d.** Puntuación de HRD para los datos combinados de las tres cohortes. Fila A: 224 muestras con genes deficientes en BRCA1 o BRCA2 o RAD51C; B: 84 mutantes BRCA1; C: 43 mutantes BRCA2; D: 82 muestras con baja expresión o metilación de BRCA1; E: 13 muestras con metilación de RAD51C. Círculos rojos: 416 muestras con genes intactos BRCA1, BRCA2 y RAD51C.

**Figura 18a.** Comparación de las puntuaciones de HRD en estirpes celulares de cáncer. Círculos rojos: estirpes celulares con BRCA1 o BRCA2 intactos. A: 30 estirpes celulares intactas no ováricas; B: 22 estirpes celulares de ovario intactas. Círculos verdes: 6 portadores de mutaciones heterocigotas en BRCA1 o BRCA2. Círculos violetas: 2 portadores de mutaciones homocigóticas con reversión en BRCA1 o BRCA2. Círculos azules: 7 portadores de mutaciones homocigóticas en BRCA1 o BRCA2 o con BRCA1 metilado. El área combinada debajo de los círculos verde, rojo, azul y violeta es la misma. El área debajo de cada círculo individual es proporcional al número de muestras con el número correspondiente de regiones de LOH.



**Figura 18b.** La gráfica de Kaplan-Meier de OS posterior a cirugía para la puntuación de HRD se dividió en su mediana. Estos datos se generaron utilizando 507 muestras del conjunto de datos TCGA para las cuales estaban disponibles los datos de número de copias e información de supervivencia. La mediana de SG para las muestras con puntuación HRD alta y baja fue 1499 (CI 95% = (1355-1769)) y 1163 (CI 95% = (1081-1354)) días, respectivamente.

La **Figura 19** muestra la correlación entre las puntuaciones de LOH y la deficiencia de HR calculada para diferentes cortes de longitud de la región de LOH para la primera cohorte. El log10 correspondiente (valor p) está en el eje y. Se investigó la relación entre el límite del tamaño de las regiones de LOH y la importancia de la correlación de la puntuación LOH con la deficiencia de HR. Esta figura muestra que los límites de longitud de LOH pueden variar fácilmente de 11 a 21 Mb. El límite de 15 Mb, aproximadamente en la mitad del intervalo, puede utilizarse en algunas realizaciones preferidas ya que se descubrió que era más sensible al ruido estadístico presente en los datos.

La **Figura 20** muestra la comparación de las puntuaciones de LOH en tres grupos de muestras de BRCA1 deficientes y BRCA2 para los datos combinados de las tres cohortes. Fila A: 49 portadores de mutaciones de línea germinal en BRCA1; B: 25 portadores de mutaciones somáticas en BRCA1; C: 82 muestras con metilación o baja expresión de BRCA1; D: 27 portadores de mutaciones de línea germinal en BRCA2; E: 9 portadores de mutaciones somáticas en BRCA2.

La **Figura 21** muestra una comparación de las puntuaciones LOH de las muestras de BRCA1 deficientes, BRCA2 y RAD51C. Los círculos azules corresponden a muestras de BRCA1 deficientes, los círculos rojos corresponden a muestras de BRCA2 deficientes y los círculos verdes corresponden a muestras de RAD51C deficientes. El área combinada debajo de los círculos rojo, azul y verde es la misma. El área debajo de cada círculo individual es proporcional al número de muestras con el número correspondiente de regiones de LOH.

La **Figura 22** muestra una comparación de las puntuaciones de LOH ("HRD") en pacientes que respondieron versus pacientes que no respondieron al tratamiento que comprende terapia de platino. El área debajo de cada círculo individual es proporcional al número de muestras con el número correspondiente de regiones de LOH.

La **Figura 23** muestra una comparación de las puntuaciones de LOH ("HRD") en muestras de BRCA1 deficientes o BRCA2. El área debajo de cada círculo individual es proporcional al número de muestras con el número correspondiente de regiones de LOH. Se destaca una muestra atípica con contaminación significativa.

La **Figura 24** muestra la fracción de no respondedores en cada grupo de pacientes con una puntuación de LOH ("HRD") dada.

### Descripción detallada

Este documento proporciona métodos y materiales involucrados en la evaluación de muestras (por ejemplo, células de cáncer) para la presencia de una LOH distintiva. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para determinar si una célula (por ejemplo, una célula de cáncer humana) contiene una LOH distintiva (por ejemplo, una LOH distintiva con deficiencia de HDR).

En general, una comparación de secuencias presentes en el mismo locus en cada cromosoma (cada cromosoma autosómico para los hombres) puede revelar si ese locus particular es homocigoto o heterocigoto dentro del genoma de una célula. Los loci polimórficos dentro del genoma humano son generalmente heterocigotos dentro de un individuo ya que ese individuo generalmente recibe una copia del padre biológico y una copia de la madre biológica. En algunos casos, un locus polimórfico o una cadena de loci polimórficos dentro de un individuo son homocigotos como resultado de heredar copias idénticas de ambos padres biológicos.

La pérdida de heterocigosidad (LOH) puede resultar de varios mecanismos. Por ejemplo, en algunos casos, una región de un cromosoma se puede eliminar en una célula somática. La región que permanece presente en el otro cromosoma (el otro cromosoma no sexual para hombres) es una región de LOH ya que solo hay una copia (en lugar de dos copias) de esa región presente dentro del genoma de las células afectadas. Esta región de LOH puede tener cualquier longitud (por ejemplo, Desde una longitud inferior a aproximadamente 1.5 Mb hasta una longitud igual a la longitud del cromosoma completo). Este tipo de evento de LOH da como resultado una reducción del número de copias. En otros casos, una región de un cromosoma (un cromosoma no sexual para hombres) en una célula somática se puede reemplazar con una copia de esa región del otro cromosoma, eliminando de esta manera cualquier heterocigosidad que pueda haber estado presente dentro de la región reemplazada. En dichos casos, la región que permanece presente en cada cromosoma es una región de LOH y se puede denominar como región de LOH neutra en la copia. Las regiones de LOH neutras de copia pueden tener cualquier longitud (por ejemplo, desde una longitud inferior a aproximadamente 1.5 Mb hasta una longitud igual a la longitud del cromosoma completo).

Como se describe en el presente documento, una muestra celular (por ejemplo, muestra de células de cáncer) se puede identificar con un "estado de LOH distintiva positiva" (o alternativamente denominado "LOH distintiva con

deficiencia de HDR”) si el genoma de las células que se evalúan contiene cinco o más (por ejemplo, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, una vez o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, 15 o más, 16 o más, 17 o más, 18 o más, 19 o más, o 20 o más) regiones de LOH que son (a) más largas que aproximadamente 1.5 megabases (por ejemplo, más largas que aproximadamente 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 megabases (Mb), preferiblemente más de aproximadamente 14 o 15 o 16, más preferiblemente más de aproximadamente 15 megabases) y (b) menos de la longitud del cromosoma completo que contiene esa región de LOH. En algunos casos, se puede identificar una muestra de células de cáncer con un estado de LOH distintiva positiva si el genoma de las células evaluadas contiene nueve o más regiones de LOH que son (a) más largas que aproximadamente 15 Mb y (b) menos que la longitud del cromosoma completo que contiene esa región de LOH. A menos que se defina lo contrario, el término “Región de LOH Indicadora” se refiere a una región de LOH que está en un par de cromosomas humanos distintos del par de cromosomas sexuales X/Y humanos, y que se caracteriza por la pérdida de heterocigosidad con una longitud de aproximadamente 1.5 o más megabases, pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH. La longitud del cromosoma completo que contiene una región de LOH puede determinarse examinando la longitud del cromosoma más corto del par de cromosomas correspondiente en una célula de línea germinal o una célula somática no tumoral. En algunas realizaciones, una Región de LOH Indicadora es cualquier región de LOH de aproximadamente 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 megabases (Mb) o más (preferiblemente más de aproximadamente 14 o 15 megabases) y menos de la longitud del cromosoma completo que contiene esa región de LOH.

Las células (por ejemplo, células de cáncer) identificadas con una LOH distintiva positiva (también denominada en el presente documento “LOH distintiva con deficiencia de HDR”) se pueden clasificar como que tienen una mayor probabilidad de tener una deficiencia de HDR y/o una mayor probabilidad de tener un estado deficiente en uno o más genes en la ruta de HDR. Por ejemplo, las células de cáncer identificadas como que tienen un estado de LOH distintiva positiva se pueden clasificar como que tienen una mayor probabilidad de tener un estado deficiente de HDR. En algunos casos, las células de cáncer identificadas como que tienen un estado de LOH distintiva positiva se pueden clasificar como que tienen una mayor probabilidad de tener un estado deficiente para uno o más genes en la ruta de HDR. Como se utiliza en este documento, el estado deficiente para un gen significa que la secuencia, estructura, expresión y/o actividad del gen o su producto es/son deficientes en comparación con lo normal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, baja o nula expresión de ARNm o proteína, mutaciones perjudiciales, hipermetilación, actividad atenuada (por ejemplo, Actividad enzimática, capacidad para unirse a otra biomolécula), etc. Como se utiliza en este documento, estado deficiente para una ruta (por ejemplo, ruta de HDR) significa que al menos un gen en esa ruta (por ejemplo, BRCA1) es deficiente. Los ejemplos de mutaciones altamente nocivas incluyen mutaciones de cambio de marco, mutaciones de codón de detención y mutaciones que conducen a un empalme de ARN alterado. El estado deficiente en un gen en la ruta de HDR puede resultar en deficiencia o actividad reducida en la reparación dirigida por homología en las células de cáncer. Ejemplos de genes en la ruta de HDR incluyen, entre otros, los genes enumerados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Genes de la ruta de HDR seleccionados**

Nombre del gen	Símbolo del gen Entrez (si está asignado)	Identificación del gen Entrez	Nombre del gen	Símbolo del gen Entrez (si está asignado)	Identificación del gen Entrez
BLM	BLM	641	RAD50	RAD50	10111
BRCA1	BRCA1	672	RAD51	RAD51	5888
BRCA2	BRCA2	675	RAD51AP1	RAD51AP1	10635
CtIP	RBBP8	5932	RAD51B	RAD51L1	5890
Polimerasa de ADN delta	POLD1	5424	RAD51C	RAD51C	5889
	POLD2	5424	RAD51D	RAD51L3	5892
	POLD3	10714	RAD54	ATRX	546
	POLD4	57804	RAD54B	RAD54B	25788
Polimerasa de ADN eta	POLH	5429	RMI1	RMI1	80010
DNA2	DNA2	1763	RMI2	C16orf75	116028
EME1	EME1	146956	RPA	RPA1	6117
ERCC1	ERCC1	2067	RTEL1	RTEL1	51750
EXO1	EXO1	9156	SLX1		
FANCM	FANCM	57697	SLX2		
GEN1	GEN1	348654	SLX4	SLX4	84464
MRE11	MRE11A	4361	TOP2A	TOP2A	7153
MUS81	MUS81	80198	XPF	ERCC4	2072
NBS1	NBN	4683	XRCC2	XRCC2	7516
PALB2	PALB2	79728	XRCC3	XRCC3	7517
PCNA	PCNA	5111			

Ejemplos de mutaciones genéticas que pueden estar presentes dentro de un gen de la ruta de HDR incluyen, sin

limitación, los enumerados en la Tabla 2.

**Tabla 2. Posibles mutaciones genéticas dentro de genes seleccionados de la ruta de HDR.**

Gen	Mutación	Identificación del gen Entrez
BRCA1	C24F	672
BRCA1	E29X	672
BRCA2	R3052W	675
BRCA2	2881delG	675
RAD51C	G125V	5889
RAD51C	L138F	5889
RAD51C	Y75XfsX0	5889

En algunos casos, una muestra celular (por ejemplo, muestra de células de cáncer) se puede identificar con un mayor número de regiones de LOH (por ejemplo, al menos 7, 8, 9, 10 o más regiones de LOH) que cubren el cromosoma completo. Las células (por ejemplo, células de cáncer) identificadas como que tienen un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo se pueden clasificar como que tienen una mayor probabilidad de tener dominio de HDR, es decir, ruta de HDR intacta. Por ejemplo, las células de cáncer identificadas con un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo se pueden clasificar como más propensas a tener genes BRCA1 y BRCA2 intactos.

Como se describe en este documento, la identificación de loci de LOH (así como el tamaño y el número de regiones de LOH) puede incluir, primero, determinar el genotipo de una muestra en varios loci genómicos (por ejemplo, loci SNP, bases individuales en secuenciación grande) y segundo, determinar si los loci homocigotos se deben a eventos de LOH. Se puede utilizar cualquier técnica apropiada para determinar los genotipos en los loci de interés dentro del genoma de una célula. Por ejemplo, polimorfismos de matrices de un solo nucleótido (SNP) (por ejemplo, matrices SNP de todo el genoma humano), secuenciación dirigida de loci de interés (por ejemplo, SN y sus secuencias circundantes), e incluso la secuenciación no dirigida (por ejemplo, secuenciación del exoma completo, transcriptoma o genoma) se puede utilizar para identificar loci como homocigotos o heterocigotos. En algunos casos, se puede realizar un análisis de la naturaleza homocigótica o heterocigótica de los loci en una longitud de un cromosoma para determinar la longitud de las regiones de homocigosidad o heterocigosidad. Por ejemplo, un tramo de ubicaciones SNP que están separadas (por ejemplo, separadas entre 25 kb y aproximadamente 100 kb) a lo largo de un cromosoma se puede evaluar utilizando los resultados de la matriz de SNP para determinar no solo la presencia de una región de homocigosidad a lo largo de un cromosoma sino también la longitud de esa región. Los resultados de una matriz de SNP se pueden utilizar para generar un gráfico que traza las dosis de alelos a lo largo de un cromosoma. La dosificación de alelo  $d_i$  para SNP  $i$  se puede calcular a partir de intensidades de señal ajustadas de dos alelos ( $A_1$  y  $B_1$ ):  $d_i = A_1 / (A_1 + B_1)$ . En la Figura 1 se presenta un ejemplo de dicho gráfico. Numerosas variaciones en las matrices de ácido nucleico útiles en la invención se conocen en la técnica. Estos incluyen las matrices utilizadas en los diversos ejemplos a continuación (por ejemplo, la matriz Affymetrix 500K GeneChip en el Ejemplo 3; los Servicios Affymetrix OncoScan™ FFPE Express 2.0 (Anteriormente Servicios MIP CN) en el Ejemplo 4).

Una vez que se ha determinado el genotipo de una muestra para una pluralidad de loci (por ejemplo, SNP), se pueden utilizar técnicas comunes para identificar loci y regiones de LOH. Una forma de determinar si la homocigosidad se debe a LOH es comparar el genotipo somático con la línea germinal. Por ejemplo, el genotipo para una pluralidad de loci (por ejemplo, SNP) se puede determinar tanto en una muestra de línea germinal (por ejemplo, sangre) como en una muestra somática (por ejemplo, tumor). Los genotipos para cada muestra se pueden comparar (normalmente computacionalmente) para determinar cuando el genoma de la célula de la línea germinal era heterocigoto y el genoma de la célula somática es homocigoto. Dichos loci son loci de LOH y las regiones de dichos loci son regiones de LOH.

Las técnicas computacionales también se pueden utilizar para determinar si la homocigosidad se debe a LOH. Dichas técnicas son particularmente útiles cuando una muestra de línea germinal no está disponible para análisis y comparación. Por ejemplo, algoritmos tales como aquellos descritos en otra parte se pueden utilizar para detectar regiones de LOH utilizando información de matrices de SNP (Nannya et al., Cancer Res. (2005) 65: 6071-6079 (2005)). Normalmente, estos algoritmos no tienen en cuenta explícitamente la contaminación de muestras tumorales con tejido benigno. Cf. Solicitud Internacional No. PCT/US2011/026098 otorgada a Abkevich et al.; Goransson et al., PLoS One (2009) 4(6): e6057. Esta contaminación a menudo es lo suficientemente alta como para dificultar la detección de regiones de LOH. Los métodos analíticos mejorados de acuerdo con la presente invención para identificar LOH, incluso a pesar de la contaminación, incluyen aquellos incorporados en productos de software de ordenador como se describe a continuación.

El siguiente es un ejemplo. Si la relación observada de las señales de dos alelos, A y B, es de dos a uno, hay dos posibilidades. La primera posibilidad es que las células de cáncer tengan LOH con la eliminación del alelo B en una muestra con un 50% de contaminación con células normales. La segunda posibilidad es que no hay LOH pero el alelo A está duplicado en una muestra sin contaminación con células normales. Se puede implementar un algoritmo

como un programa de ordenador como se describe en este documento para reconstruir regiones de LOH basadas en datos de genotipo (por ejemplo, genotipo SNP). Un punto del algoritmo es reconstruir primero los números de copia específicos de alelo (ASCN) en cada locus (por ejemplo, SNP). Los ASCN son el número de copias de alelos maternos y paternos. Una región de LOH se determina entonces como un tramo de SNP con uno de los ASCN (paterno o materno) siendo cero. El algoritmo puede basarse en maximizar una función de probabilidad y puede ser conceptualmente similar a un algoritmo descrito previamente diseñado para reconstruir el número total de copias (en lugar de ASCN) en cada locus (por ejemplo, SNP). Véase la Solicitud Internacional No. PCT/US2011/026098 otorgada a Abkevich et al. La función de probabilidad se puede maximizar sobre el ASCN de todos los loci, el nivel de contaminación con tejido benigno, el número total de copias promediado en todo el genoma y el nivel de ruido específico de la muestra. Los datos de entrada para el algoritmo pueden incluir o consistir en (1) intensidades de señal normalizadas específicas de muestra para ambos alelos de cada locus y (2) conjuntos específicos a ensayo (específicos para diferentes matrices de SNP y para un enfoque basado en secuencias) de parámetros definidos basados en el análisis de gran número de muestras con perfiles ASCN conocidos.

En algunos casos, se pueden utilizar técnicas de secuenciación de ácido nucleico para identificar loci como homocigotos o heterocigotos. Por ejemplo, el ADN genómico de una muestra de células (por ejemplo, una muestra de células de cáncer) se puede extraer y fragmentar. Se puede utilizar cualquier método apropiado para extraer y fragmentar el ácido nucleico genómico, que incluyen, sin limitación, kits comerciales tales como QIAamp™ DNA Mini Kit (Qiagen™), MagNA™ Pure DNA Isolation Kit (Roche Applied Science™) y GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit Miniprep (Sigma-Aldrich™). Una vez extraído y fragmentado, se puede realizar una secuenciación dirigida o no dirigida para determinar los genotipos de la muestra en los loci. Por ejemplo, la secuenciación del genoma completo, el transcriptoma completo o el exoma completo se puede realizar para determinar genotipos en millones o incluso miles de millones de pares de bases (es decir, los pares de bases pueden ser "loci" que se van a evaluar).

En algunos casos, la secuenciación dirigida de loci polimórficos conocidos (por ejemplo, SNP y secuencias circundantes) se puede realizar como una alternativa al análisis de micromatrices. Por ejemplo, el ADN genómico se puede enriquecer para aquellos fragmentos que contienen un locus (por ejemplo, ubicación de SNP) para ser analizados utilizando kits diseñados para este propósito (por ejemplo, Agilent SureSelect™, Illumina TruSeq Capture™ y Nimblegen SeqCap EZ Choice™). Por ejemplo, el ADN genómico que contiene los loci que se van a analizar se puede hibridar con fragmentos de ARN de captura biotinilados para formar complejos de ARN biotinilado/ADN genómico. Alternativamente, se pueden utilizar sondas de captura de ADN que dan como resultado la formación de híbridos de ADN biotinilado/ADN genómico. Se pueden utilizar perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina y una fuerza magnética para separar los complejos de ARN biotinilado/ADN genómico de aquellos fragmentos de ADN genómico que no están presentes dentro de un complejo de ARN biotinilado/ADN genómico. Los complejos de ARN/ADN genómico biotinilados obtenidos se pueden tratar para eliminar el ARN capturado de las perlas magnéticas, dejando de esta manera fragmentos de ADN genómico intactos que contienen un locus que se va a analizar. Estos fragmentos de ADN genómico intactos que contienen los loci que se van a analizar se pueden amplificar utilizando, por ejemplo, técnicas de PCR. Los fragmentos de ADN genómico amplificado se pueden secuenciar utilizando una tecnología de secuenciación de alto rendimiento o una tecnología de secuenciación de próxima generación como Illumina HiSeq™, Illumina MiSeq™, Life Technologies SOLiD™ o Ion Torrent™, o Roche 454™.

Los resultados de secuenciación de los fragmentos de ADN genómico se pueden utilizar para identificar loci como homocigotos o heterocigotos, análogos al análisis de micromatrices descrito en este documento. En algunos casos, se puede realizar un análisis de la naturaleza homocigótica o heterocigótica de los loci sobre una longitud de un cromosoma para determinar la longitud de las regiones de homocigosidad o heterocigosidad. Por ejemplo, un tramo de ubicaciones de SNP que están separadas (por ejemplo, separadas entre 25 kb y aproximadamente 100 kb) a lo largo de un cromosoma se puede evaluar mediante secuenciación, y los resultados de secuenciación se pueden utilizar para determinar no solo la presencia de una región de homocigosidad a lo largo de un cromosoma sino también la longitud de esa región de LOH. Los resultados de secuenciación obtenidos se pueden utilizar para generar un gráfico que traza las dosis de alelos a lo largo de un cromosoma. La dosificación de alelo  $d_1$  para SNP  $i$  se puede calcular a partir del número ajustado de sondas capturadas para dos alelos ( $A_1$  y  $B_1$ ):  $d_1 = A_1 / (A_1 + B_1)$ . Un ejemplo de dicho gráfico se presenta en la Figura 2. La determinación de si la homocigosidad se debe a LOH (en oposición a la homocigosidad en la línea germinal) se puede realizar como se describe en este documento.

En algunos casos, se puede utilizar un proceso de selección para seleccionar loci (por ejemplo, Loci SNP) para evaluar utilizando un ensayo configurado para identificar los loci como homocigotos o heterocigotos (por ejemplo, Ensayos basados en matriz de SNP y ensayos basados en secuenciación). Por ejemplo, cualquier ubicación SNP humana se puede seleccionar para su inclusión en un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación configurado para identificar loci como homocigotos o heterocigotos dentro del genoma de las células. En algunos casos, se pueden evaluar 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 millones o más de ubicaciones de SNP presentes dentro del genoma humano para identificar aquellos SNP que (a) no están presentes en el cromosoma Y, (b) no son SNP mitocondriales, (c) tienen una frecuencia de alelo menor de al menos aproximadamente el cinco por ciento en caucásicos, (d) tienen una frecuencia de alelo menor de al menos aproximadamente el uno por ciento en tres razas distintas de los caucásicos (por ejemplo, china, japonés y yoruba), y/o (e) no tienen una desviación significativa del equilibrio de Hardy Weinberg en ninguna de las cuatro razas. En algunos casos, se pueden seleccionar más de

100.000, 150.000 o 200.000 SNP humanos que cumplen con los criterios (a) a (e). De los SNP humanos que cumplen los criterios (a) a (e), se puede seleccionar un grupo de SNP (por ejemplo, los mejores 110.000 SNP) de tal manera que los SNP tengan un alto grado de frecuencia de alelos en caucásicos, cubriendo el genoma humano de una manera algo uniforme de manera separada (por ejemplo, al menos un SNP cada aproximadamente 25 kb a aproximadamente 500 kb), y no están en desequilibrio de enlace con otro SNP seleccionado para ninguna de las cuatro razas. En algunos casos, se pueden seleccionar aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 mil o más SNP para cumplir con cada uno de estos criterios e incluirlos en un ensayo configurado para identificar regiones de LOH en un ser humano genoma. Por ejemplo, se pueden seleccionar entre aproximadamente 70.000 y aproximadamente 90.000 (por ejemplo, aproximadamente 80.000) SNP para el análisis con un ensayo basado en una matriz de SNP, y entre aproximadamente 45.000 y aproximadamente 55.000 (por ejemplo, aproximadamente 54.000) SNP se pueden seleccionar para el análisis con un ensayo basado en secuenciación.

Como se describe en el presente documento, se puede evaluar una muestra celular para determinar si el genoma de las células de la muestra contiene una LOH distintiva, carece de una LOH distintiva, tiene un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo o carece de un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo. Cualquier tipo apropiado de muestra puede ser evaluado. Por ejemplo, se puede evaluar una muestra que contiene células de cáncer para determinar si el genoma de las células de cáncer contiene una LOH distintiva, carece de una LOH distintiva, tiene un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo o carece de un mayor número de LOH regiones que cubren el cromosoma completo. Los ejemplos de muestras que contienen células de cáncer que se pueden evaluar como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, muestras de biopsia tumoral (por ejemplo, muestras de biopsia de tumor de mama), muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina que contienen células de cáncer, biopsias con aguja gruesa, aspirados con aguja fina y muestras que contienen células de cáncer que se desprenden de un tumor (por ejemplo, sangre, orina u otros fluidos corporales). Para muestras de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina, la muestra se puede preparar mediante extracción de ADN utilizando un kit de extracción de ADN genómico optimizado para tejido FFPE, que incluye, entre otros, los descritos anteriormente (por ejemplo, Kit de extracción de ADN FFPE Quick-Extract™ (Epicenter™) y QIAamp™ DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen™)).

En algunos casos, las técnicas de disección con láser se pueden realizar en una muestra de tejido para minimizar el número de células no cancerosas dentro de una muestra de células de cáncer que se van a evaluar. En algunos casos, los métodos de purificación basados en anticuerpos se pueden utilizar para enriquecer las células de cáncer y/o agotar las células no cancerosas. Los ejemplos de anticuerpos que se podrían utilizar para el enriquecimiento de células de cáncer incluyen, sin limitación, anti-EpCAM, anti-TROP-2, anti-c-Met, proteína de unión anti-folato, anti-N-Caderina, anti-CD318, antígeno de célula madre anti-antimesencimal, anti-Her2, anti-MUC1, anti-EGFR, anti-citoqueratinas (por ejemplo, citoqueratina 7, citoqueratina 20, etc.), anti-Caveolina-1, anti-PSA, anti-CA125 y anticuerpos de proteína anti-surfactante.

Cualquier tipo de célula de cáncer se puede evaluar utilizando los métodos y materiales descritos en este documento. Por ejemplo, se pueden evaluar las células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, células de cáncer de hígado, células de cáncer de esófago, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de próstata, células de cáncer de colon, rectal, o colorrectal, y células de cáncer pancreático para determinar si el genoma de las células de cáncer contiene una LOH distintiva, carece de una LOH distintiva, tiene un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo, o carece de un mayor número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo. En algunas realizaciones, las células de cáncer son células de cáncer primarias o metastásicas de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago.

Al evaluar el genoma de células de cáncer para la presencia o ausencia de una LOH distintiva, se pueden evaluar uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23) pares de cromosomas. En algunos casos, el genoma de células de cáncer se evalúa para la presencia o ausencia de una LOH distintiva utilizando uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) pares de cromosomas.

En algunos casos, puede ser útil excluir ciertos cromosomas de este análisis. Por ejemplo, en el caso de mujeres, un par que se va a evaluar puede incluir el par de cromosomas sexuales X; mientras que, en el caso de hombres, se puede evaluar un par de cualesquier cromosomas autosómicos (es decir, cualquier par diferente del par de cromosomas sexuales X y Y). Como otro ejemplo, en algunos casos el par del cromosoma número 17 se puede excluir del análisis. Se ha determinado que ciertos cromosomas llevan niveles inusualmente altos de LOH en ciertos cánceres y, por lo tanto, puede ser útil excluir dichos cromosomas al analizar las muestras como se describe en este documento de pacientes que tienen estos cánceres. En algunos casos, la muestra es de un paciente que tiene cáncer de ovario, y el cromosoma que se va a excluir es el cromosoma 17.

Al evaluar el genoma de células de cáncer para la presencia o ausencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo, se pueden evaluar 10 o más (por ejemplo, 13, 16, 19 o 23) pares de cromosomas. En el caso de mujeres, un par que se va a evaluar puede incluir el par de cromosomas sexuales X; mientras que, en el caso de hombres, se puede evaluar un par de cualesquier cromosomas autosómicos (es decir,

cualquier par diferente del par de cromosomas sexuales X y Y). En algunos casos, el par del cromosoma número 17 se puede excluir del análisis. En algunos casos, la muestra es de un paciente que tiene cáncer de ovario, y el cromosoma que se va a excluir es el cromosoma 17. En algunos casos, el genoma de células de cáncer se evalúa para la presencia o ausencia de un mayor número de regiones de LOH que cubra el cromosoma completo utilizando 10 o más (por ejemplo, 13, 16, 19, o 23) pares de cromosomas.

Por lo tanto, se puede analizar un número predefinido de cromosomas para determinar el número total de Regiones de LOH Indicadoras, preferiblemente el número total de regiones de LOH de una longitud de más de 9 megabases, 10 megabases, 12 megabases, 14 megabases, más preferiblemente mayor de 15 megabases. Alternativamente o adicionalmente, los tamaños de todas las Regiones de LOH Indicadoras identificadas se pueden resumir para obtener una longitud total de Regiones de LOH Indicadoras.

Para la clasificación del estado de LOH distintiva positiva, el número de referencia discutido anteriormente para el número total de Regiones de LOH Indicadoras puede ser 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20 o mayor, preferiblemente 5, preferiblemente 8, más preferiblemente 9 o 10, aún más preferiblemente 10. El número de referencia para la longitud total (por ejemplo, combinada) de Regiones de LOH Indicadoras puede ser de aproximadamente 75, 90, 105, 120, 130, 135, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 megabases o mayor, preferiblemente aproximadamente 75 megabases o mayor, preferiblemente aproximadamente 90 o 105 megabases o mayor, más preferiblemente aproximadamente 120 o 130 megabases o mayor, y más preferiblemente aproximadamente 135 megabases o mayor, y aún más preferiblemente aproximadamente 150 megabases o mayor.

En algunas realizaciones específicas, el número total de regiones de LOH de una longitud de mayor de aproximadamente 14 o 15 megabases se determina y compara con un número de referencia de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, o 20. Alternativamente o adicionalmente, la longitud total de regiones de LOH de una longitud de mayor de aproximadamente 14 o 15 megabases se determina y compara con un número de referencia de aproximadamente 75, 90, 105, 120, 130, 135, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, o 500 megabases.

En algunas realizaciones, el número de regiones de LOH (o la longitud combinada, o un valor o puntuación de prueba derivada de cualquiera) en una muestra de paciente se considera "mayor" que una referencia si es al menos 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, o 10- veces mayor que la referencia mientras que en algunas realizaciones, se considera "mayor" si es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 desviaciones estándar mayores que la referencia. Por el contrario, en algunas realizaciones el número de regiones de LOH (o la longitud combinada, o un valor o puntuación de prueba derivado de cualquiera) en una muestra de paciente se considera "no mayor" que una referencia si no es más de 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, o 10-veces mayor que la referencia mientras que en algunas realizaciones, se considera "no mayor" si no es más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 desviaciones estándar mayor de la referencia.

En algunas realizaciones, el número de referencia (o longitud, valor o puntuación) se deriva de una población de referencia relevante. Dichas poblaciones de referencia pueden incluir pacientes (a) con el mismo cáncer que el paciente sometido a prueba, (b) con el mismo subtipo de cáncer, (c) con cáncer que tiene características genéticas u otras características clínicas o moleculares similares, (d) que respondieron a un tratamiento en particular, (e) que no respondió a un tratamiento en particular, (f) que aparentemente están sanos (por ejemplo, no tienen ningún cáncer o al menos no tienen el cáncer del paciente probado), etc. El número de referencia (o longitud, valor o puntuación) puede ser (a) representativo del número (o longitud, valor o puntuación) encontrado en la población de referencia como un todo, (b) un promedio (media, mediana, etc.) del número (o longitud, valor o puntuación) encontrados en la población de referencia como un todo o una subpoblación particular, (c) representativo del número (o longitud, valor o puntuación) (por ejemplo, un promedio tal como la media o mediana) encontrado en terciles, cuartiles, quintiles, etc. de la población de referencia según (i) su número respectivo (o longitud, valor o puntuación) o (ii) la característica clínica que se encontró que tenían (por ejemplo, fuerza de respuesta, pronóstico (que incluye el tiempo hasta la muerte específica por cáncer), etc.).

Como se describe en este documento, se pueden clasificar los pacientes que tienen células de cáncer identificadas como que tienen un estado de LOH distintiva positiva, con base al menos en parte en un estado de LOH distintiva positiva, como susceptible de responder a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer. Por ejemplo, se pueden clasificar los pacientes que tienen células de cáncer con un genoma que contiene una LOH distintiva, con base al menos en parte en un estado de LOH distintiva positiva, que es probable responda a un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un agente que daña el ADN, un agente de letalidad sintético (por ejemplo, un inhibidor PARP), radiación, o una combinación del mismo. Preferiblemente los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Ejemplos de agentes que dañan el ADN incluyen, sin limitación, fármacos de quimioterapia a base de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, y picoplatino), antraciclinas (por ejemplo, epirrubicina y doxorubicina), los inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecina, topotecan, y irinotecan), entrecruzadores de ADN tales como mitomicina C, y compuestos de triazeno (por ejemplo, dacarbazina y temozolomida). Los enfoques terapéuticos de letalidad sintética generalmente implican la administración de un agente que inhibe al menos un componente crítico de una ruta biológica que es especialmente importante para la supervivencia de una célula tumoral particular. Por ejemplo, cuando una célula tumoral tiene una ruta de reparación

homóloga deficiente (por ejemplo, según se determina de acuerdo con la presente invención), los inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (o fármacos de platino, inhibidores de reparación de rotura de doble cadena, etc.) pueden ser especialmente potentes contra dichos tumores porque se obstruyen las dos rutas críticas para la supervivencia (una biológicamente, por ejemplo, por mutación BRCA1, y la otra sintéticamente, por ejemplo, por la administración de un fármaco de ruta). Los enfoques de letalidad sintética para la terapia contra el cáncer se describen, por ejemplo, en O'Brien et al., Converting cancer mutations into therapeutic opportunities, EMBO MOL. MED. (2009) 1:297-299. Ejemplos de agentes de letalidad sintéticos incluyen, sin limitación, inhibidores de PARP o inhibidores de reparación de rotura de doble cadena en células tumorales deficientes de reparación homólogas, inhibidores de PARP en células tumorales deficientes en PTEN, metotrexato en células tumorales deficientes en MSH2, etc. Los ejemplos de inhibidores de PARP incluyen, sin limitación, olaparib, iniparib y veliparib. Los ejemplos de inhibidores de reparación de rotura de doble cadena incluyen, sin limitación, KU55933 (inhibidor ATM) y NU7441 (inhibidor de ADN-PKcs). Los ejemplos de información que se pueden utilizar además de un estado de LOH distintiva positiva para basar una clasificación de probabilidades de responder a un régimen de tratamiento de cáncer en particular incluyen, sin limitación, resultados de tratamiento anteriores, línea germinal o mutaciones de ADN somático, perfil de expresión de genes o proteínas (por ejemplo, estado de ER/PR/HER2, niveles de PSA), histología tumoral (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células epidermoides, carcinoma seroso papilar, carcinoma mucinoso, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ (no invasivo), etc.), estadio de la enfermedad, tumor o grado de cáncer (por ejemplo, bien, moderadamente o pobremente diferenciado (por ejemplo, Gleason, Bloom Richardson modificado), etc.), número de ciclos de tratamiento anteriores, etc.

Una vez se clasifica como susceptible de responder a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer (por ejemplo, un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un agente que daña el ADN, un inhibidor PARP, radiación, o una combinación de los mismos), el paciente con cáncer se puede tratar con dicho régimen de tratamiento contra el cáncer. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Cualquier método apropiado para tratar el cáncer en cuestión se puede utilizar para tratar un paciente con cáncer identificado como que tiene células de cáncer que tienen un estado de LOH distintiva positiva. Por ejemplo, se pueden utilizar fármacos de quimioterapia a base de platino o una combinación de fármacos de quimioterapia a base de platino para tratar cáncer como se describe en otra parte (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 3,892,790, 3,904,663, 7,759,510, 7,759,488 y 7,754,684. En algunos casos, antraciclinas o una combinación de antraciclinas se puede utilizar para tratar cáncer como se describe en otra parte (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 3,590,028, 4,138,480, 4,950,738, 6,087,340, 7,868,040, y 7,485,707. En algunos casos, los inhibidores de topoisomerasa I o una combinación de inhibidores de topoisomerasa I se puede utilizar para tratar cáncer como se describe en otra parte (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,633,016 y 6,403,563. En algunos casos, los inhibidores PARP o una combinación de inhibidores PARP se puede utilizar para tratar cáncer como se describe en otra parte (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,177,075, 7,915,280, y 7,351,701. En algunos casos, radiación se puede utilizar para tratar cáncer como se describe en otra parte (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 5,295,944). En algunos casos, una combinación que comprende diferentes agentes (por ejemplo, una combinación que comprende cualquiera de los fármacos de quimioterapia a base de platino, antraciclinas, inhibidores de topoisomerasa I, y/o inhibidores PARP) con o sin tratamientos de radiación se puede utilizar para tratar cáncer. En algunos casos, un tratamiento de combinación puede comprender cualquiera de los anteriores agentes o tratamientos (por ejemplo, un agente que daña el ADN, un inhibidor PARP, radiación, o una combinación de los mismos) junto con otro agente o tratamiento - por ejemplo, un agente de taxano (por ejemplo, doxetaxel, paclitaxel, abraxano), un factor de crecimiento o inhibidor del receptor de factor de crecimiento (por ejemplo, erlotinib, gefitinib, lapatinib, sunitinib, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, panitumumab), y/o un antimetabolito (por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato).

En algunos casos, se pueden clasificar los pacientes identificados como que tienen células de cáncer con un genoma que carece de una LOH distintiva, con base al menos en parte en un estado de LOH distintiva negativa, ya que es menos probable que responda a un régimen de tratamiento que incluye un agente que daña el ADN, un inhibidor PARP, radiación, o una combinación de los mismos. A su vez, dicho paciente se puede clasificar como probable de que responda a un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de uno o más agentes de tratamiento contra el cáncer no asociados con HDR, tales como un agente de taxano (por ejemplo, doxetaxel, paclitaxel, abraxano), un factor de crecimiento o inhibidor del receptor de factor de crecimiento (por ejemplo, erlotinib, gefitinib, lapatinib, sunitinib, bevacizumab, cetuximab, trastuzumab, panitumumab), y/o un agente antimetabolito (por ejemplo, 5-fluorouracilo, metotrexato). En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Una vez clasificado como susceptible de responder a un régimen particular de tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un agente de tratamiento contra el cáncer no asociado con HDR), el paciente con cáncer se puede tratar con dicho régimen de tratamiento contra el cáncer. Cualquier método apropiado para el cáncer que se va a tratar se puede utilizar para tratar un paciente con cáncer identificado como que tiene células de cáncer que tienen un estado de LOH distintiva negativa. Los ejemplos de información que se pueden utilizar además de un estado de LOH distintiva negativo para basar una clasificación de probabilidades de responder a un régimen de tratamiento de cáncer en particular incluyen, sin limitación, resultados de tratamiento anteriores, línea germinal o mutaciones de ADN somático, perfil de expresión de genes o proteínas (por ejemplo, estado de ER/PR/HER2, niveles de PSA), histología tumoral (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células epidermoides, carcinoma seroso papilar, carcinoma mucinoso, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ (no invasivo), etc.), estadio de la

enfermedad, tumor o grado de cáncer (por ejemplo, bien, moderadamente o pobremente diferenciado (por ejemplo, Gleason, Bloom Richardson modificado), etc.), número de ciclos de tratamiento anteriores, etc.

Una vez tratado durante un período de tiempo particular (por ejemplo, entre uno y seis meses), se puede evaluar al paciente para determinar si el régimen de tratamiento tiene o no un efecto. Si se detecta un efecto beneficioso, el paciente puede continuar con el mismo régimen de tratamiento contra el cáncer o uno similar. Si se detecta un efecto beneficioso mínimo o nulo, entonces se pueden hacer ajustes al régimen de tratamiento del cáncer. Por ejemplo, la dosis, la frecuencia de administración o la duración del tratamiento pueden aumentarse. En algunos casos, se pueden agregar agentes anticancerígenos adicionales al régimen de tratamiento o se puede reemplazar un agente anticancerígeno particular con uno o más agentes anticancerígenos diferentes. El paciente que está siendo tratado puede continuar siendo monitoreado según corresponda, y se pueden hacer cambios al régimen de tratamiento del cáncer según corresponda.

Adicionalmente para predecir la probable respuesta al tratamiento o seleccionar regímenes de tratamiento deseables, una LOH distintiva se puede utilizar para determinar un pronóstico del paciente. Como se muestra en el Ejemplo 3 a continuación (particularmente la Figura 18b), los pacientes cuyos tumores tienen una LOH distintiva muestran significativamente mejor supervivencia que los pacientes cuyos tumores no tienen dicha LOH distintiva. Por lo tanto, en un aspecto, este documento presenta un método para determinar un pronóstico del paciente con base al menos en parte en detectar la presencia o ausencia de una LOH distintiva en una muestra del paciente. El método comprende, o consiste esencialmente en, (a) determinar si el paciente comprende células de cáncer que tienen una LOH distintiva como se describe en este documento (por ejemplo, en la que la presencia de más de un número de referencia de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases), y (b)(1) determinar, con base al menos en parte en la presencia de la LOH distintiva, que el paciente tiene un pronóstico relativamente bueno, o (b)(2) determinar, con base al menos en parte en la ausencia de la LOH distintiva, que el paciente tiene un pronóstico relativamente pobre. El pronóstico puede incluir la probabilidad de supervivencia del paciente (por ejemplo, supervivencia libre de progresión, supervivencia general), en la que un pronóstico relativamente bueno incluiría una mayor probabilidad de supervivencia en comparación con alguna población de referencia (por ejemplo, paciente promedio con el tipo/subtipo de cáncer de este paciente, paciente promedio que no tiene una LOH distintiva, etc.). Por el contrario, un pronóstico relativamente pobre en términos de supervivencia incluiría una menor probabilidad de supervivencia en comparación con alguna población de referencia (por ejemplo, paciente promedio con el tipo/subtipo de cáncer de este paciente, paciente promedio que tiene una LOH distintiva, etc.).

Como se describe en este documento, este documento proporciona métodos para evaluar pacientes para células (por ejemplo, células de cáncer) que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Por ejemplo, uno o más clínicos o profesionales médicos pueden determinar si un paciente contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva. En algunos casos, uno o más clínicos o profesionales médicos pueden determinar si un paciente contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva al obtener una muestra de célula de cáncer del paciente y evaluar el genoma de células de cáncer de la muestra de célula de cáncer para determinar la presencia o ausencia de una LOH distintiva como se describe en este documento.

En algunos casos, uno o más clínicos o profesionales médicos pueden obtener una muestra de célula de cáncer de un paciente y proporcionar esa muestra a un laboratorio de pruebas que tenga la capacidad de evaluar el genoma de células de cáncer de la muestra de célula de cáncer para proporcionar una indicación acerca de la presencia o ausencia de una LOH distintiva como se describe en este documento. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. En dichos casos, uno o más clínicos o profesionales médicos pueden determinar si un paciente contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva al recibir información acerca de la presencia o ausencia de una LOH distintiva directamente o indirectamente del laboratorio de pruebas. Por ejemplo, un laboratorio de pruebas, después de evaluar el genoma de células de cáncer para presencia o ausencia de una LOH distintiva como se describe en este documento, un clínico o profesional médico con, o acceso a, puede proporcionar un informe escrito, electrónico, oral o historial médico que proporciona una indicación acerca de la presencia o ausencia de una LOH distintiva para un paciente en particular que se va a evaluar. Dicho informe escrito, electrónico, oral o historial médico pueden permitir que uno o más clínicos o profesionales médicos determinen si un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva.

Una vez que un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos determina que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva, el clínico o profesional médico (o grupo) puede clasificar ese paciente como que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas



contienen la presencia de una LOH distintiva ya que tiene células de cáncer que probablemente son deficientes en HDR. Dicho diagnóstico se puede basar solo en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva. Por ejemplo, un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva se puede diagnosticar como propenso a ser deficiente en HDR con base en la combinación de un estado de LOH distintiva positiva y estado deficiente en uno o más genes supresores de tumor (por ejemplo, BRCA1/2, RAD51C), una historia familiar de cáncer, o la presencia de factores de riesgo de comportamiento (por ejemplo, fumar).

En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente contienen mutaciones genéticas en uno o más genes en la ruta de HDR. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Dicho diagnóstico se puede basar solo en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva. Por ejemplo, un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva se puede diagnosticar ya que tienen células de cáncer que probablemente contienen mutaciones genéticas en uno o más genes en la ruta de HDR con base en la combinación de un estado positivo de LOH positiva y una historia familiar de cáncer, o la presencia de factores de riesgo de comportamiento (por ejemplo, fumar).

En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente responden a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Dicho diagnóstico se puede basar solo en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en una determinación de que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que contiene una LOH distintiva. Por ejemplo, un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva se puede diagnosticar como susceptible de responder a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer con base en la combinación de un estado de LOH distintiva positiva y estado deficiente en uno o más genes supresores de tumor (por ejemplo, BRCA1/2, RAD51), una historia familiar de cáncer, o la presencia de factores de riesgo de comportamiento (por ejemplo, fumar). Como se describe en este documento, un paciente determinado que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen la presencia de una LOH distintiva se puede diagnosticar ya que probablemente responde a un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un fármaco de quimioterapia a base de platino tal como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, o picoplatino, una antraciclina tal como epirubicina o doxorubicina, un inhibidor de topoisomerasa I tal como camptotecina, topotecan, o irinotecan, un inhibidor PARP, radiación, una combinación de los mismos, o una combinación de cualquier del anterior con otro agente contra el cáncer. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Una vez que un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos determina que un paciente particular que se va a evaluar contiene células de cáncer que tienen un genoma que carece de una LOH distintiva, el clínico o profesional médico (o grupo) puede clasificar ese paciente como que tiene células de cáncer cuyos genomas contienen una ausencia de una LOH distintiva. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer que contiene un genoma que carece de la presencia de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente tienen HDR funcional. En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer que contiene un genoma que carece de la presencia de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente no contienen mutaciones genéticas en uno o más genes en la ruta de HDR. En algunos casos, un clínico o profesional médico o grupo de clínicos o profesionales médicos puede diagnosticar un paciente determinado que tiene células de cáncer que contiene un genoma que carece de la presencia de una LOH distintiva o contiene un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo ya que tienen células de cáncer que probablemente responden menos a un fármaco de quimioterapia a base de platino tal como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, o picoplatino, una antraciclina tal como epirubicina o doxorubicina, un inhibidor de topoisomerasa I tal como camptotecina, topotecan, o irinotecan, un inhibidor PARP, o radiación y/o más probablemente respondan a un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un agente de tratamiento contra el cáncer no asociado con HDR tal como uno o más agentes de taxano, factor de crecimiento o inhibidor del receptor de factor de crecimientos, agentes anti-metabolitos, etc. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Como se describe en este documento, este documento también proporciona métodos para realizar un análisis de diagnóstico de una muestra de ácido nucleico (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico genómico o muestra de

ácido nucleico genómico amplificado) de un paciente con cáncer para determinar si las células de cáncer dentro del paciente tienen un genoma que contiene una LOH distintiva y/o un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento. Por ejemplo, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden detectar la presencia o ausencia de una LOH distintiva en el genoma de células de cáncer del paciente o la presencia o ausencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo en el genoma de células de cáncer del paciente. En algunos casos, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden detectar la presencia o ausencia de una LOH distintiva o la presencia o ausencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo en el genoma de células de cáncer del paciente al (a) recibir una muestra de célula de cáncer obtenida del paciente, recibir una muestra de ácido nucleico genómico obtenida de células de cáncer obtenidas del paciente, o recibir una muestra de ácido nucleico genómico enriquecida y/o amplificada obtenida de células de cáncer obtenidas del paciente y (b) realizar un análisis (por ejemplo, un ensayo basado en la matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación) utilizando el material recibido para detectar la presencia o ausencia de una LOH distintiva o la presencia o ausencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo como se describe en este documento. En algunos casos, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden recibir una muestra que se va a analizar (por ejemplo, una muestra de célula de cáncer obtenida del paciente, una muestra de ácido nucleico genómico obtenida de células de cáncer obtenidas del paciente, o una muestra de ácido nucleico genómico enriquecida y/o amplificada obtenida de células de cáncer obtenidas del paciente) directamente o indirectamente de un clínico o profesional médico. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Una vez un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio detecta la presencia de una LOH distintiva como se describe en este documento, el técnico de laboratorio o profesional de laboratorio (o grupo) puede identificar el paciente cuyas células de cáncer se detectaron ya que tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con un estado de LOH distintiva positiva. Por ejemplo, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con un estado de LOH distintiva positiva al asociar ese estado de LOH distintiva positiva o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer potencialmente deficiente en HDR al asociar el estado de LOH distintiva positiva, el potencialmente deficiente en estado de HDR, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. Dicha identificación se puede basar solo en detectar la presencia de una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en detectar la presencia de una LOH distintiva. Por ejemplo, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer potencialmente deficiente en HDR con base en una combinación de un estado de LOH distintiva positiva y los resultados de otras pruebas genéticas y bioquímicas realizadas en el laboratorio de pruebas. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que contienen potencialmente una mutación genética en uno o más genes en la ruta de HDR al asociar el estado de LOH distintiva positiva, la presencia potencial de una mutación genética en uno o más genes en la ruta de HDR, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. Dicha identificación se puede basar solo en detectar la presencia de una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en detectar la presencia de una LOH distintiva. Por ejemplo, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que contienen potencialmente una mutación genética en uno o más genes en la ruta de HDR con base en una combinación de un estado de LOH distintiva positiva y los resultados de otras pruebas genéticas y bioquímicas realizadas en el laboratorio de pruebas. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente responden a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer al asociar el estado de LOH distintiva positiva, un estado de HDR potencialmente deficiente, una presencia potencial de un estado deficiente en uno o más genes en la ruta de HDR, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. Dicha identificación se puede basar solo en detectar la presencia de una LOH distintiva o puede ser con base al menos en parte en detectar la presencia de una LOH distintiva. Por ejemplo, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio puede identificar un

paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer que probablemente responden a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer con base en una combinación de un estado de LOH distintiva positiva y los resultados de otras pruebas genéticas y bioquímicas realizadas en el laboratorio de pruebas. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Una vez un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio detecta la ausencia de una LOH distintiva, el técnico de laboratorio o profesional de laboratorio (o grupo) puede identificar el paciente cuyas células de cáncer se detectaron como que carecen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con un estado de LOH distintiva negativa. Por ejemplo, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron carecen una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con un estado de LOH distintiva negativa al asociar ese estado de LOH distintiva negativa o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron carecen de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con HDR potencialmente intacta al asociar el estado de LOH distintiva negativa, el estado de HDR potencialmente intacto, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron carecen de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer con genes potencialmente intactos de la ruta de HDR al asociar el estado de LOH distintiva negativa, la ausencia de mutaciones genéticas potencial en genes de la ruta de HDR, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

En algunos casos, un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio puede identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron carecen de una LOH distintiva ya que tienen células de cáncer como menos probable que responda a un tratamiento particular (por ejemplo, un fármaco de quimioterapia a base de platino tal como cisplatino, carboplatino, oxalaplatino, o picoplatino, una antraciclina tal como epirrubina o doxorubicina, un inhibidor de topoisomerasa I tal como camptotecina, topotecan, o irinotecan, un inhibidor PARP tal como iniparib, olaparib, o velapirib, o radiación) y/o más probablemente responda a un régimen de tratamiento particular contra el cáncer (por ejemplo, un régimen de tratamiento contra el cáncer que incluye el uso de un agente de tratamiento contra el cáncer no asociado con HDR) al asociar el estado de LOH distintiva negativa, un estado de HDR potencialmente intacto, una potencial ausencia de mutaciones genéticas en genes de la ruta de HDR, o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Una vez un técnico de laboratorio o profesional de laboratorio o grupo de técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio detecta la presencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo, el técnico de laboratorio o profesional de laboratorio (o grupo) puede identificar el paciente cuyas células de cáncer se detectaron ya que tienen un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo ya que probablemente tiene células de cáncer con un estado BRCA1, BRCA2 y/o RAD51C intacto, o ruta de HDR intacta. Por ejemplo, uno o más técnicos de laboratorio o profesionales de laboratorio pueden identificar un paciente que tiene células de cáncer que se detectaron tienen un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo ya que probablemente tiene células de cáncer con un estado BRCA1 y BRCA2 intacto al asociar la presencia de un mayor número de regiones de LOH que cubre el cromosoma completo o el resultado (o resultados o un resumen de resultados) del análisis de diagnóstico realizado con el nombre del paciente correspondiente, registro médico, identificador simbólico/numérico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los pacientes son pacientes que nunca se han sometido a tratamiento.

Los resultados de cualquier análisis de acuerdo con la invención a menudo se comunicarán a médicos, asesores genéticos y/o pacientes (u otras partes interesadas, tales como investigadores) en una forma transmisible que se pueda comunicar o transmitir a cualquiera de las partes anteriores. Tal forma puede variar y puede ser tangible o intangible. Los resultados se pueden incorporar en declaraciones descriptivas, diagramas, fotografías, cuadros, imágenes o cualquier otra forma visual. Por ejemplo, los gráficos o diagramas que muestran información de genotipo o LOH (o estado de HRD) se pueden utilizar para explicar los resultados. Las declaraciones y las formas visuales se pueden grabar en un medio tangible, tales como documentos, medios legibles por ordenador, tales como disquetes, discos compactos, memoria flash, etc., o en un medio intangible, por ejemplo, un medio electrónico en forma de correo electrónico o sitio web en Internet o intranet. Adicionalmente, los resultados también se pueden grabar en

forma de sonido y transmitir a través de cualquier medio adecuado, por ejemplo, líneas de cable analógicas o digitales, cables de fibra óptica, etc., por teléfono, facsímil, teléfono móvil inalámbrico, teléfono de Internet y similares.

Por lo tanto, la información y los datos sobre el resultado de una prueba se pueden producir en cualquier parte del mundo y transmitir a una ubicación diferente. Como ejemplo ilustrativo, cuando se realiza un ensayo fuera de los Estados Unidos, la información y los datos sobre el resultado de una prueba se pueden generar, emitir en una forma transmisible como se describió anteriormente y luego importarse a los Estados Unidos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención también abarca un método para producir una forma de información transmisible en una LOH distintiva para al menos una muestra de paciente. El método comprende las etapas de (1) determinar una LOH distintiva de acuerdo con los métodos de la presente invención; y (2) incorporar el resultado de la etapa de determinación en una forma transmisible. La forma transmisible es un producto de dicho método.

Diversas realizaciones de la invención descritas en este documento implican una etapa de correlacionar una LOH distintiva de acuerdo a la presente invención (por ejemplo, el número total de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de dicha célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que dicha primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases) a una característica clínica particular (por ejemplo, una mayor probabilidad de una deficiencia en el gen BRCA1 o BRCA2; una mayor probabilidad de deficiencia de HDR; una mayor probabilidad de respuesta a un régimen de tratamiento que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, y/o un inhibidor PARP; etc.) si el número es mayor que alguna referencia (o opcionalmente a otra característica si el número es menor que alguna referencia). A lo largo de este documento, en el que se describe dicha realización, otra realización de la invención puede involucrar, adicionalmente a o en lugar de una etapa de correlación, una o ambas de las siguientes etapas: (a) concluir que el paciente tiene la característica clínica con base al menos en parte en la presencia o ausencia de la LOH distintiva; o (b) comunicar que el paciente tiene la característica clínica con base al menos en parte en la presencia o ausencia de la LOH distintiva.

A modo de ilustración, pero no limitación, una realización descrita en este documento es un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, y/o un inhibidor PARP, dicho método comprende: (1) determinar, en una célula de cáncer de dicho paciente con cáncer, el número de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer de dicho paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que dicha primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases; y (2) correlacionar dicho número total que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a dicho régimen de tratamiento contra el cáncer. De acuerdo al párrafo anterior, se entiende que esta descripción de esta realización incluye una descripción de dos realizaciones relacionadas, es decir, un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, y/o un inhibidor PARP, dicho método comprende: (1) determinar, en una célula de cáncer de dicho paciente con cáncer, el número de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer de dicho paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que dicha primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases; y (2)(a) concluir que dicho paciente tiene una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a dicho régimen de tratamiento contra el cáncer con base al menos en parte en un número total que es mayor que un número de referencia; o (2)(b) comunicar que dicho paciente tiene una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a dicho régimen de tratamiento contra el cáncer con base al menos en parte en un número total que es mayor que un número de referencia.

En cada realización descrita en este documento que implica la correlación de un ensayo particular o salida de análisis (por ejemplo, el número total de regiones de LOH mayores que un número de referencia, etc.) con cierta probabilidad (por ejemplo, aumentado, no aumentado, disminuido, etc.) de alguna característica clínica (por ejemplo, respuesta a un tratamiento particular, muerte específica por cáncer, etc.), o concluir o comunicar adicional o alternativamente dicha característica clínica basada al menos en parte en dicho resultado de análisis o análisis particular, dicha correlación, conclusión o comunicarse puede comprender asignar un riesgo o probabilidad de que ocurra la característica clínica en base al menos en parte al ensayo particular o la salida de análisis. En algunas realizaciones, dicho riesgo es un porcentaje de probabilidad de que ocurra el evento o resultado. En algunas realizaciones, el paciente se asigna a un grupo de riesgo (por ejemplo, riesgo bajo, riesgo intermedio, riesgo alto, etc.). En algunas realizaciones "riesgo bajo" es cualquier porcentaje de probabilidad por debajo de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50%. En algunas realizaciones "riesgo intermedio" es cualquier porcentaje de probabilidad por encima de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, o 50% y por debajo de 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%. En algunas realizaciones "riesgo alto" es cualquier

porcentaje de probabilidad por encima de 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%.

Como se utiliza en el presente documento, "comunicar" una pieza particular de información significa dar a conocer dicha información a otra persona o transferir dicha información a una cosa (por ejemplo, un ordenador). Esta comunicación puede ser auditiva (por ejemplo, verbal), visual (por ejemplo, escrita), electrónica (por ejemplo, datos transferidos de un sistema de ordenador a otro), etc. En algunas realizaciones, comunicar una clasificación de cáncer (por ejemplo, probabilidad de respuesta, tratamiento apropiado, etc.) comprende generar un informe que comunique la clasificación del cáncer. En algunas realizaciones, el informe es un informe en papel, un informe auditivo o un registro electrónico. En algunas realizaciones, el informe se muestra y/o almacena en un dispositivo de ordenador (por ejemplo, dispositivo de mano, ordenador de escritorio, dispositivo inteligente, sitio web, etc.). En algunas realizaciones, la clasificación del cáncer se comunica a un médico (por ejemplo, se proporciona un informe que comunica la clasificación al médico). En algunas realizaciones, la clasificación del cáncer se comunica a un paciente (por ejemplo, se proporciona un informe que comunica la clasificación al paciente). La comunicación de una clasificación de cáncer también se puede lograr al transferir información (por ejemplo, datos) que incorpora la clasificación a un ordenador servidor y permitiendo que un intermediario o usuario final acceda a dicha información (por ejemplo, al visualizar la información que se muestra desde el servidor, al descargar la información en forma de uno o más archivos transferidos desde el servidor al intermediario o al dispositivo del usuario final, etc.).

Cuando una realización de la invención comprende concluir algún hecho (por ejemplo, el pronóstico de un paciente o la probabilidad de respuesta de un paciente a un régimen de tratamiento particular), esto puede incluir en algunas realizaciones un programa de ordenador que concluye tal hecho, normalmente después de realizar un algoritmo que aplica información sobre regiones de LOH de acuerdo con la presente invención.

En cada realización descrita en el presente documento que implica un número de regiones de LOH (por ejemplo, regiones indicadoras de LOH) o una longitud total combinada de dichas regiones de LOH, la presente invención abarca una realización relacionada que implica un valor o puntuación de prueba (por ejemplo, puntuación de HRD, puntuación de LOH, etc.) derivado de, que incorpora y/o, al menos en cierto grado, refleja dicho número o longitud. En otras palabras, los números o longitudes de la región de LOH desnuda no se necesitan utilizar en los diversos métodos, sistemas, etc. de la invención; se puede utilizar un valor o puntuación de prueba derivado de dichos números o longitudes. Por ejemplo, una realización de la invención proporciona un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende: (1) determinar en una muestra de dicho paciente el número de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer del paciente con cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH indica que las células de cáncer tienen la LOH distintiva, en la que el al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que la primera longitud es de aproximadamente 1.5 o más megabases; (2) proporcionar un valor de prueba derivado del número de dichas regiones de LOH; (3) comparar dicho valor de prueba con uno o más valores de referencia derivados del número de dichas regiones de LOH en una población de referencia (por ejemplo, media, mediana, terciles, cuartiles, quintiles, etc.); y (4) (a) administrar a dicho paciente un fármaco contra el cáncer, o recomendar o prescribir o iniciar un régimen de tratamiento que comprende quimioterapia y/o un agente de letalidad sintético basado al menos en parte en dicha etapa de comparación que revela que el valor de la prueba es mayor (por ejemplo, al menos 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10 veces mayor; al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 desviaciones estándar mayores que) al menos uno de dichos valores de referencia; o (4) (b) recomendar o prescribir o iniciar un régimen de tratamiento que no incluya quimioterapia y/o un agente de letalidad sintético basado al menos en parte en dicha etapa de comparación que revela que el valor de la prueba no es mayor (por ejemplo, no más de 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10 veces mayor; no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 desviaciones estándar mayores) que al menos uno de dichos valores de referencia. La invención abarca, mutatis mutandis, realizaciones correspondientes en las que el valor de la prueba o la puntuación se utilizan para determinar el pronóstico del paciente, la probabilidad de respuesta del paciente a un régimen de tratamiento particular, la probabilidad de la muestra del paciente o del paciente de tener una deficiencia de BRCA1, BRCA2, RAD51C o HDR, etc.

La Figura 15 muestra un proceso de ejemplo mediante el cual un sistema de ordenador (o un programa de ordenador (por ejemplo, software) que contiene instrucciones ejecutables por ordenador) puede identificar loci o regiones de LOH a partir de datos de genotipo como se describe en el presente documento. Si la relación observada de las señales de dos alelos, A y B, es de dos a uno, hay dos posibilidades. La primera posibilidad es que las células de cáncer tengan LOH con la eliminación del alelo B en una muestra con un 50% de contaminación con células normales. La segunda posibilidad es que no hay LOH pero el alelo A está duplicado en una muestra sin contaminación con células normales. El proceso comienza en el recuadro 1500, donde el sistema de ordenador recopila los siguientes datos; (1) intensidades de señal normalizadas específicas de muestra para ambos alelos de cada locus y (2) conjunto de parámetros específicos de ensayo (específicos para diferentes conjuntos de SNP y para enfoque basado en secuencias) definidos en base al análisis de gran número de muestras con perfiles ASCN conocidos. Como se describe en el presente documento, cualquier ensayo apropiado, tal como un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación, se puede utilizar para evaluar el loci a lo largo de un cromosoma en busca de homocigosidad o heterocigosidad. En algunos casos, se puede utilizar un sistema que incluye un detector de señal y un ordenador para recopilar datos (por ejemplo, señales fluorescentes o resultados de

secuenciación) con respecto a la naturaleza homocigótica o heterocigótica de la pluralidad de loci (por ejemplo, intensidades de señal normalizadas específicas de muestra para ambos alelos de cada locus). En el recuadro 1510, los números de copia específicos de alelo (ASCN) se reconstruyen en cada locus (por ejemplo, cada SNP). Los ASCN son el número de copias de alelos maternos y paternos. En el recuadro 1530, se utiliza una función de probabilidad para determinar si un locus homocigoto o una región de loci homocigotos se debe a LOH. Esto puede ser conceptualmente análogo a un algoritmo descrito previamente diseñado para reconstruir el número total de copias (en lugar de ASCN) en cada locus (por ejemplo, SNP). Véase la Solicitud Internacional No. PCT/US2011/026098 otorgada a Abkevich et al. La función de probabilidad se puede maximizar sobre el ASCN de todos los loci, el nivel de contaminación con tejido benigno, el número total de copias promediado en todo el genoma y el nivel de ruido específico de la muestra. En el recuadro 1540, una región de LOH se determina como un tramo de SNP con uno de los ASCN (paternos o maternos) siendo cero. En algunas realizaciones, el proceso de ordenador comprende adicionalmente una etapa de indagación o determinación de si un paciente nunca se ha sometido a tratamiento.

La Figura 3 muestra un proceso de ejemplo mediante el cual un sistema de ordenador puede determinar la presencia o ausencia de una LOH distintiva. El proceso comienza en el recuadro 300, en el que el sistema de ordenador recopila datos sobre la naturaleza homocigota o heterocigótica de una pluralidad de loci a lo largo de un cromosoma. Como se describe en el presente documento, cualquier ensayo apropiado, tal como un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación, se puede utilizar para evaluar el loci a lo largo de un cromosoma en busca de homocigosidad o heterocigosidad. En algunos casos, se puede utilizar un sistema que incluye un detector de señal y un ordenador para recopilar datos (por ejemplo, señales fluorescentes o resultados de secuenciación) con respecto a la naturaleza homocigótica o heterocigótica de la pluralidad de loci. En el recuadro 310, el sistema de ordenador evalúa los datos con respecto a la naturaleza homocigótica o heterocigótica de una pluralidad de loci, así como la ubicación o relación espacial de cada locus para determinar la longitud de cualquier región de LOH presente a lo largo de un cromosoma. En el recuadro 320, el sistema de ordenador evalúa los datos sobre el número de regiones de LOH detectadas y la longitud de cada región de LOH detectada para determinar el número de regiones de LOH que tienen una longitud (a) mayor o igual a un número predeterminado de Mb (por ejemplo, 15 Mb) y (b) menos que la longitud del cromosoma completo que contiene esa región de LOH. Alternativamente, el sistema de ordenador puede determinar la longitud total o combinada de LOH como se describió anteriormente. En el recuadro 330, el sistema de ordenador formatea una salida que proporciona una indicación de la presencia o ausencia de una LOH distintiva. Una vez formateado, el sistema de ordenador puede presentar la salida a un usuario (por ejemplo, un técnico de laboratorio, un médico o un profesional médico). Como se describe en este documento, la presencia o ausencia de una LOH distintiva se puede utilizar para proporcionar una indicación sobre el estado probable de HDR de un paciente, una indicación sobre la probable presencia o ausencia de mutaciones genéticas en los genes de la ruta de HDR, y/o una indicación sobre posibles regímenes de tratamiento del cáncer.

La Figura 4 es un diagrama de un ejemplo de un dispositivo 1400 de ordenador y un dispositivo 1450 de ordenador móvil, que se puede utilizar con las técnicas descritas en el presente documento. El dispositivo 1400 de ordenador está destinado a representar varias formas de ordenadores digitales, tales como ordenadores portátiles, ordenadores de escritorio, estaciones de trabajo, asistentes digitales personales, servidores, servidores blade, mainframes y otros ordenadores apropiados. El dispositivo 1450 de ordenador está destinado a representar diversas formas de dispositivos móviles, tales como asistentes digitales personales, teléfonos celulares, teléfonos inteligentes y otros dispositivos de ordenador similares. Los componentes que se muestran en este documento, sus conexiones y relaciones, y sus funciones, están destinados a ser solo de ejemplo, y no están destinados a limitar la implementación de las invenciones descritas y/o reivindicadas en este documento.

El dispositivo 1400 de ordenador incluye un procesador 1402, memoria 1404, un dispositivo 1406 de almacenamiento, una interfaz 1408 de alta velocidad que se conecta a la memoria 1404 y puertos 1410 de expansión de alta velocidad, y una interfaz 1415 de baja velocidad que se conecta al bus 1414 de baja velocidad y al dispositivo 1406 de almacenamiento. Cada uno de los componentes 1402, 1404, 1406, 1408, 1410 y 1415 están interconectados mediante varios buses y se pueden montar en una placa base común o de otras maneras, según corresponda. El procesador 1402 puede procesar instrucciones para la ejecución dentro del dispositivo 1400 de ordenador, que incluyen las instrucciones almacenadas en la memoria 1404 o en el dispositivo 1406 de almacenamiento para mostrar información gráfica para una GUI en un dispositivo externo de entrada/salida, como la pantalla 1416 acoplada a la interfaz 1408 de alta velocidad. En otras implementaciones, se pueden utilizar múltiples procesadores y/o buses múltiples, según sea apropiado, junto con múltiples memorias y tipos de memoria. También, se pueden conectar múltiples dispositivos 1400 de ordenador, y cada dispositivo proporciona porciones de las operaciones necesarias (por ejemplo, como un banco de servidores, un grupo de servidores blade o un sistema multiprocesador).

La memoria 1404 almacena información dentro del dispositivo 1400 de ordenador. En una implementación, la memoria 1404 es una unidad o unidades de memoria volátil. En otra implementación, la memoria 1404 es una unidad o unidades de memoria no volátiles. La memoria 1404 también puede ser otra forma de medio legible por ordenador, tal como un disco magnético u óptico.

El dispositivo 1406 de almacenamiento es capaz de proporcionar almacenamiento masivo para el dispositivo 1400 de ordenador. En una implementación, el dispositivo 1406 de almacenamiento puede ser o contener un medio legible por ordenador, tal como un dispositivo de disquete, un dispositivo de disco duro, un dispositivo de disco óptico, o un dispositivo de cinta, una memoria flash u otro dispositivo de memoria de estado sólido similar, o una matriz de dispositivos, que incluye los dispositivos en una red de área de almacenamiento u otras configuraciones. Un producto de programa de ordenador se puede incorporar de manera tangible en un soporte de información. El producto del programa de ordenador también puede contener instrucciones que, cuando se ejecutan, realizan uno o más métodos, tal como aquellos descritos en este documento. El portador de información es un ordenador o medio legible por máquina, tal como la memoria 1404, el dispositivo 1406 de almacenamiento, la memoria en el procesador 1402 o una señal propagada.

El controlador 1408 de alta velocidad gestiona operaciones intensivas de ancho de banda para el dispositivo 1400 de ordenador, mientras que el controlador 1415 de baja velocidad gestiona operaciones intensivas de menor ancho de banda. Dicha asignación de funciones es solo de ejemplo. En una implementación, el controlador 1408 de alta velocidad está acoplado a la memoria 1404, la pantalla 1416 (por ejemplo, a través de un procesador gráfico o acelerador), y a los puertos 1410 de expansión de alta velocidad, que pueden aceptar varias tarjetas de expansión (no mostradas). En la implementación, el controlador 1415 de baja velocidad está acoplado al dispositivo 1406 de almacenamiento y al puerto 1414 de expansión de baja velocidad. El puerto de expansión de baja velocidad, que puede incluir varios puertos de comunicación (por ejemplo, USB, Bluetooth, Ethernet o Ethernet inalámbrico) puede estar acoplado a uno o más dispositivos de entrada/salida, tales como un teclado, un dispositivo señalador, un escáner, un lector óptico, un detector de señal fluorescente o un dispositivo de red tal como un interruptor o enrutador, por ejemplo, a través de un adaptador de red.

El dispositivo 1400 de ordenador se puede implementar en varias formas diferentes, como se muestra en la figura. Por ejemplo, se puede implementar como un servidor 1420 estándar, o varias veces en un grupo de dichos servidores. También se puede implementar como parte de un sistema 1424 de servidor en rack. Adicionalmente, se puede implementar en un ordenador personal tal como un ordenador 1422 portátil. Alternativamente, los componentes del dispositivo 1400 de ordenador se pueden combinar con otros componentes en un dispositivo móvil (no mostrado), tales como el dispositivo 1450. Cada uno de dichos dispositivos puede contener uno o más de los dispositivos 1400, 1450 de ordenador, y un sistema completo puede estar compuesto por múltiples dispositivos 1400 1450 de ordenador, que se comunican entre sí.

El dispositivo 1450 de ordenador incluye un procesador 1452, memoria 1464, un dispositivo de entrada/salida tal como una pantalla 1454, una interfaz 1466 de comunicación y un transceptor 1468, entre otros componentes (por ejemplo, un escáner, un lector óptico, un fluorescente detector de señal). El dispositivo 1450 también puede estar provisto de un dispositivo de almacenamiento, tal como una microunidad u otro dispositivo, para proporcionar almacenamiento adicional. Cada uno de los componentes 1450, 1452, 1464, 1454, 1466 y 1468, están interconectados utilizando varios buses, y varios de los componentes se pueden montar en una placa base común o de otras maneras, según corresponda.

El procesador 1452 puede ejecutar instrucciones dentro del dispositivo 1450 de ordenador, que incluyen las instrucciones almacenadas en la memoria 1464. El procesador se puede implementar como un conjunto de chips que incluyen procesadores analógicos y digitales separados y múltiples. El procesador puede proporcionar, por ejemplo, la coordinación de los otros componentes del dispositivo 1450, como el control de las interfaces de usuario, las aplicaciones ejecutadas por el dispositivo 1450 y la comunicación inalámbrica por el dispositivo 1450.

El procesador 1452 se puede comunicar con un usuario a través de la interfaz 1458 de control y la interfaz 1456 de pantalla acoplada a una pantalla 1454. La pantalla 1454 puede ser, por ejemplo, una pantalla LCD TFT (pantalla de cristal líquido con transistor de película delgada) o un OLED (Pantalla de diodo emisor de luz orgánica) u otra tecnología de pantalla adecuada. La interfaz 1456 de pantalla puede comprender circuitos apropiados para conducir la pantalla 1454 para presentar información gráfica y de otro tipo a un usuario. La interfaz 1458 de control puede recibir comandos de un usuario y convertirlos para enviarlos al procesador 1452. Adicionalmente, se puede proporcionar una interfaz 1462 externa en comunicación con el procesador 1452, para permitir la comunicación de área cercana del dispositivo 1450 con otros dispositivos. La interfaz 1462 externa puede proporcionar, por ejemplo, comunicación por cable en algunas implementaciones, o comunicación inalámbrica en otras implementaciones, y también se pueden utilizar múltiples interfaces.

La memoria 1464 almacena información dentro del dispositivo 1450 de ordenador. La memoria 1464 se puede implementar como uno o más medios o medios legibles por ordenador, una unidad o unidades de memoria volátil, o una unidad o unidades de memoria no volátil. La memoria 1474 de expansión también se puede proporcionar y conectar al dispositivo 1450 a través de la interfaz 1472 de expansión, que puede incluir, por ejemplo, una interfaz de tarjeta SIMM (Módulo de memoria en línea individual). Dicha memoria 1474 de expansión puede proporcionar espacio de almacenamiento adicional para el dispositivo 1450, o también puede almacenar aplicaciones u otra información para el dispositivo 1450. Por ejemplo, la memoria 1474 de expansión puede incluir instrucciones para llevar a cabo o complementar los procesos descritos en este documento, y también puede incluir información segura. Por lo tanto, por ejemplo, la memoria 1474 de expansión se puede proporcionar como un módulo de seguridad para

el dispositivo 1450, y se puede programar con instrucciones que permitan el uso seguro del dispositivo 1450. Adicionalmente, se pueden proporcionar aplicaciones seguras a través de las tarjetas SIMM, junto con información adicional, tal como colocar información de identificación en la tarjeta SIMM de manera no pirateable.

La memoria puede incluir, por ejemplo, memoria flash y/o memoria NVRAM, como se discute a continuación. En una implementación, un producto de programa de ordenador se incorpora tangiblemente en un soporte de información. El producto del programa de ordenador contiene instrucciones que, cuando se ejecutan, realizan uno o más métodos, tales como aquellos descritos en este documento. El portador de información es un medio legible por ordenador o máquina, tal como la memoria 1464, la memoria 1474 de expansión, la memoria en el procesador 1452 o una señal propagada que puede recibirse, por ejemplo, a través del transceptor 1468 o la interfaz 1462 externa.

El dispositivo 1450 se puede comunicar de forma inalámbrica a través de la interfaz 1466 de comunicación, que puede incluir circuitos de procesamiento de señal digital cuando sea necesario. La interfaz 1466 de comunicación puede proporcionar comunicaciones bajo varios modos o protocolos, tales como llamadas de voz GSM, mensajes SMS, EMS o MMS, CDMA, TDMA, PDC, WCDMA, CDMA2000 o GPRS, entre otros. Dicha comunicación puede ocurrir, por ejemplo, a través del transceptor 1468 de radiofrecuencia. Adicionalmente, puede ocurrir una comunicación de corto alcance, tal como el uso de un Bluetooth, WiFi u otro transceptor (no mostrado). Adicionalmente, el módulo 1470 receptor GPS (Sistema de posicionamiento global) puede proporcionar datos inalámbricos adicionales relacionados con la navegación y la ubicación al dispositivo 1450, que pueden ser utilizados según corresponda por las aplicaciones que se ejecutan en el dispositivo 1450.

El dispositivo 1450 también se puede comunicar audiblemente utilizando el códec 1460 de audio, que puede recibir información hablada de un usuario y convertirla en información digital utilizable. El códec 1460 de audio también puede generar un sonido audible para un usuario, como a través de un altavoz, por ejemplo, en un teléfono del dispositivo 1450. Dicho sonido puede incluir sonido de llamadas telefónicas de voz, puede incluir sonido grabado (por ejemplo, mensajes de voz, archivos de música, etc.) y también puede incluir sonido generado por aplicaciones que operan en el dispositivo 1450.

El dispositivo 1450 de ordenador se puede implementar en varias formas diferentes, como se muestra en la figura. Por ejemplo, se puede implementar como un teléfono 1480 celular. También se puede implementar como parte de un teléfono 1482 inteligente, un asistente digital personal u otro dispositivo móvil similar.

Se pueden realizar diversas implementaciones de los sistemas y técnicas descritos en este documento en circuitos electrónicos digitales, circuitos integrados, ASIC especialmente diseñados (circuitos integrados específicos para aplicaciones), hardware, firmware, software y/o combinaciones de los mismos. Estas diversas implementaciones pueden incluir la implementación en uno o más programas de ordenador que son ejecutables y/o interpretables en un sistema programable que incluye al menos un procesador programable, que puede tener un propósito especial o general, acoplado para recibir datos e instrucciones de, y para transmitir datos e instrucciones para un sistema de almacenamiento, al menos un dispositivo de entrada y al menos un dispositivo de salida.

Estos programas de ordenador (también conocidos como programas, software, aplicaciones de software o código) incluyen instrucciones de máquina para un procesador programable, y se pueden implementar en un lenguaje de programación de alto nivel orientado a objetos y/o procedimientos, y/o en lenguaje de ensamble/máquina. Como se utiliza en este documento, los términos "medio legible por máquina" y "medio legible por ordenador" se refieren a cualquier producto, aparato y/o dispositivo de programa de ordenador (por ejemplo, discos magnéticos, discos ópticos, memoria y dispositivos lógicos programables (PLD)) utilizados para proporcionar instrucciones y/o datos de la máquina a un procesador programable, que incluye un medio legible por la máquina que recibe instrucciones de la máquina como una señal legible por la máquina. El término "señal legible por máquina" se refiere a cualquier señal utilizada para proporcionar instrucciones de máquina y/o datos a un procesador programable.

Para proporcionar interacción con un usuario, los sistemas y técnicas descritos en este documento se pueden implementar en un ordenador que tiene un dispositivo de visualización (por ejemplo, un monitor CRT (tubo de rayos catódicos) o LCD (pantalla de cristal líquido) para mostrar información al usuario y un teclado y un dispositivo señalador (por ejemplo, un mouse o una bola de seguimiento) mediante el cual el usuario puede proporcionar información al ordenador. También se pueden utilizar otros tipos de dispositivos para proporcionar interacción con un usuario; por ejemplo, la retroalimentación proporcionada al usuario puede ser cualquier forma de retroalimentación sensorial (por ejemplo, retroalimentación visual, retroalimentación auditiva o retroalimentación táctil); y la entrada del usuario se puede recibir de cualquier forma, que incluye la entrada acústica, de voz o táctil.

Los sistemas y técnicas descritos en este documento se pueden implementar en un sistema de ordenador que incluye un componente de fondo (por ejemplo, como un servidor de datos), o que incluye un componente de middleware (por ejemplo, un servidor de aplicaciones), o que incluye un componente de extremo frontal (por ejemplo, un ordenador cliente que tiene una interfaz gráfica de usuario o un navegador web a través del cual un usuario puede interactuar con una implementación de los sistemas y técnicas descritos en este documento), o cualquier combinación de dichos componentes de extremo posterior, middleware o extremo frontal. Los componentes del sistema pueden interconectarse mediante cualquier forma o medio de comunicación de datos



digitales (por ejemplo, una red de comunicación). Los ejemplos de redes de comunicación incluyen una red de área local ("LAN"), una red de área amplia ("WAN") e Internet.

El sistema de ordenador puede incluir clientes y servidores. Un cliente y un servidor generalmente están alejados entre sí y generalmente interactúan a través de una red de comunicación. La relación del cliente y el servidor surge en virtud de los programas de ordenador que se ejecutan sobre los respectivos ordenadores y que tienen una relación cliente-servidor entre sí.

En algunos casos, un sistema de ordenador proporcionado en este documento se puede configurar para incluir uno o más analizadores de muestras. Se puede configurar un analizador de muestras para producir una pluralidad de señales sobre el ADN genómico de al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer. Por ejemplo, un analizador de muestras puede producir señales que sean capaces de ser interpretadas de una manera que identifique la naturaleza homocigótica o heterocigótica de los loci a lo largo de un cromosoma. En algunos casos, un analizador de muestras se puede configurar para llevar a cabo una o más etapas de un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación y se puede configurar para producir y/o capturar señales de dichos ensayos. En algunos casos, un sistema de ordenador proporcionado en este documento puede configurarse para incluir un dispositivo de ordenador. En dichos casos, el dispositivo de ordenador puede configurarse para recibir señales de un analizador de muestras. El dispositivo de ordenador puede incluir instrucciones ejecutables por ordenador o un programa de ordenador (por ejemplo, software) que contiene instrucciones ejecutables por ordenador para llevar a cabo uno o más de los métodos o etapas descritos en este documento. En algunos casos, dichas instrucciones ejecutables por ordenador pueden indicar a un dispositivo de ordenador que analice las señales de un analizador de muestras, de otro dispositivo de ordenador, de un ensayo basado en una matriz de SNP o de un ensayo basado en secuenciación. El análisis de dichas señales se puede llevar a cabo para determinar genotipos, homocigosidad en ciertos loci, regiones de homocigosidad, el número de regiones de LOH, para determinar el tamaño de las regiones de LOH, para determinar el número de regiones de LOH que tienen un tamaño o rango particular de tamaños, para determinar si una muestra es positiva o no para una LOH distintiva, para determinar el número de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas humanos, para determinar la probabilidad de una deficiencia en los genes BRCA1 y/o BRCA2, para determinar una probabilidad de una deficiencia en HDR, para determinar la probabilidad de que un paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento de cáncer en particular (por ejemplo, un régimen que incluya un agente que dañe el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, un inhibidor de PARP, o una combinación de los mismos), o para determinar una combinación de estos elementos.

En algunos casos, un sistema de ordenador proporcionado en el presente documento puede incluir instrucciones ejecutables por ordenador o un programa de ordenador (por ejemplo, software) que contiene instrucciones ejecutables por ordenador para formatear una salida que proporciona una indicación sobre el número de regiones de LOH, el tamaño de regiones de LOH, el número de regiones de LOH que tienen un tamaño o rango de tamaños particular, ya sea que una muestra sea o no positiva para una LOH distintiva, el número de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas humanos, una probabilidad de una deficiencia en genes BRCA1 y/o BRCA2, una probabilidad de una deficiencia en HDR, una probabilidad de que un paciente con cáncer responderá a un régimen particular de tratamiento del cáncer (por ejemplo, un régimen que incluye un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa I, radiación, un inhibidor de PARP, o una combinación de los mismos), o una combinación de estos elementos. En algunos casos, un sistema de ordenador proporcionado en el presente documento puede incluir instrucciones ejecutables por ordenador o un programa de ordenador (por ejemplo, software) que contiene instrucciones ejecutables por ordenador para determinar un régimen de tratamiento de cáncer deseado para un paciente en particular, basado al menos en parte en la presencia o ausencia de una LOH distintiva o en el número de Regiones de LOH Indicadoras.

En algunos casos, un sistema de ordenador proporcionado en el presente documento puede incluir un dispositivo de procesamiento previo configurado para procesar una muestra (por ejemplo, células de cáncer) de tal manera que se pueda realizar un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación. Los ejemplos de dispositivos de procesamiento previo incluyen, sin limitación, dispositivos configurados para enriquecer poblaciones de células para células de cáncer en lugar de células no cancerosas, dispositivos configurados para lisar células y/o extraer ácido nucleico genómico, y dispositivos configurados para enriquecer una muestra en particular fragmentos de ADN genómico.

Este documento también proporciona kits para evaluar muestras (por ejemplo, células de cáncer) como se describe en el presente documento. Por ejemplo, este documento proporciona kits para evaluar las células de cáncer por la presencia de una LOH distintiva o para determinar el número de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas humanos. Un kit proporcionado en el presente documento puede incluir sondas de SNP (por ejemplo, una matriz de sondas de SNP para llevar a cabo un ensayo basado en una matriz de SNP descrito en este documento) o cebadores (por ejemplo, cebadores diseñados para secuenciar regiones de SNP mediante un ensayo basado en secuenciación) en combinación con un producto de programa de ordenador que contiene instrucciones ejecutables por ordenador para llevar a cabo uno o más de los métodos o etapas descritas en este documento (por ejemplo, instrucciones ejecutables por ordenador para determinar el número de regiones de LOH que tienen un tamaño o rango de tamaños particular). En algunos casos, un kit proporcionado en este documento puede incluir al

menos 500, 1000, 10.000, 25.000 o 50.000 sondas de SNP capaces de hibridarse con regiones polimórficas de ADN genómico humano. En algunos casos, un kit proporcionado en este documento puede incluir al menos 500, 1000, 10.000, 25.000 o 50.000 cebadores capaces de secuenciar regiones polimórficas de ADN genómico humano. En algunos casos, un kit proporcionado en este documento puede incluir uno o más ingredientes para realizar un ensayo basado en una matriz de SNP o un ensayo basado en secuenciación. Los ejemplos de dichos otros ingredientes incluyen, sin limitación, tampones, secuenciación de nucleótidos, enzimas (por ejemplo, Polimerasas), etc. Este documento también proporciona el uso de cualquier número apropiado de los materiales proporcionados en este documento en la fabricación de un kit para llevar a cabo uno o más de los métodos o etapas descritos en este documento. Por ejemplo, este documento proporciona el uso de una colección de sondas de SNP (por ejemplo, Una colección de 10.000 a 100.000 sondas de SNP) y un producto de programa de ordenador proporcionado en este documento en la fabricación de un kit para evaluar las células de cáncer para la presencia de una LOH distintiva. Como otro ejemplo, este documento proporciona el uso de una colección de cebadores (por ejemplo, Una colección de 10.000 a 100.000 cebadores para secuenciar regiones de SNP) y un producto de programa de ordenador provisto en este documento en la fabricación de un kit para evaluar las células de cáncer para la presencia de una LOH distintiva.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 - Evaluación de regiones de LOH y HDR

Se utilizaron dos conjuntos de tumores de pacientes con cáncer de ovario avanzado. El primer conjunto de 94 tumores (conjunto de entrenamiento) se utilizó para derivar una signatura candidata, y el segundo conjunto de 40 tumores (conjunto de validación) se utilizó para validar la signatura. Todas las regiones codificantes de los genes BRCA1 y BRCA2 se secuenciaron para detectar la línea germinal y las mutaciones somáticas. Se midieron los niveles de expresión de ARNm de BRCA1 y BRCA2, y se realizaron micromatrices de SNP Affymetrix.

Se utilizó un programa de ordenador para reconstruir el estado de LOH distintiva basado en las intensidades de alelos derivadas de los datos de micromatrices. Se desarrolló e implementó un algoritmo como un programa de ordenador para reconstruir regiones de LOH basadas en datos de genotipo (por ejemplo, genotipo SNP).

Un punto del algoritmo fue reconstruir primero los números de copia específicos de alelo (ASCN) en cada locus (por ejemplo, SNP). Los ASCN son el número de copias de alelos maternos y paternos. Luego se determinó una región de LOH como un tramo de SNP con uno de los ASCN (paterno o materno) siendo cero. El algoritmo se basó en maximizar una función de probabilidad y fue conceptualmente análogo a un algoritmo descrito previamente diseñado para reconstruir el número total de copias (en lugar de ASCN) en cada locus (por ejemplo, SNP). Véase la Solicitud Internacional No. PCT/US2011/026098 otorgada a Abkevich et al. La función de probabilidad se maximizó sobre ASCN de todos los loci, el nivel de contaminación con tejido benigno, el número total de copias promediado en todo el genoma y el nivel de ruido específico de la muestra. Los datos de entrada para el algoritmo incluyeron (1) intensidades de señal normalizadas específicas de muestra para ambos alelos de cada locus y (2) conjunto de parámetros específicos de ensayo (específicos para diferentes matrices SNP y para enfoque basado en secuencias) definidos en base al análisis de grandes números de muestras con perfiles ASCN conocidos.

Los tumores se definieron como deficientes en HDR para el propósito de este análisis si tenían una o más mutaciones perjudiciales en los genes BRCA1 y/o BRCA2 o si tenían una baja expresión de ARNm de BRCA1. El resto de los tumores se definieron como probables HDR no deficientes para el propósito de este análisis.

Se investigó la distribución de las longitudes de las regiones de LOH (Figura 5). Se utilizaron tres categorías de regiones de LOH: (1) LOH que afecta a un cromosoma completo; (2) regiones de LOH grandes (mayores de aproximadamente 15 Mb), que normalmente afectan una parte de un brazo cromosómico o todo el brazo cromosómico; y (3) múltiples regiones de LOH cortas (menos de aproximadamente 15Mb). En segundo lugar, utilizando solo el conjunto de entrenamiento, se evaluó el número de regiones de LOH de una de estas tres categorías para detectar posibles correlaciones con la deficiencia de HDR. Se descubrió que (1) el número de regiones de LOH cortas no se correlacionaba significativamente con la deficiencia de HDR ( $p > 0.05$ ); (2) LOH que cubre un cromosoma completo correlacionado débilmente con deficiencia de HDR ( $p = 0.0011$ ); y (3) el número de regiones de LOH grandes se correlacionó significativamente con la deficiencia de HDR ( $p = 1.9e-8$ ). Más específicamente, se descubrió que todos los tumores deficientes en HDR tenían un alto número de regiones de LOH grandes (por ejemplo, nueve o más), mientras que la mayoría de los tumores que probablemente no eran deficientes en HDR tenían un pequeño número de regiones de LOH grandes (Figura 6 -8). Era probable que los tumores que probablemente no fueran HDR no deficientes fueran de hecho HDR debido a otras alteraciones genéticas, excluyendo las mutaciones BRCA1 y BRCA2 y la baja expresión de ARNm. Además del número de regiones de LOH grandes, la longitud total de estas regiones también se correlacionó significativamente con la deficiencia de HDR.

Estos resultados se confirmaron con el conjunto de validación: (1) el número de regiones de LOH cortas no se

correlacionó significativamente con la deficiencia de HDR ( $p > 0.05$ ); (2) LOH que cubre un cromosoma completo correlacionado débilmente con deficiencia de HDR ( $p = 0.05$ ); y (3) el número de regiones de LOH grandes se correlacionó significativamente con la deficiencia de HDR ( $p = 3.9 \times 10^{-6}$ ).

Los 134 tumores se dividieron a partir de conjuntos combinados de datos de entrenamiento y validación en tres grupos: (1) BRCA deficiente si tenían una o más mutaciones perjudiciales en los genes BRCA1 y/o BRCA2 o si tenían una baja expresión de ARNm de BRCA1; (2) HDR deficiente/BRCA intacto si tienen 9 o más regiones de LOH grandes (mayor de 15 Mb pero menor que la longitud del cromosoma completo); (3) HDR intacta si tienen menos de 9 regiones de LOH grandes (mayor de 15 Mb pero menor que la longitud del cromosoma completo). Los resultados de este análisis se presentan en la Figura 9. Ésta muestra una alta frecuencia de deficiencia de BRCA y también de HDR que no se debe a la deficiencia de BRCA entre los tumores de ovario.

La Figura 10 muestra la distribución de regiones de LOH grandes (mayores de 15 Mb pero menores que la longitud del cromosoma completo) para diferentes tipos de estirpes celulares de cáncer. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras con dicho número de regiones de LOH grandes. La frecuencia de deficiencia de HDR (estirpes celulares con al menos 9 de dichas regiones de LOH grandes) es la más alta entre las estirpes celulares de cáncer de mama y esófago. No se observó deficiencia de HDR entre las estirpes celulares de cáncer de colon. Validando los hallazgos previos para tumores de ovario, se encontró que todas las estirpes celulares deficientes en BRCA también eran deficientes en HDR.

La Figura 11 muestra la distribución de regiones de LOH grandes (mayores de 15 Mb pero menores que la longitud del cromosoma completo) para el conjunto de datos de tumor de pulmón disponible públicamente (GSE19399 de Gene Expression Omnibus). Se observó que la frecuencia de deficiencia de HDR (definida como tener al menos 9 regiones de LOH grandes) es bastante grande entre los tumores de pulmón (39%).

En la Figura 12 se resumen los resultados del análisis de diferentes tumores y estirpes celulares. La frecuencia de la deficiencia de HDR definida como la fracción de muestras con al menos 9 regiones de LOH grandes (mayor de 15 Mb pero menor que la longitud del cromosoma completo) se presenta para varios tumores y estirpes celulares. Esta frecuencia es tan alta como 50% entre los tumores de ovario y no se observó en absoluto entre las estirpes celulares de cerebro y colon. Por lo tanto, parece que la deficiencia de HDR cumple una función importante para la mayoría de los cánceres.

## Ejemplo 2: Respuestas de toxicidad de quimioterapia

En la preparación de los experimentos de respuesta a la toxicidad de la quimioterapia, todas las estirpes celulares se cultivaron a 37°C más 5% de CO<sub>2</sub> en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm<sup>2</sup> (VWR International, Inc. Cat # 353136) y el medio de crecimiento recomendado. Antes de realizar cada experimento, cada estirpe celular se tripsinizó (Invitrogen Corporation Cat # 25200-056), se contó y sembró en Advanced RPMI 1640 (Invitrogen Corporation Cat # 12633-020), 3% de FBS, 1% de penicilina/estreptomina (Invitrogen Corporation Cat. # 15140-122) en 2500 células o 5000 células en 100 µL de medio por pozo de las columnas 2-12 de microplacas de poliestireno de 96 pozos con fondo transparente (Perkin Elmer Cat # 6005181), dejando la columna 1 con solo 100 µL por pozo de medio. Las placas sembradas con células se incubaron luego a 37°C más 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche.

Se prepararon dos soluciones madre activas de concentración final de fármacos diferentes. En los casos en que se requería 100% de DMSO para la solubilidad del fármaco, se utilizó Advanced RPMI 1640 como diluyente para la concentración más alta. Se utilizó Advanced RPMI 1640 más una cantidad predeterminada de DMSO igual al DMSO total en la solución madre activa de alta concentración para la baja concentración, con un máximo de 60% de DMSO para la concentración más baja. Esto se hizo para mantener las concentraciones de DMSO iguales en cada pozo y prevenir la muerte celular inespecífica como resultado de DMSO. La menor de las dos concentraciones de fármaco se colocó en una placa de ciclo de PCR de pared delgada de 96 pozos (Robbins Scientific Cat # 1055-00-0) en las filas A-D, columna 12, mientras que la concentración más alta se colocó en las filas E-H, columna 12, del mismo plato. Las diluciones en serie de 1:2 o 1:3 se realizaron de manera descendente desde la columna 12 a la 3, dejando las columnas 1 y 2 para utilizar sin células/sin fármaco y sin controles de fármacos. Esto permitió puntos de datos cuádruples para cada concentración de fármaco. Una vez que se completaron las diluciones, se transfirieron 5 µL de la placa de dilución al pozo correspondiente de la placa celular sembrada. Las placas que recibieron fármacos se incubaron a 37°C más 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 días o 6 días.

Después de un régimen de dosis de 3 días o 6 días, se realizaron ensayos ATPlite (Perkin Elmer cat # 6016941) en cada pozo de cada placa de acuerdo con el protocolo de ensayo ATPlite. Luego la luminiscencia se leyó en una máquina FUSION y se guardó como un archivo.CSV. Para cada combinación de estirpe celular y fármaco, se promediaron las cuatro réplicas del control sin fármaco y se dividieron entre 100 para crear un "factor de normalización" utilizado para calcular un porcentaje de supervivencia normalizado. El porcentaje de supervivencia normalizado para los controles sin fármacos fue del 100%. Las cuatro réplicas de los pozos de células más fármacos se promediaron y dividieron por el factor de normalización para cada concentración de fármaco. El porcentaje de supervivencia para cada concentración de fármaco, comenzando con una concentración igual a 0, se utilizó para

calcular un IC<sub>50</sub> utilizando un software patentado.

La Figura 13 muestra la respuesta a la quimioterapia para estirpes celulares de cáncer de mama y ovario. En el eje y se indican los valores de Log<sub>10</sub> (IC<sub>50</sub>) para diferentes fármacos de quimioterapia (camptotecina, así como los resultados promediados para compuestos de platino (oxaliplatino, cisplatino y carboplatino) o antraciclinas (doxorrubicina y epirubicina) cuando se exponen a 29 estirpes celulares de cáncer de mama así como Log<sub>10</sub> (IC<sub>50</sub>) de paclitaxel cuando se expone a 27 estirpes celulares de cáncer de ovario. En el eje x, el número de regiones de LOH grandes más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo están indicadas para estas estirpes celulares. Las líneas discontinuas colocan un número de umbral en nueve.

La Figura 14 es una versión de un gráfico de la Figura 13 que indica especificidad y sensibilidad entre respondedores y no respondedores al tratamiento con compuestos de platino (oxaliplatino, cisplatino y carboplatino) cuando se exponen a 29 estirpes celulares de cáncer de mama. Las líneas discontinuas colocan un número umbral de regiones de LOH grandes más largas que 15 Mb y más cortas que el cromosoma completo en nueve. La línea continua divide las estirpes celulares en respondedores y no respondedores.

### Ejemplo 3 - Validación adicional del ensayo de deficiencia de HR

#### Materiales y métodos

##### *Muestras de tumor de ovario*

Se utilizaron tres cohortes independientes de cáncer de ovario humano. 1: 152 muestras de cáncer de ovario no seleccionadas. 2: 53 tumores ováricos serosos de alto grado. 3: Los datos disponibles públicamente de 435 muestras de cáncer de ovario seroso para los cuales se disponía de información completa se descargaron del sitio web de la Red Cancer Genome Atlas (TCGA el 31 de octubre de 2011. Todas las cohortes se obtuvieron bajo los protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional (IRB). Las características del paciente y del tumor se muestran en la Tabla 2. Se utilizaron diferentes números de muestras en los ensayos descritos (Tabla 3).

**Tabla 2. Características del paciente y del cáncer.**

	Primera cohorte	Segunda cohorte	Tercera cohorte
<b>Número total de pacientes</b>	152	53	435
<b><u>Edad al diagnóstico</u></b>			
Rango	37 - 88	38 - 77	30 - 89
Mediana	59	56	59
No conocida	4 (2.6%)	0	0
<b><u>Tiempo de seguimiento</u></b>			
Rango	20 - 5570	213 - 3294	8 - 5480
Mediana	1127	701	874
No conocida	5 (3.2%)	0	2 (0.46%)
<b><u>Estado</u></b>			
1	9 (5.9%)	0	6 (1.38%)
2	14 (9.2%)	0	21 (4.83%)
3	107 (70.4%)	46 (86.8%)	338 (77.70%)
4	21 (13.8%)	7 (13.2%)	69 (15.86%)
No conocido	1 (0.7%)	0	1 (0.23%)
<b><u>Histología</u></b>			
Serosa	133 (87.5%)	40 (75.5%)	435 (100.00%)
No serosa	8 (5.3%)	4 (7.6%)	0
Mezclada	10 (6.6%)	1 (1.9%)	0
No conocida	1 (0.7%)	8 (15.1%)	0
<b><u>Grado</u></b>			
1	8 (5.3%)	1 (1.9%)	2 (0.46%)
2	18 (11.8%)	12 (22.6%)	50 (11.49%)
3	126 (82.9%)	40 (75.5%)	373 (85.75%)
4	0	0	1 (0.23%)
No conocido	0	0	8 (1.84%)
<b><u>Enfermedad residual después de cirugía</u></b>			
0	9 (5.9%)	0	84 (19.31%)
<=1 cm	95 (62.5%)	44 (83%)	200 (45.98%)
> 1 cm	40 (26.3%)	9 (17%)	102 (23.45%)
No conocida	8 (5.3%)	0	49 (11.26%)

(continuación)

	Primera cohorte	Segunda cohorte	Tercera cohorte
<b>Número total de pacientes</b>	<b>152</b>	<b>53</b>	<b>435</b>
<b>Cirugía</b>			
Si	152 (100%)	53 (100%)	386 (88.74%)
No	0	0	0
No conocida	0	0	49 (11.26%)
<b>Quimioterapia</b>			
Si	139 (91.5%)	52 (98.1%)	399 (91.72%)
Con base en platino (cis o carboplatino) (sin taxano)	12 (7.9%)	1 (1.9%)	NA
Con base en platino más Taxano (paclitaxel o docetaxel)	128 (83.6%)	51 (96.2%)	NA
No	7 (4.6%)	0	23 (5.29%)
No conocida	6 (4%)	1 (1.9%)	13 (2.99%)

**Tabla 3. Número de muestras utilizadas en cada ensayo.**

	Cohorte 1		Cohorte 2	
Ensayo	Número de muestras	El ensayo de razón no se aplicó a todas las muestras	Número de muestras	El ensayo de razón no se aplicó a todas las muestras
Matrices de SNP Affymetrix 500K	152	no aplicable	53	no aplicable
Secuenciación de tumor de BRCA1 y BRCA2	150	secuenciación falló	52	secuenciación falló
Secuenciación de la línea germinal de BRCA1 y BRCA2	19	tejido normal no disponible o no se detectó mutación en el tumor	11	tejido normal no disponible o no se detectó mutación en el tumor
CCP y BRCA1 qPCR	137	tejido insuficiente para la extracción de ARN	53	no aplicable
Análisis de metilación de BRCA1 y BRCA2	126	ADN insuficiente para el análisis	34	ADN insuficiente para el análisis
Otro análisis de metilación del gen HR	92	ADN insuficiente para el análisis	0	ADN insuficiente para el análisis

## 5 Estirpes celulares

Se analizaron 67 estirpes celulares de cáncer (29 de ovario, 34 de mama, 3 de colon, 1 de páncreas). Se obtuvieron tres estirpes celulares de cáncer de mama de DSMZ (Braunschweig, Alemania). Las estirpes celulares de cáncer de mama, colon, pancreático y restantes se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA). Se cultivaron estirpes celulares de cáncer en medio RPMI + FBS al 10% + medio penicilina/estreptomicina al 1% a 37°C en matraces T75 hasta ~5x10<sup>6</sup> de densidad celular. Las excepciones fueron las estirpes celulares que requerían medios no estándar, L-glutamina o insulina. Las células cultivadas en suspensión se centrifugaron durante 5 minutos a 1700 rpm en un tubo de centrífuga de 1.5 mL y se desechó el sobrenadante. Las células cultivadas en una monocapa se eliminaron por aspiración, se lavaron con PBS y se agregó solución de tripsina. Después de que las células se separaron, se recogieron en medio, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 1700 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Las células aisladas se resuspendieron en 200 µL de PBS.

### Extracción de ADN genómico y ARN total de tumores congelados y estirpes celulares.

Se cortaron y macrodisecionaron secciones congeladas de 10 µm. El tejido se homogeneizó (TissueRuptor (Qiagen)) después de la adición del reactivo de lisis QIAzol, seguido de aislamiento de ARN utilizando un Kit Qiagen miRNAeasy Mini según el protocolo del fabricante. Se utilizó un Kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) para aislar el ADN según el protocolo del fabricante con una incubación de lisis durante la noche a 56°C y el tratamiento con RNasa A.

## 25 Secuenciación de BRCA1 y BRCA2

La secuenciación de BRCA1 y BRCA2 se realizó como se describe en Hennessy et al., 2010. Las mutaciones identificadas solo se incluyeron en los análisis si se clasificaron como nocivas o sospechosas de nocivas con base en los criterios descritos previamente (Beaudet y Tsui, 1993).

30

*Ensayos de metilación del promotor qPCR*

El sistema de matriz de PCR de metilación de ADN de metil-Profiler (SABiosciences) se utilizó para cuantificar los niveles de metilación siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizaron enzimas de restricción dependientes de metilación y dependientes de metilación de ADN para digerir selectivamente ADN genómico no metilado o metilado, respectivamente. El ADN posterior a la digestión se cuantificó mediante PCR en tiempo real utilizando cebadores que flanquean las regiones de interés. Las concentraciones relativas de ADN metilado diferencialmente se determinan al comparar la cantidad de cada digestión con la de una digestión simulada.

*Ensayo de secuenciación de metilación de promotor*

Se incubaron 50 - 300 ng de ADN durante ~5 horas a 60°C con elevaciones breves a 95°C bajo condiciones ácidas en presencia de bisulfito. Después de la incubación, la reacción se unió a una columna de centrifugación y se lavó bajo condiciones básicas para eliminar el bisulfito, luego el ADN convertido se eluyó en 15 µL. La región en minúscula de los cebadores es específica de la región genómica que se está amplificando. La región en mayúsculas de los cebadores corresponde a las colas químicas de titanio 454 y un código de barras de 4 pb (últimas 4 bases antes de las bases específicas de la región). Al combinar los cebadores directo e inverso en múltiples combinaciones, es posible multiplexar hasta 100 muestras en una reacción de secuencia única.

*Ensayos de expresión de signatura de progresión de ciclo celular y BRCA1*

El ARN se trató con desoxirribonucleasa de grado de amplificación I (Sigma-Aldrich Inc.) según el protocolo del fabricante con un tiempo de incubación prolongado de 30 minutos. La transcripción inversa se realizó utilizando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante.

Las preamplificaciones replicadas se realizaron de forma independiente utilizando el protocolo del Kit Taqman PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen de reacción de 5 µL. Para la preamplificación, las repeticiones se realizaron a 8 y 18 ciclos respectivamente para ensayos de genes del ciclo celular. Se realizaron tres réplicas de preamplificación a 18 ciclos solo para ensayos BRCA1. Los productos posteriores a la amplificación se diluyeron 1:5 en Tris-EDTA (TE) con bajo EDTA. Luego se realizó reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) y evaluó en matrices dinámicas de expresión génica M48 (Fluidigm, South San Francisco, CA) según el protocolo del fabricante. El método del umbral del ciclo comparativo ( $C_T$ ) se utilizó para calcular la expresión relativa del gen. Los  $C_T$  de preamplificación de diferentes números de ciclos se centraron en el promedio de los genes en la réplica que eran comunes entre todas las réplicas. Los valores resultantes se normalizaron primero por el promedio de  $C_T$  de los genes constitutivos y luego por el promedio de los  $C_T$  normalizados de cada ensayo en todas las muestras de la primera cohorte para producir  $\Delta\Delta C_T$ . La puntuación CCP y la expresión relativa de BRCA1 se calcularon como el promedio del negativo de los  $\Delta\Delta C_T$  de los genes del ciclo celular y los ensayos BRCA1, respectivamente.

*Identificación de muestras con pérdida de expresión de BRCA1:*

Las muestras en las que la expresión de CCP y la expresión de BRCA1 están anti-correlacionadas se definieron como deficientes en BRCA1. El umbral para identificar pacientes con expresión anormal de BRCA1 se definió utilizando una regresión lineal robusta en un gran conjunto de muestras de cáncer de ovario ( $n = 300$ ). La expresión de BRCA1 se hizo retroceder en la puntuación CCP utilizando mínimos cuadrados iterativamente ponderados (IWLS). Los puntos fuera del intervalo de predicción del 99% en el extremo inferior se consideraron anormales. Este método se describe con mayor detalle en la Solicitud Internacional No. PCT/US2011/054369 otorgada a Timms et al.

*Matrices Affymetrix 500K GeneChip*

El kit de ensayo Affymetrix GeneChip Mapping Nspl o Styl se utilizó en la generación de ADN biotinilado para hibridaciones de micromatrices Affymetrix Mapping 500K Nspl o Styl (cada ensayo se preparó por separado). El ADN genómico (250 ng) se digirió con la enzima de restricción Nspl o Styl y se agregaron adaptadores a los extremos del fragmento de restricción con ADN ligasa T4. Las muestras modificadas por adaptador se amplificaron por PCR utilizando Clontech Titanium Taq, que generó un producto amplificado de tamaño medio entre 200 y 1.100 pb. Los productos de amplificación se purificaron utilizando un kit de limpieza de amplificación de ADN Clontech. Se fragmentaron 90 µg de ADN purificado utilizando el reactivo de fragmentación Affymetrix. El marcado de biotina de la muestra fragmentada se realizó utilizando el reactivo de marcado de ADN GeneChip. El ADN marcado con biotina se hibridó en micromatrices Affymetrix Nspl o Styl a 49°C durante 16 a 18 horas en el horno de rotación Affymetrix. Después de la hibridación, se llevaron a cabo procedimientos de lavado y tinción de la matriz de sonda en las estaciones automáticas de fluidos Affymetrix según el manual del fabricante y se escanearon micromatrices y el Affymetrix GeneChip Scanner 3000 recopiló datos sin procesar.

*Análisis de CN y LOH de datos de micromatrices de SNP*

El algoritmo está diseñado para determinar el número de copia específico de alelo más probable en cada ubicación

de SNP. La probabilidad correspondiente tiene en cuenta explícitamente la contaminación de una muestra de ADN canceroso con ADN de células estromales no cancerosas. Un algoritmo similar para el análisis de CN se describe en detalle en la Solicitud Internacional No. PCT/US20111026098 otorgada a Abkevich et al. (publicación No. WO/2011/106541). El algoritmo utilizado en este documento se implementó en dos versiones, una para el análisis de los datos de la matriz Affymetrix 500K GeneChip generados internamente y la otra para el análisis de los datos de la matriz GenomeWideSNP6 Affymetrix descargados del sitio web TCGA (<http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm?diseaseType=OV>). La última matriz, además de las sondas de SNP, contiene una serie de sondas para ubicaciones no polimórficas en todo el genoma humano. Estas sondas son informativas para el análisis CN pero no son directamente informativas para el análisis de LOH.

#### *Análisis estadístico*

Los valores de p en este documento se calcularon utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov a menos que se especifique lo contrario.

#### Resultados

##### Tumores deficientes en HR

Una muestra tumoral se consideró deficiente en HR si tenía una línea germinal o mutación somática en BRCA1 o BRCA2, o metilación o baja expresión de ARNm de BRCA1. 31 de 152 muestras de la primera cohorte fueron portadoras de mutaciones en BRCA1 y/o BRCA2, junto con 14/53 de la segunda cohorte y 83/435 de la tercera cohorte (dos de las cuales fueron excluidos del análisis adicional, ver más abajo). Las mutaciones se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 4. Defectos de BRCA1, BRCA2 y RAD51C detectados en las cohortes del estudio.**

Cohorte	N	Mutación BRCA1 + BRCA2	Mutación BRCA1	Mutación BRCA2	Total	N	Metilación de RAD51 C	Metilación de RAD51C + mutación de BRCA1
1	152	1	23	8	32	89	2	1
2	53	0	11	3	14	ND	ND	ND
3	435	0	51	34 <sup>1</sup>	85 <sup>1</sup>	435	11	0

<sup>1</sup> - Dos de estas mutaciones se excluyeron del análisis porque una copia de BRCA2 permaneció intacta.

El grado de metilación se midió para las islas promotoras CpG de BRCA1 y BRCA2. Se observó metilación en múltiples muestras para BRCA1, pero no para BRCA2. 11 de 126 muestras de la primera cohorte, 3 de 34 de la segunda cohorte y 64 de 435 de la tercera cohorte se definieron como HR deficientes debido a los altos niveles de metilación del promotor BRCA1. No se observaron mutaciones perjudiciales de BRCA1 o BRCA2 en ninguna de estas muestras, excepto en una muestra de la tercera cohorte.

La baja expresión de ARNm de BRCA1 o BRCA2 también podría conducir a una deficiencia de HR, y ser el resultado de mecanismos distintos de la metilación del promotor. Los niveles de expresión de BRCA1 y BRCA2 se midieron para 137 muestras de la primera cohorte y 53 muestras de la segunda cohorte. La expresión de BRCA1 en 20 muestras fue anormalmente baja. Solo cinco muestras con una expresión anormalmente baja de BRCA1 no se marcaron como deficientes en HR debido a la metilación del promotor BRCA1. No se observó una expresión anormalmente baja para BRCA2.

Se requiere una única copia intacta de BRCA1 o BRCA2 para la funcionalidad. Para todas las muestras de BRCA1 deficientes, el gen BRCA1 está contenido dentro de una región de LOH. Adicionalmente, para todas menos las dos muestras de BRCA2 deficientes, el gen BRCA2 se observa dentro de una región de LOH. Estas dos muestras de BRCA2 deficientes no se consideraron deficientes en HR en nuestro análisis.

#### *Distribución de longitudes de regiones de LOH*

La hipótesis inicial era que las regiones con LOH de diferente longitud podrían aparecer en el genoma del cáncer a través de diferentes rutas, por lo que la asociación entre LOH y deficiencia de HR podría depender de la longitud de las regiones de LOH. La distribución de las longitudes de las regiones de LOH ajustadas en la longitud del brazo cromosómico en el que se han observado estas regiones de LOH se muestra en la Figura 16. Los cromosomas 13, 14, 15 y 22 se excluyeron porque los SNP no están disponibles para los brazos p de estos cromosomas. Se observaron tres características distintas en esta distribución. En primer lugar, hay muchas regiones de LOH cortas. En segundo lugar, hay una larga cola plana de regiones de LOH hasta la longitud de un solo brazo cromosómico. Pocas regiones de LOH cubren más de un brazo cromosómico pero menos que el cromosoma completo. Finalmente, hay un pico alto correspondiente a LOH en el cromosoma completo. La distribución observada es bastante diferente de la distribución similar obtenida para las variaciones CN (Beroukhi et al. 2010), esto sugiere que las variaciones CN y las regiones de LOH podrían surgir a través de diferentes mecanismos.

### Correlación entre muestras con deficiencia de HR y LOH

La primera cohorte de muestras se utilizó como la cohorte de “descubrimiento”. Se excluyeron las regiones de LOH en el cromosoma 17 del análisis porque en casi todas las muestras se observó LOH sobre este cromosoma, probablemente porque los genes importantes para la progresión del cáncer de ovario están en este cromosoma. Verificamos la correlación entre la deficiencia de HR y el número de regiones de LOH cortas (<15 Mb), el número de regiones de LOH largas (>15 Mb pero menos que el cromosoma completo) y el número de regiones de LOH que cubren cromosomas completos. Se pueden utilizar varios límites de longitud de la región de LOH diferentes y la influencia de este límite en la detección de la deficiencia de HR se explora en la Figura 19 y su discusión acompañante, aunque se encontró que 15 Mb son generalmente preferidos. No hubo correlación significativa entre el número de regiones de LOH cortas y la deficiencia de HR. El número de regiones de LOH que cubren el cromosoma completo fue significativamente mayor en tumores con BRCA1 o BRCA2 intactos ( $p=4 \times 10^{-5}$ ). El número de regiones de LOH largas (denominadas en adelante en este Ejemplo 3 y en todo este documento como “puntuación de HRD”) fue significativamente mayor en tumores con BRCA1 o BRCA2 deficientes ( $p=9 \times 10^{-11}$ ) (Figura 17a).

La segunda y tercera cohortes se utilizaron para validar los resultados obtenidos para la primera cohorte. La correlación entre la deficiencia de HR y el número de regiones de LOH que cubren cromosomas completos no se validó en la segunda cohorte, posiblemente debido a un número bajo de muestras, pero fue significativamente mayor ( $p=3 \times 10^{-11}$ ) entre los tumores con BRCA1 y BRCA2 intactos en la tercera cohorte. Se observó una correlación altamente significativa entre la puntuación de HRD y la deficiencia de HR para ambas cohortes ( $p=2 \times 10^{-7}$  y  $p=9 \times 10^{-30}$  respectivamente) con la puntuación de HRD claramente reducida entre los tumores de ovario con BRCA1 y BRCA2 intactos (Figuras 17b y 17c).

### Alteraciones en RAD51C y otros genes de la ruta de HR

Los datos disponibles sugieren que BRCA1 y BRCA2 son los genes principales responsables de la deficiencia de HR en el cáncer de ovario. Sin embargo, muchos otros genes también pueden ser importantes, por ejemplo, tanto RAD51C (Meindl et al., 2010) como RAD51D (Loveday et al., 2011) están recientemente implicados como genes de predisposición para el cáncer de ovario. El grado de metilación se midió para las islas CpG del promotor de ocho genes adicionales implicados en la ruta de HR (Tabla 5) en la primera cohorte. Solo RAD51C tenía altos niveles de metilación del promotor (3 de 89 muestras). En la tercera cohorte, 11 de 435 muestras tenían metilación del promotor RAD51C. Todas las muestras positivas para metilación RAD51C de ambas cohortes fueron homocigóticas en el locus RAD51C debido a LOH. Para evaluar si la puntuación de HRD es elevada en muestras con metilación del promotor RAD51C, estas muestras de ambas cohortes se compararon con muestras intactas de BRCA sin metilación RAD51C. De acuerdo con nuestras observaciones para los genes BRCA1 y BRCA2, la puntuación de HRD fue significativamente mayor ( $p = 0.0003$ ) entre las muestras con metilación RAD51C.

Tabla 5. Ensayos de metilación del promotor utilizados (SABiosciences).

Símbolo del gen	Descripción	ID del catálogo del ensayo
MDC1	Mediador o punto de control de daños en el ADN 1	MePH08721-2A
PARP1	Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1	MePH02379-2A
BRCA1	Cáncer de seno 1, inicio temprano	MePH28472-1A
BRCA2	Cáncer de seno 2, inicio temprano	MePH28473-1A
RAD50	RAD50 homólogo	MePH28350-1A
RAD51C	RAD51 homólogo C	MePH22389-1A
PALB2	Socio y localizador de BRCA2	MePH28516-1A
CHEK2	punto de regulación CHK2 homólogo	MePH28264-1A
ATM	Ataxia telangiectasia mutada	MePH28470-1A
RAD51	RAD51 homólogo	MePH19071-2A

En la tercera cohorte, se han informado mutaciones perjudiciales y metilación de genes de la ruta de HR (TCGA, 2011). Las mutaciones se examinaron y el análisis se limitó a defectos con una alta probabilidad de ser perjudiciales (por ejemplo, mutaciones sin sentido y de cambio de marco), lo que resulta en un total de 8 mutaciones perjudiciales en 6 genes (ATM, ATR, FANCA, FANCD2, FANCM y PALB2). Unas 5 muestras adicionales tenían metilación de los genes de la ruta de HR. La pérdida del segundo alelo se detectó en solo 1 de las 13 muestras (una mutación sin sentido FANCM). Dado que se necesita la desactivación de ambos alelos para perder la función de un supresor tumoral, se espera que la mayoría de estas 13 muestras tengan HR intacta. No es sorprendente que la puntuación de HRD no fuera elevada en la mayoría de estas muestras.

### Análisis de datos combinados

La correlación entre la puntuación de HRD y la deficiencia de HR (definida como deficiencia de BRCA1, BRCA2 o RAD51C) para las tres cohortes se presenta en la Figura 17d. Se observa una asociación altamente significativa



( $p=2 \times 10^{-54}$ ).

Una pregunta importante es si la distribución de las puntuaciones de HRD es la misma para la deficiencia de HR debido a diferentes loci genómicos. Para responder a esto, las distribuciones de las puntuaciones de HRD para los tumores deficientes en BRCA1, BRCA2 y RAD51C se analizaron por separado (Figura 21). Se observó una diferencia significativa ( $p=7 \times 10^{-5}$ ) con muestras de BRCA1 deficientes que tienen una puntuación de HRD promedio más alta (16.1; SD=4.3) que las muestras de BRCA2 deficientes (13.0; SD=3.9). Las diferencias en las puntuaciones de HRD entre BRCA1 o BRCA2 y RAD51C (14.5; SD=5.1) no fueron significativas.

El tejido normal estaba disponible en algunas muestras de las dos primeras cohortes y en todas las muestras de la tercera cohorte, esto se utilizó para determinar si las mutaciones en BRCA1 y BRCA2 eran germinales o somáticas. No existe una diferencia significativa para la línea somática frente a la línea germinal en las distribuciones de las puntuaciones de HRD para la deficiencia de BRCA1 o BRCA2 (Figura 20).

#### *Puntuación de HRD en estirpes celulares deficientes en BRCA1 y BRCA2*

Las estirpes celulares de mama no seleccionadas ( $n=34$ ) y ovario ( $n=29$ ) se obtuvieron de múltiples fuentes; Adicionalmente, se analizaron 3 estirpes celulares de colon y una pancreática de NCI60 con el estado de BRCA1 y BRCA2 publicado. De estas 67 estirpes celulares, siete portaban mutaciones perjudiciales homocigóticas o tenían metilación del promotor BRCA1, dos tenían mutaciones homocigóticas con reversión funcional aparente y seis portaban mutaciones heterocigotas. La Figura 18a muestra las distribuciones de las puntuaciones de HRD para estos tres grupos de mutantes, así como para las muestras de tipo silvestre. Las distribuciones de las puntuaciones de HRD entre los tumores de ovario de tipo silvestre y las estirpes celulares de cáncer de tipo silvestre no son significativamente diferentes. La distribución de las puntuaciones de HRD entre las estirpes celulares de cáncer con mutaciones heterocigotas es similar a las estirpes celulares de cáncer de tipo silvestre, presumiblemente porque las células se vuelven deficientes en HR solo cuando ambas copias de BRCA1 o BRCA2 no son funcionales. Para las estirpes celulares de cáncer con pérdida funcional de ambas copias de BRCA1 o BRCA2, se observan puntuaciones más altas de HRD, similares a las puntuaciones de HRD observadas para tumores de ovario con genes deficientes en BRCA1, BRCA2 o RAD51C. Las puntuaciones de HRD también son altas para las estirpes celulares de cáncer con reversión de las mutaciones de BRCA1 y BRCA2. Esto apoya la hipótesis original de que la deficiencia de HR produce cambios irreversibles en LOH. La diferencia de la distribución de las puntuaciones de HRD en estirpes celulares mutantes de tipo silvestre o heterocigotas, y la distribución de las puntuaciones de HRD en estirpes celulares con mutaciones homocigotas (con o sin reversión) o la metilación del promotor BRCA1 es altamente significativa ( $p=10^{-5}$ ). Es importante destacar que existe una correlación significativa entre la puntuación de HRD y la deficiencia de BRCA1 y BRCA2 después de excluir las estirpes celulares de cáncer de ovario del conjunto de datos ( $p=0.01$ ), lo que sugiere que la asociación de la puntuación de HRD con la deficiencia de HR no se limita al cáncer de ovario.

#### *Correlación entre la deficiencia de HR y la supervivencia general (SG) y la supervivencia libre de progresión (PFS)*

Se observó una correlación significativa entre PFS ( $p=0.03$ ) y OS ( $p=6 \times 10^{-5}$ ) para la tercera cohorte con mejor supervivencia para pacientes con puntuaciones de HRD más altas (Figura 18b). Los valores de  $p$  se calcularon utilizando el modelo de Cox. Los resultados están de acuerdo y amplían los datos reportados previamente que muestran que las mutaciones de la línea germinal en BRCA1 y BRCA2 están asociadas con mejores resultados para el cáncer de ovario (Rubin et al., 1996, Boyd et al., 2000; Cass et al., 2003; Tan et al., 2008, Hennessy et al., 2010.).

#### Discusión

La puntuación de HRD se validó en dos conjuntos de datos de cáncer de ovario independientes, y también reflejó mutaciones que resultan en deficiencia de HR en estirpes celulares de mama y pancreáticas.

**Tabla 6. Promedio de la puntuación de HRD para tumores deficientes e intactos en BRCA1 y BRCA2 y los valores de  $p$  correspondientes.**

	HR deficiente (BRCA1 y BRCA2)	HR intacta (BRCA1 y BRCA2)	HR deficiente (BRCA1, BRCA2 y RAD51C)	HR intacta (BRCA1, BRCA2 y RAD51C)
Primera cohorte	15.9 (SD = 4.6)	8.3 (SD = 6.1)	16.2 (SD = 4.9)	8.0 (SD = 5.8)
	$p = 9 \times 10^{-11}$		$p = 7 \times 10^{-12}$	
Segunda cohorte	15.6 (SD = 4.4)	5.6 (SD = 4.9)	15.6 (SD = 4.4)	5.6 (SD = 4.9)
	$p = 2 \times 10^{-7}$		$p = 2 \times 10^{-7}$	
Tercera cohorte	15.3 (SD = 4.3)	8.8 (SD = 5.0)	15.1 (SD = 4.3)	8.6 (SD = 5.0)
	$p = 9 \times 10^{-30}$		$p = 2 \times 10^{-32}$	
Datos combinados para tres cohortes	15.5 (SD = 4.4)	8.4 (SD = 5.3)	15.4 (SD = 4.4)	8.2 (SD = 5.2)
	$p = 10^{-45}$		$p = 2 \times 10^{-54}$	

(continuación)

	HR deficiente (BRCA1 y BRCA2)	HR intacta (BRCA1 y BRCA2)	HR deficiente (BRCA1, BRCA2 y RAD51C)	HR intacta (BRCA1, BRCA2 y RAD51C)
Estirpes celulares de cáncer	19.7 (SD = 4.6)	8.2 (SD = 5.4)	19.7 (SD = 4.6)	8.2 (SD = 5.4)
	$p = 10^{-5}$		$p = 10^{-5}$	

Una clase intermedia de tamaños de LOH mayor que 15 Mb pero menor que un cromosoma completo está altamente correlacionada positivamente con genes defectuosos de HR, lo que sugiere que la mayoría, si no todos, de este tipo de clase de LOH existe porque incorpora rupturas de ADN de doble cadena como parte de su génesis y requiere reparación por HR. Por el contrario, la LOH al nivel del cromosoma completo es significativamente menos frecuente en los tumores deficientes en HR. Una posible explicación es que LOH al nivel del cromosoma completo se origina a través de un mecanismo competitivo alternativo que no involucra rupturas de ADN de doble cadena.

Además de los defectos BRCA1 y BRCA2, se observa la metilación del promotor RAD51C en tumores de ovario. La puntuación alta de HRD se asoció significativamente con la deficiencia de RAD51C en dos conjuntos de datos. Solo se confirmó un tumor adicional deficiente en HR en los 3 conjuntos de datos, una mutación sin sentido en FANCM con LOH que resultó en la pérdida del segundo alelo. La puntuación de HRD asociada con la mutación FANCM (8) está dentro del rango de la distribución normal para muestras con puntuación de HRD elevada.

Entre los tumores con BRCA1, BRCA2 y RAD51C aparentemente intactos, una fracción sustancial de las muestras tiene una puntuación de HRD elevada. Una posible explicación es que hay una tasa sustancial de defectos en otros genes en la ruta de HR en muchas de estas muestras. Una explicación alternativa es que la contaminación del tumor con tejido normal complica la detección de defectos. Los datos sugieren que la puntuación de HRD es menos sensible a la contaminación que otros ensayos, y que los defectos no detectados pueden explicar una fracción significativa de aquellas muestras con puntuación de HRD elevada (ver Resultados Complementarios).

Los estudios publicados han demostrado que las mutaciones de reversión secundaria que restauran la función BRCA2 pueden surgir en estirpes celulares mutantes BRCA2 después de la exposición a agentes de platino (Sakai et al., 2009; Sakai et al., 2008; Edwards et al., 2008). Norquist et al. (2011) observaron que aproximadamente el 28% de los tumores recurrentes tenían una mutación secundaria que restauraba la función BRCA. Las mutaciones de reversión se observaron principalmente en individuos con exposición previa a agentes de platino y fueron predictivas de resistencia al platino. La puntuación de HRD resulta de defectos acumulativos que ocurren en el genoma del tumor. Es probable que los marcadores de deficiencia de HR basados en el ADN estén fuertemente asociados con la deficiencia de HR porque están funcionalmente vinculados a ella. En consecuencia, la puntuación de HRD es una medida muy sólida de la deficiencia de HR. Sin embargo, su permanencia significa que la puntuación probablemente no sea sensible a las mutaciones de reversión. Las muestras posteriores al tratamiento no estaban disponibles en los tumores utilizados en este estudio, sin embargo, los datos obtenidos de las estirpes celulares son consistentes con esta hipótesis. Si no se detectan mutaciones de reversión, se obtendrán falsos positivos. Es probable que esto afecte muy pocos tumores en el entorno neoadyuvante o adyuvante (Norquist et al., 2011) y es menos preocupante que los falsos negativos que identificarían incorrectamente a los individuos como posibles no respondedores.

La puntuación alta de HRD está altamente correlacionada con la deficiencia de HR, y esta puntuación se puede utilizar para identificar pacientes con alta probabilidad de responder a agentes que dañan el ADN e inhibidores de PARP (entre otros agentes). Dicha prueba tiene una clara utilidad clínica en el cáncer de mama y de ovario, y se puede utilizar para expandir el uso de PARPi y sales de platino a otros tipos de cáncer donde la deficiencia de HR está menos bien caracterizada.

#### **Ejemplo 4 - Validación adicional de ensayo de deficiencia de HR**

##### Materiales y métodos

La cohorte de pacientes analizada en este ejemplo incluyó 56 pacientes con cáncer de mama, todos ellos con mutación BRCA positiva o con cáncer de mama triple negativo (la mayoría son TNBC). Se incluyeron las etapas I - III (la mayoría son II o III). Los pacientes recibieron 6 ciclos de gemcitabina neoadyuvante + iniparib + carboplatino. La respuesta se midió como una carga residual de cáncer relativamente más baja después del tratamiento.

Se analizaron 56 tumores de mama congelados frescos. El grado medio de contaminación es del 60%. Nueve muestras tenían contaminación de al menos 90%. 11 de estos tumores eran portadores de mutaciones perjudiciales BRCA1 y tres eran portadores de mutaciones perjudiciales BRCA2. En todos estos tumores había LOH en los genes perjudiciales. Uno de los portadores de mutaciones perjudiciales BRCA1 también portaba una mutación perjudicial en BRCA2. Sin embargo, en esa muestra no había LOH en el gen BRCA2.

Se obtuvieron 30 muestras de pacientes que respondieron al tratamiento (carga residual de cáncer 0 o 1). 13 de ellos son deficientes en BRCA1/2. Se obtuvieron 26 muestras de pacientes que no respondieron (carga residual de

cáncer 2 o 3). Uno de ellos es deficiente en BRCA1. El análisis de genotipado fue realizado por Affymetrix utilizando matrices Affymetrix MIP (como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,858,412; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. US20060234264; Hardenbol et al., Nature Biotechnology (2003) 21: 673-678; Wang et al., BMC Med Genomics (2009) 2: 8; cada uno de los cuales se incorpora por referencia en su totalidad). Las puntuaciones de HRD se calcularon como se describió anteriormente.

#### Resultados

La puntuación de HRD media para los respondedores fue de 16,5. La puntuación de HRD promedio para BRCA1/2 intacto y para respondedores deficientes en BRCA1/2 fue el mismo. La puntuación promedio de HRD para los que no respondieron fue de 11,4. La puntuación de HRD promedio para los no respondedores intactos BRCA1/2 es 11,6 y para los no respondedores deficientes en BRCA1 fue 8. De acuerdo con el valor p de la prueba U de Mann-Whitney, la asociación entre la respuesta al tratamiento y la puntuación de HRD fue 0.004. Si se excluyen las muestras de BRCA1 deficientes/2, la asociación entre la respuesta al tratamiento y la puntuación de HRD sigue siendo significativa (valor p = 0.02).

Las diferencias en la puntuación de HRD entre las muestras con carga residual de cáncer 0 y 1 no fueron significativas. Del mismo modo, las diferencias en la puntuación de HRD entre las muestras con carga residual de cáncer 2 y 3 no fueron significativas. Las correlaciones entre la respuesta al tratamiento y los parámetros clínicos (etapa, grado) no fueron significativas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, y/o un inhibidor PARP, dicho método comprende:

determinar, en una célula de cáncer, el número total de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de dicha célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que dicha primera longitud es de aproximadamente 11 o más megabases, en la que la célula de cáncer es una célula de cáncer primaria de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago; y correlacionar dicho número total que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a dicho régimen de tratamiento contra el cáncer en el que dicho número de referencia es 10 o mayor.

2. Un método para predecir una respuesta de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento que incluye paclitaxel o docetaxel, que comprende:

determinar, en una célula de cáncer, el número total de regiones de LOH en al menos un par de cromosomas humanos de dicha célula de cáncer que son más largas que la primera longitud pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene la región de LOH, en la que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es un par de cromosomas sexuales X/Y humanos, en la que dicha primera longitud es de aproximadamente 11 o más megabases, en la que la célula de cáncer es una célula de cáncer primaria de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago; y correlacionar dicho número total que es mayor que un número de referencia con una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer no responderá a un régimen de tratamiento que incluye paclitaxel o docetaxel en el que dicho número de referencia es 10 o mayor.

3. Agentes que dañan el ADN, antraciclinas, los inhibidores de topoisomerasa I e inhibidores PARP para uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente en el que se ha determinado que el paciente tiene una mayor probabilidad de respuesta a dicho tratamiento mediante el método de la reivindicación 1 o 2.

4. Un sistema para determinar el estado de LOH de una célula de cáncer de un paciente con cáncer, que comprende:

(a) un analizador de muestras configurado para producir una pluralidad de señales sobre el ADN genómico,

en el que dichas señales identifican la naturaleza homocigota o heterocigótica del loci de al menos un par de cromosomas humanos de dicha célula de cáncer, y en el que la célula de cáncer es una célula de cáncer primaria de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago, y

(b) un subsistema de ordenador programado para calcular, con base en dicha pluralidad de señales, el número de Regiones de LOH Indicadoras en dicho al menos un par de cromosomas humanos,

en el que dichas Regiones de LOH Indicadoras son regiones de LOH que están en un par de cromosomas humanos diferentes al par de cromosomas sexuales X/Y humanos, y se caracterizan por LOH con una longitud de aproximadamente 11 o más megabases pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene las regiones de LOH, y en el que dicho subsistema de ordenador se programa para comparar dicho número de Regiones de LOH Indicadoras con un número de referencia para determinar una probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, o un inhibidor PARP en el que dicho número de referencia es 10 o mayor.

5. Un kit de diagnóstico que comprende:

(a) al menos 500 oligonucleótidos capaces de hibridar a una pluralidad de loci polimórficos de ADN genómico humano; y

(b) un producto de programa de ordenador programado para calcular, con base en una pluralidad de señales que identifican la naturaleza homocigota o heterocigota de dicho loci, el número de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas humanos de una célula de cáncer,

en el que dichas Regiones de LOH Indicadoras son regiones de LOH que están en un par de cromosomas humanos diferentes al par de cromosomas sexuales X/Y humanos, y se caracterizan por LOH con una longitud de aproximadamente 11 o más megabases pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene las regiones de LOH, y en el que dicho producto de programa de ordenador se programa para

comparar dicho número de Regiones de LOH Indicadoras con un número de referencia para determinar una probabilidad de que un paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, o un inhibidor PARP en el que dicho número de referencia es 10 o mayor, y en el que la célula de cáncer es una célula de cáncer primaria de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago.

6. Uso de una pluralidad de oligonucleótidos capaces de hibridar a una pluralidad de loci polimórficos separados de ADN genómico humano para

(a) determinar el número total de Regiones de LOH Indicadoras en al menos un par de cromosomas de una célula de cáncer humana obtenida de un paciente con cáncer, en la que cada oligonucleótido hibrida a un locus polimórfico específico, y

en el que dichas Regiones de LOH Indicadoras son regiones de LOH que están en un par de cromosomas humanos diferentes al par de cromosomas sexuales X/Y humanos, y se caracterizan por LOH con una longitud de aproximadamente 11 o más megabases pero más cortas que la longitud del cromosoma completo que contiene las regiones de LOH, y en las que la célula de cáncer es una célula de cáncer primaria de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer de esófago; y

(b) detectar una mayor probabilidad de que dicho paciente con cáncer responderá a un régimen de tratamiento contra el cáncer que comprende un agente que daña el ADN, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa I, radiación, o un inhibidor PARP.

7. El método de la reivindicación 1 o 2, el sistema de la reivindicación 4, el kit de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en el que se determinan dichas regiones de LOH o Regiones de LOH Indicadoras en al menos dos, cinco, diez o 21 pares de cromosomas humanos.

8. El método de la reivindicación 1 o 2, el sistema de la reivindicación 4, el kit de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en el que dicho número total de regiones de LOH o Regiones de LOH Indicadoras es 9, 15, 20 o más.

9. El método de la reivindicación 1 o 2, el sistema de la reivindicación 4 o el kit de la reivindicación 5, en el que dicho número de referencia es 11, 12 o 13 o mayor.

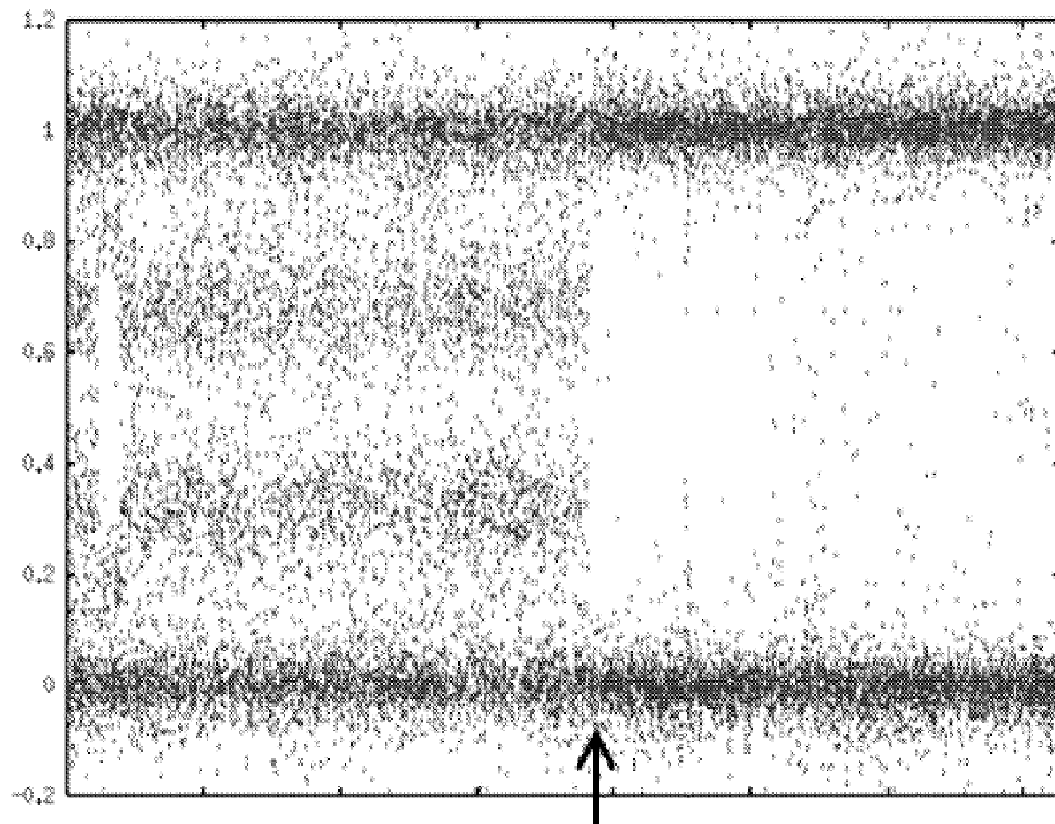
10. El método de la reivindicación 1 o 2, el sistema de la reivindicación 4, el kit de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en el que dicho al menos un par de cromosomas humanos no es el cromosoma humano 17.

11. El sistema de la reivindicación 4, el kit de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en el que dichas Regiones de LOH Indicadoras no están en el cromosoma humano 17.

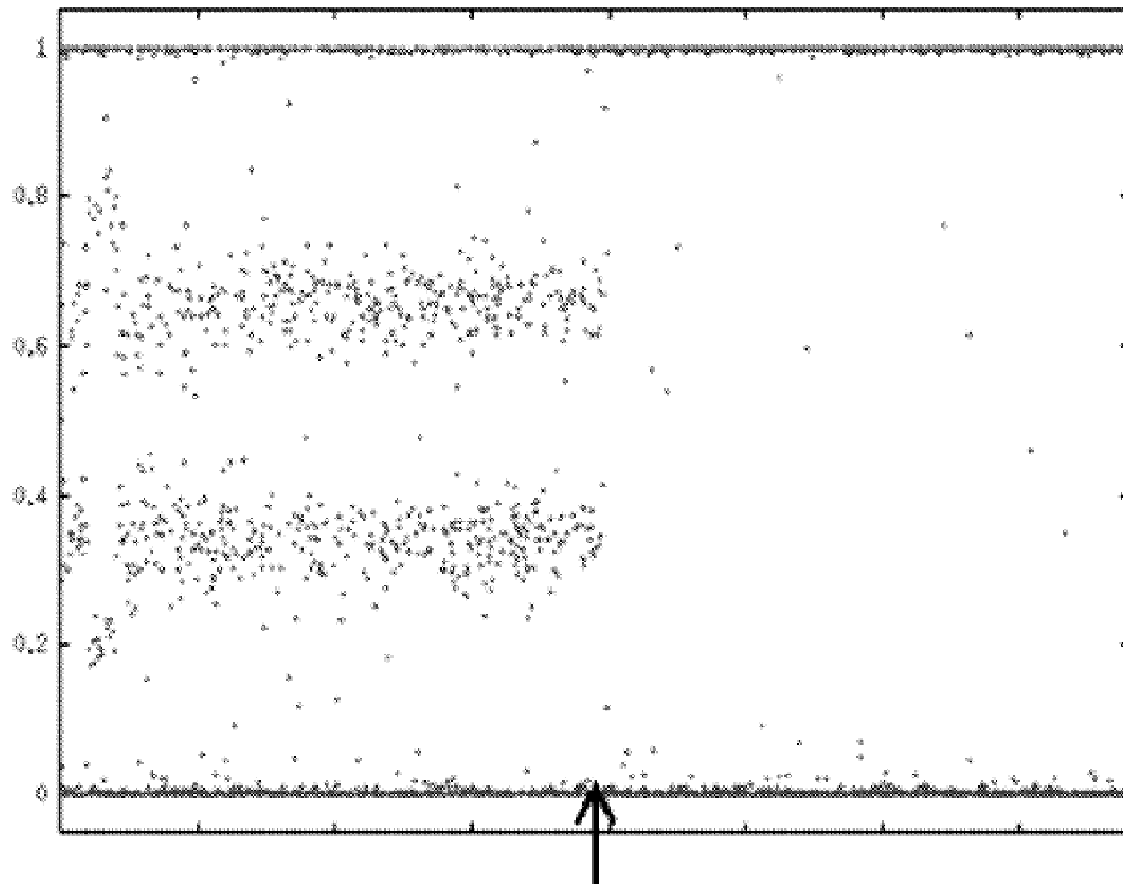
12. El método de la reivindicación 1, el régimen de tratamiento contra el cáncer para uso de la reivindicación 3, en el que dicho agente que daña el ADN es cisplatino, carboplatino, oxalplatino, o picoplatino, dicha antraciclina es epirubicina o doxorubicina, dicho inhibidor de topoisomerasa I es camptotecina, topotecan, o irinotecan, o dicho inhibidor PARP es olaparib o velapirib.

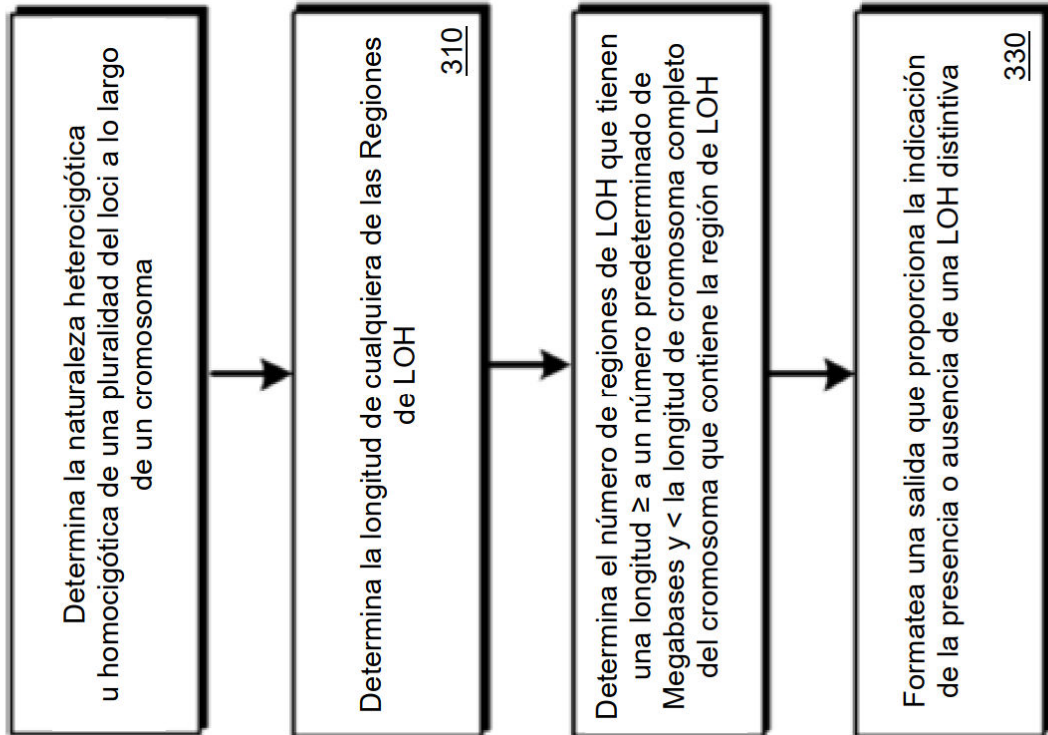
13. El sistema de la reivindicación 4, el kit de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en el que dicho agente que daña el ADN es un fármaco de quimioterapia a base de platino, dicha antraciclina es epirubicina o doxorubicina, dicho inhibidor de topoisomerasa I es camptotecina, topotecan, o irinotecan, o dicho inhibidor PARP es olaparib o velapirib.

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



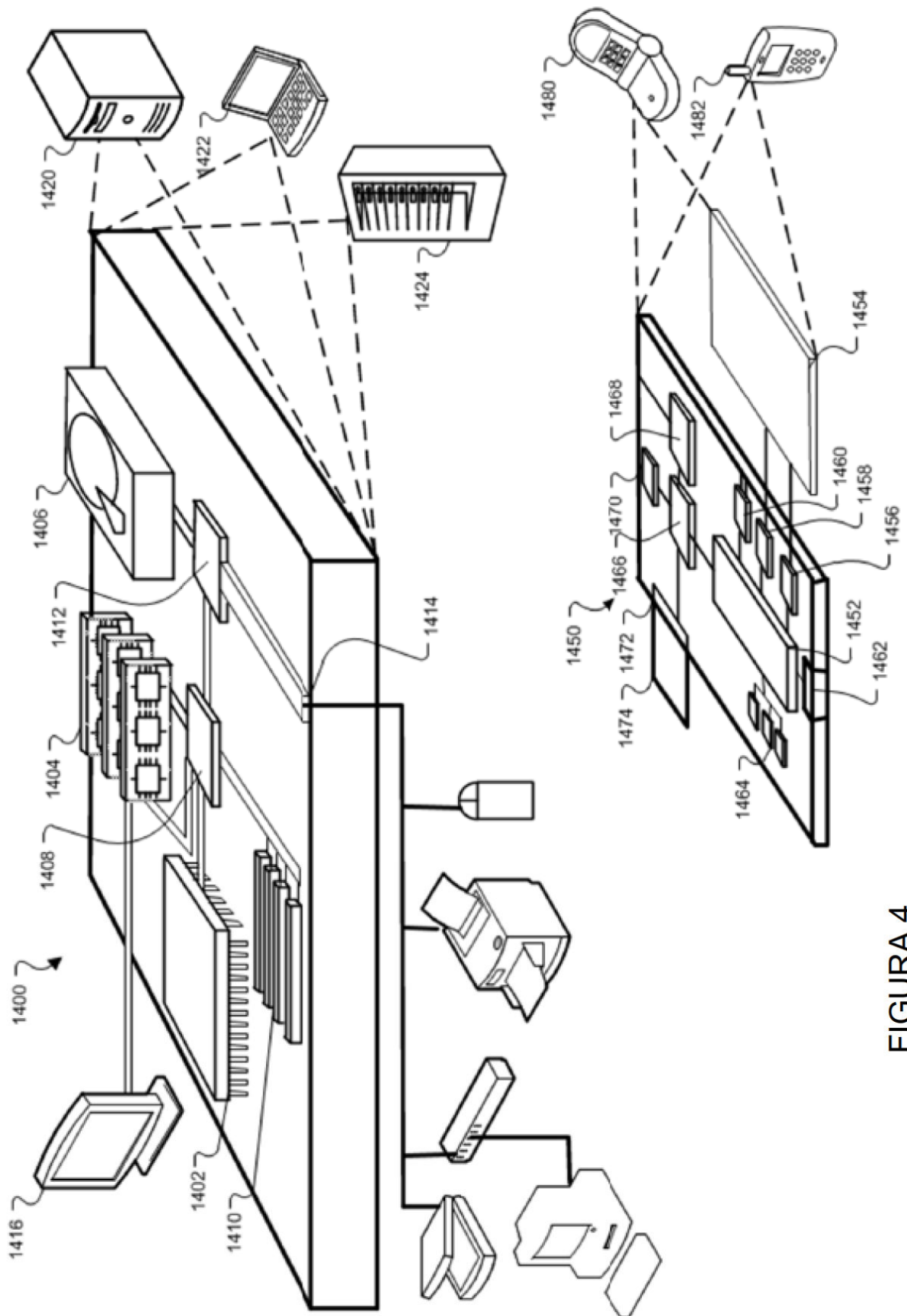
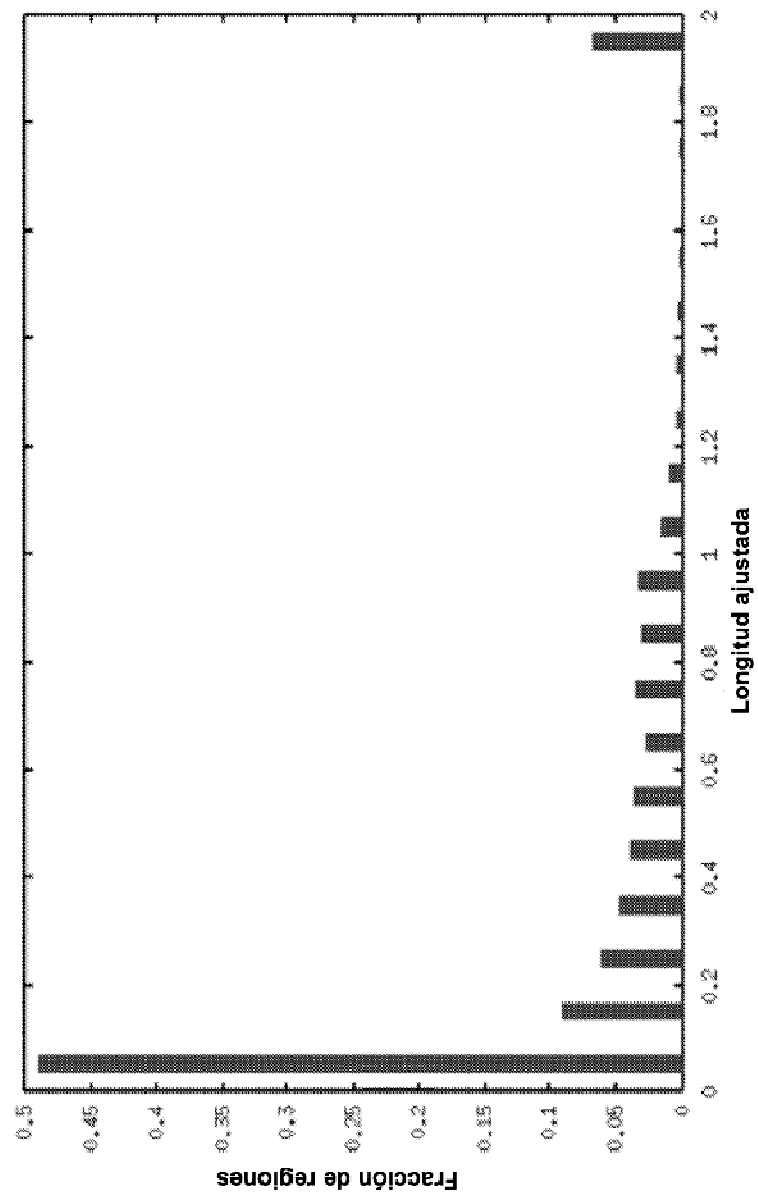
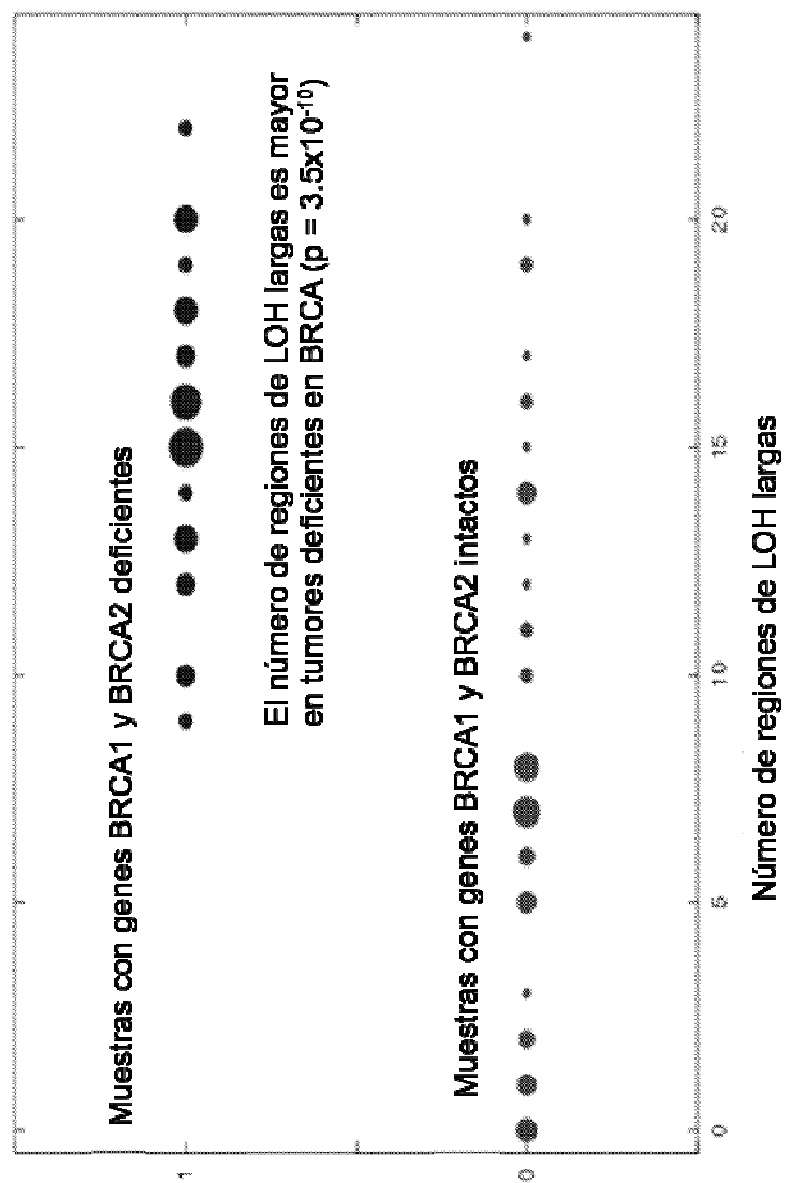


FIGURA 4

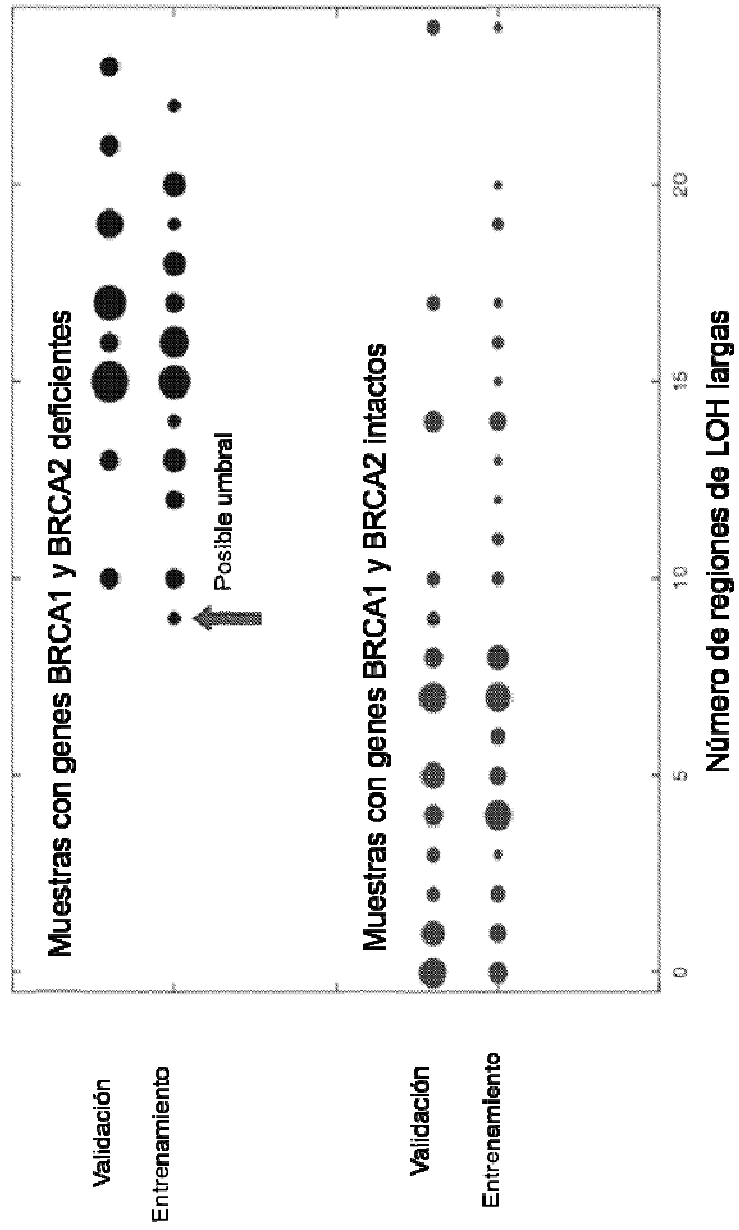
**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**



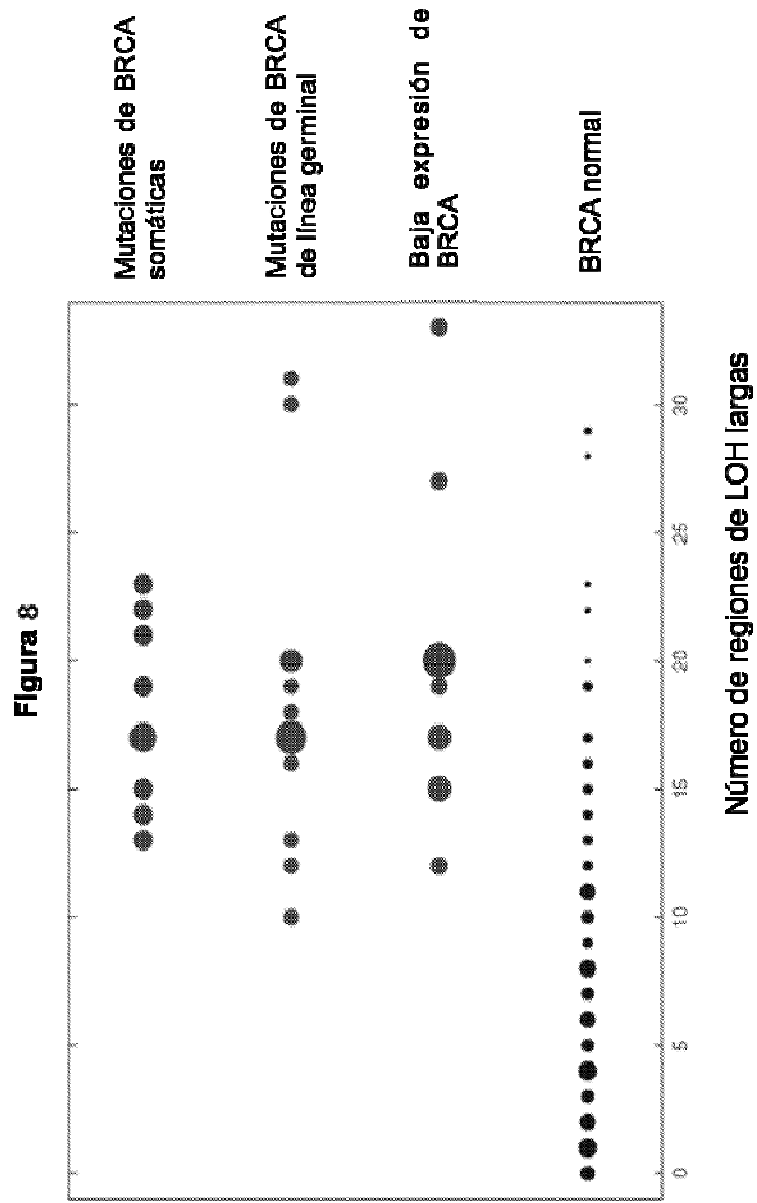
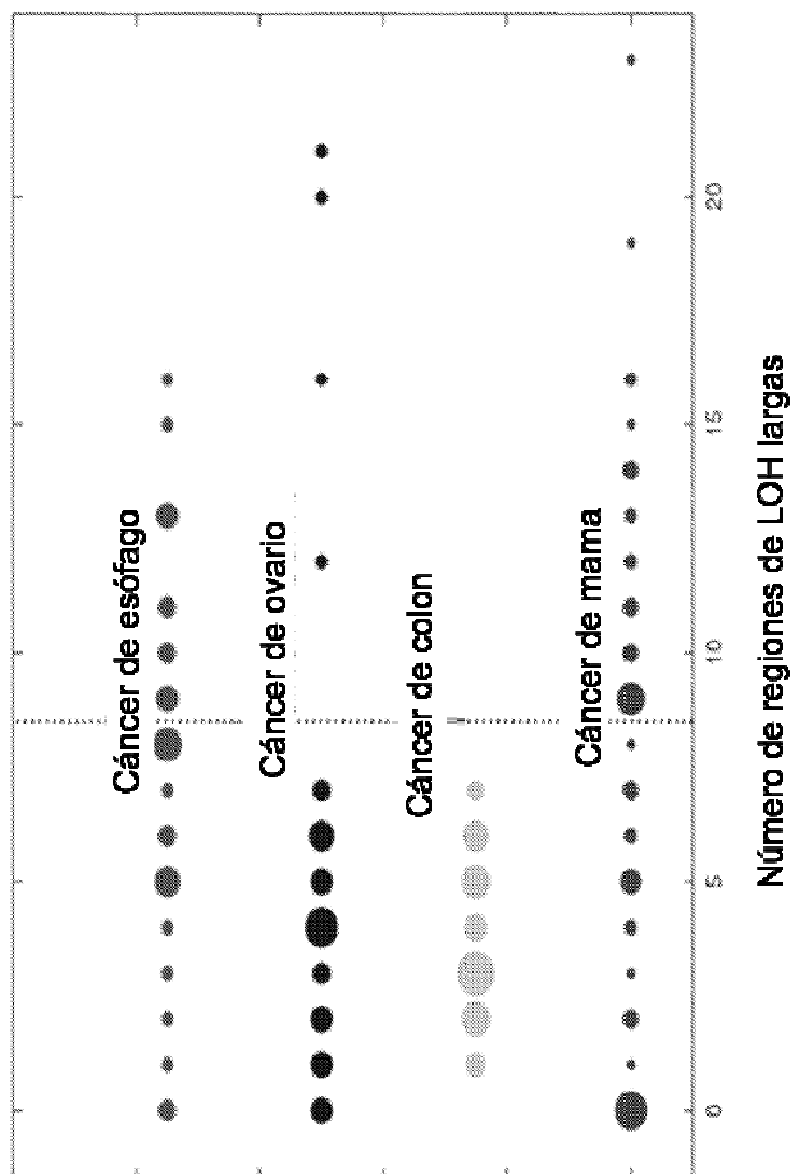


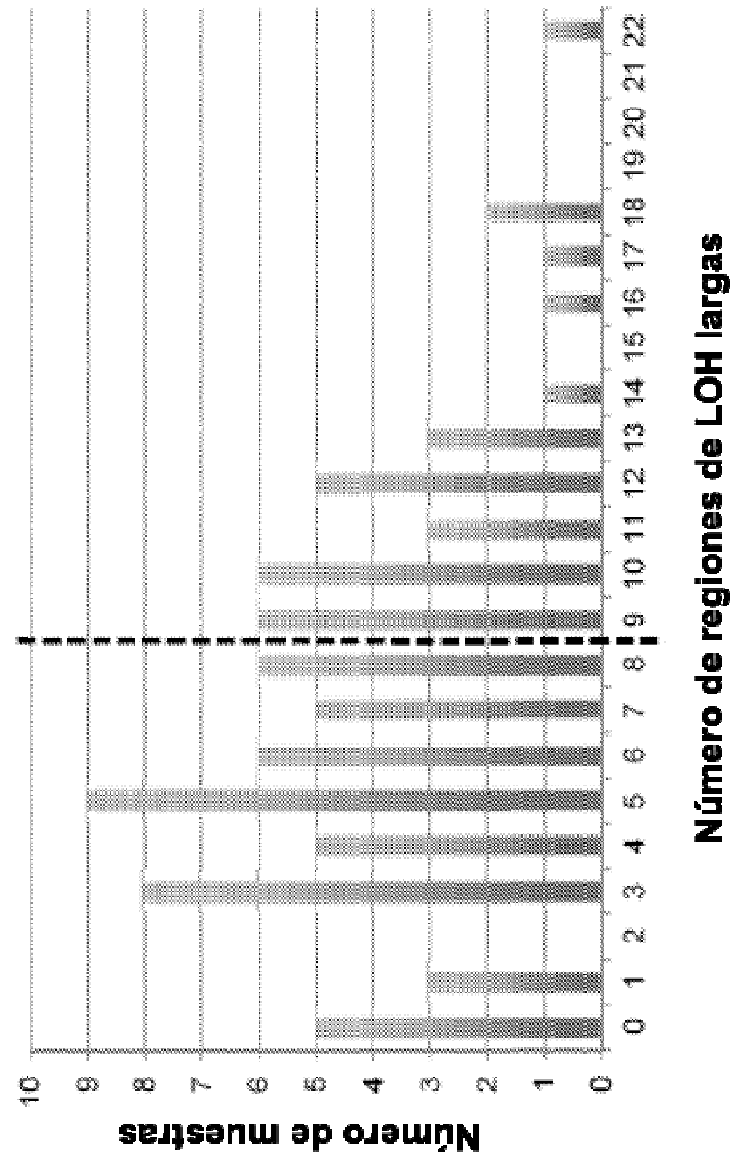
Figura 9

Estado	Número de muestras	Porcentaje
BRCA deficiente	44	33%
HDR deficiente/BRCA intacto	18	13%
HDR intacta	72	54%
Total	134	100%

**Figura 10**

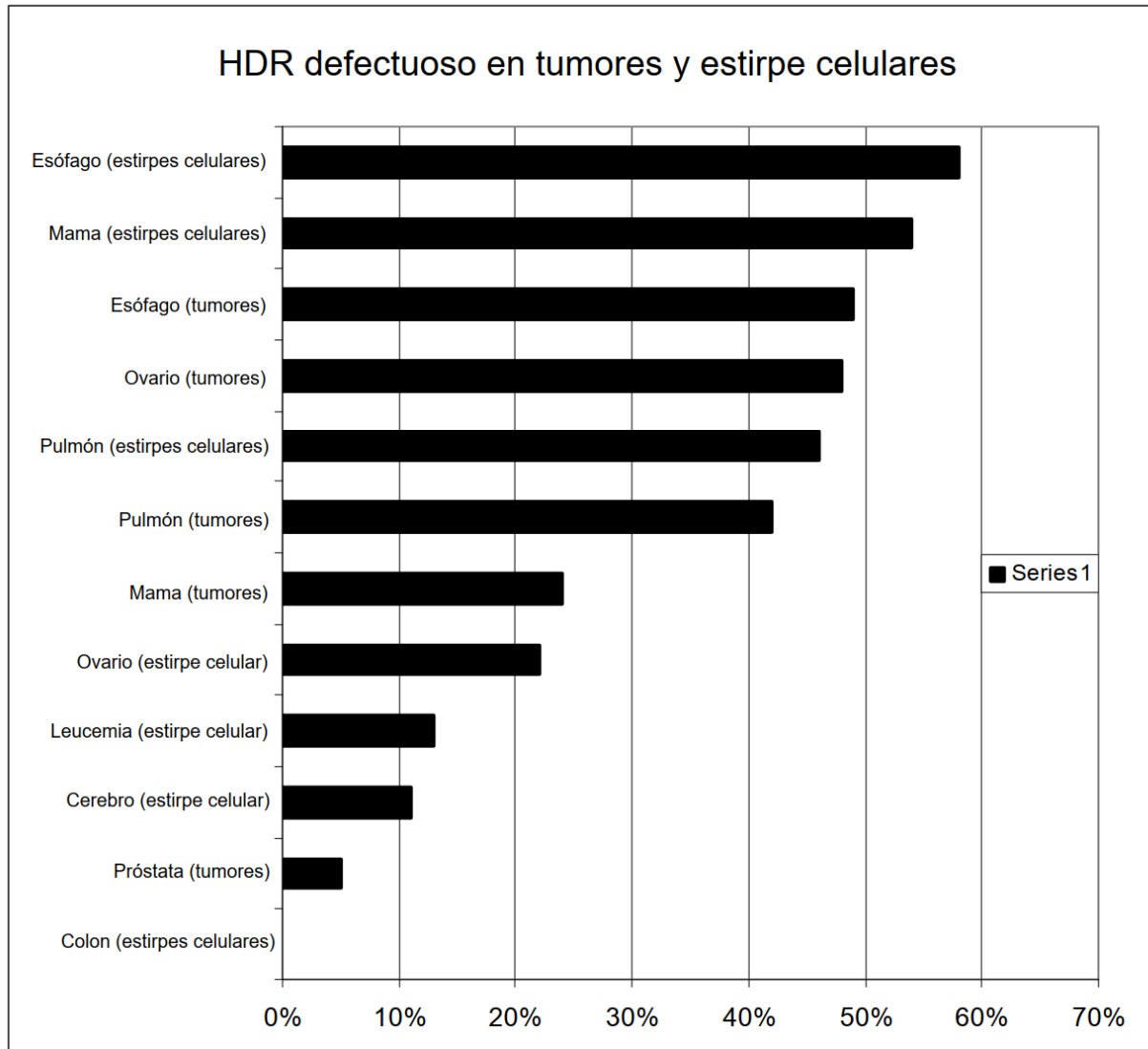


**Figura 11**



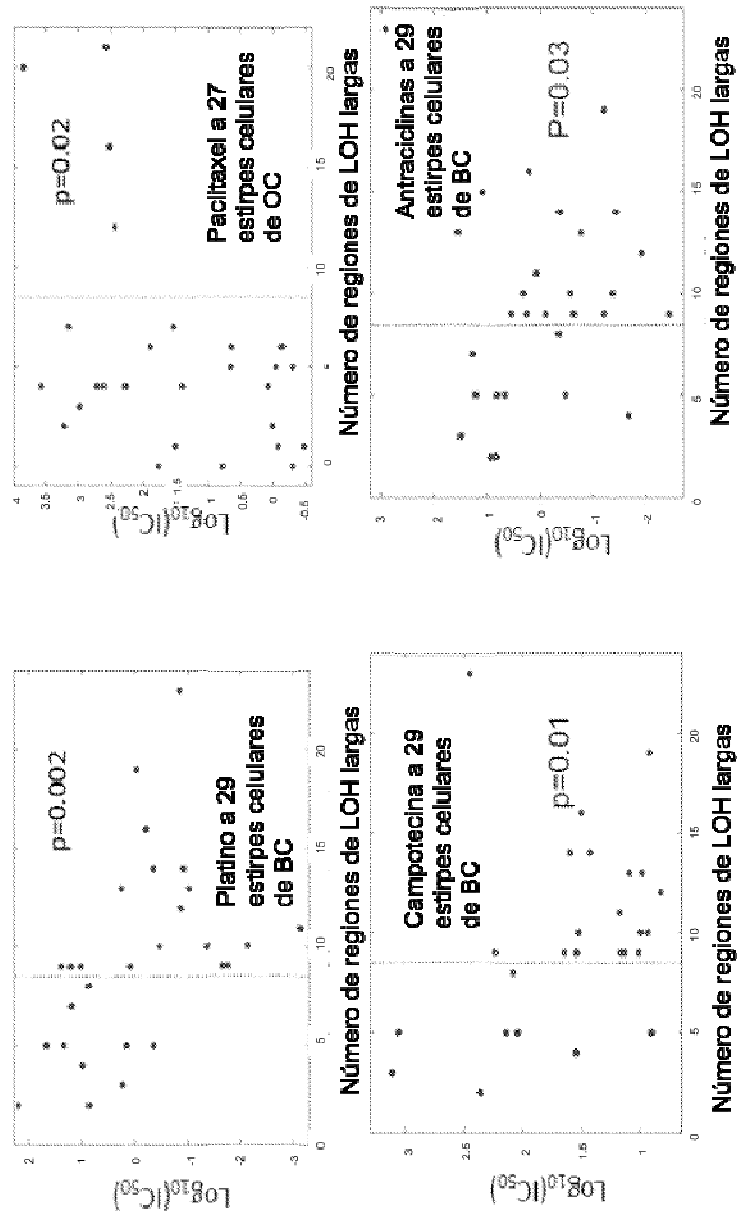


**Figura 12**



Colon (estirpes celulares)	0%
Próstata (tumores)	5%
Cerebro (estirpe celular)	11%
Leucemia (estirpe celular)	13%
Ovario (estirpe celular)	22%
Mama (tumores)	24%
Pulmón (tumores)	42%
Pulmón (estirpes celulares)	46%
Ovario (tumores)	48%
Esófago (tumores)	49%
Mama (estirpes celulares)	54%
Esófago (estirpes celulares)	58%

**Figura 13**



**Figura 14**

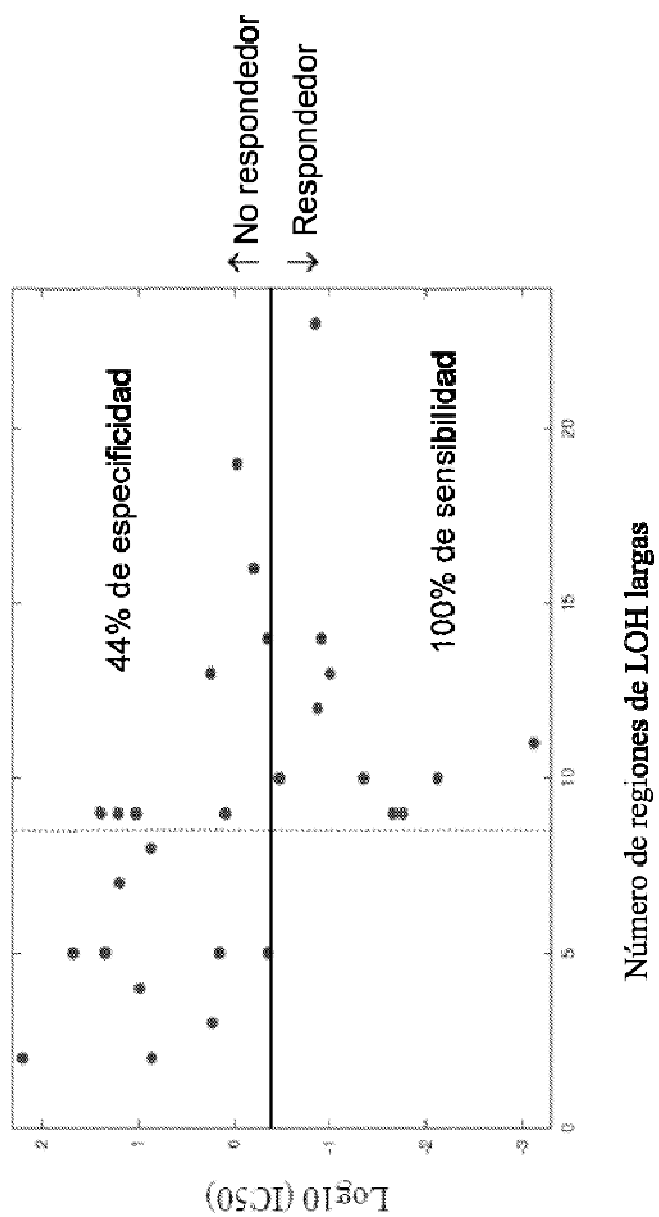
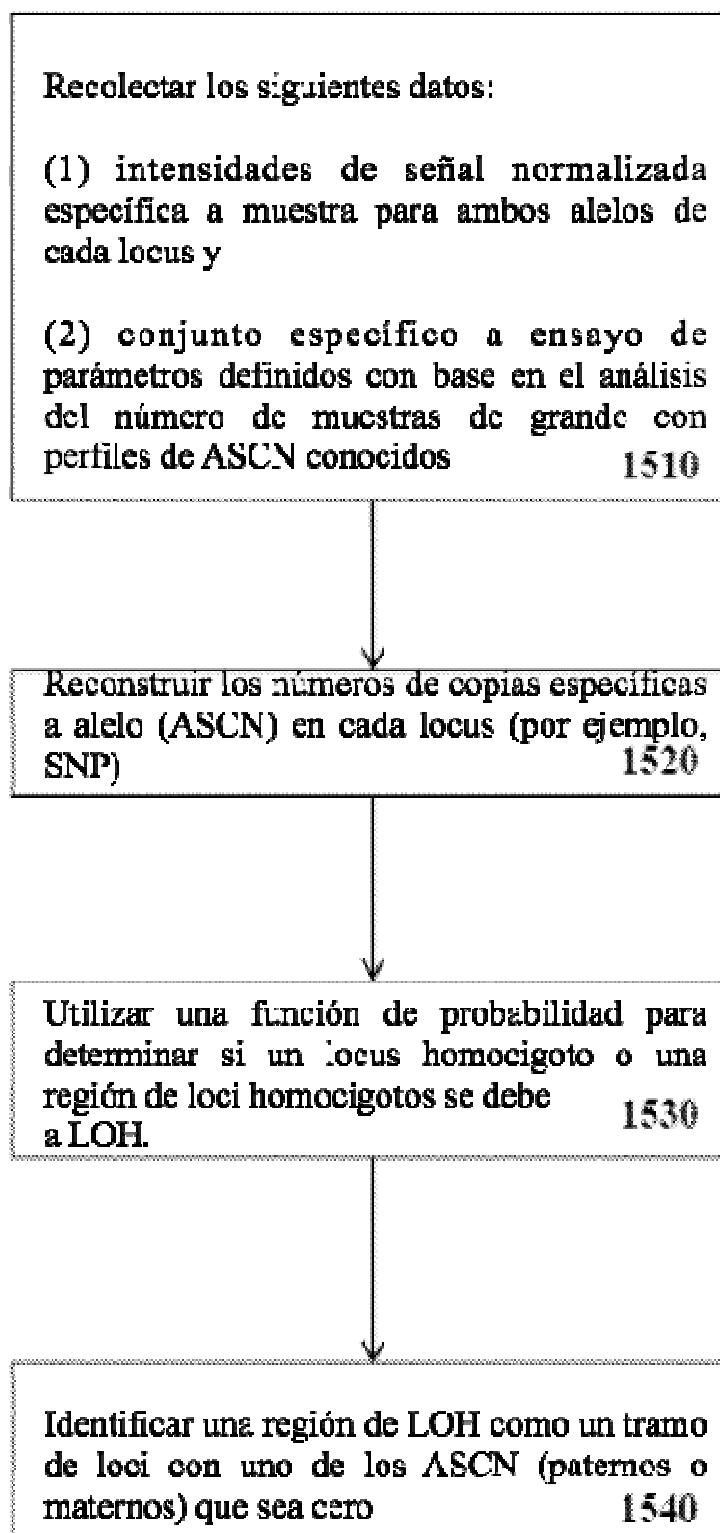
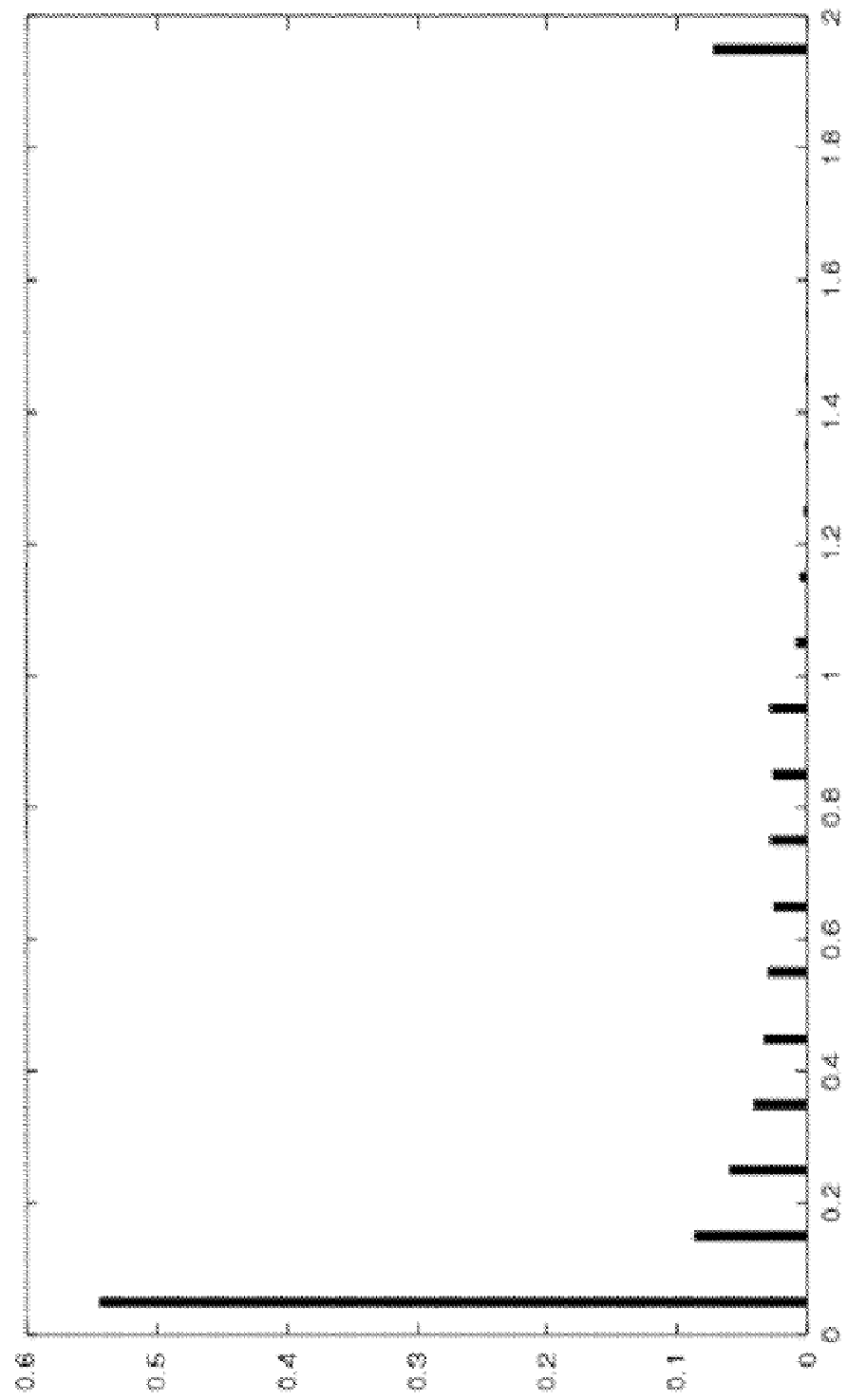


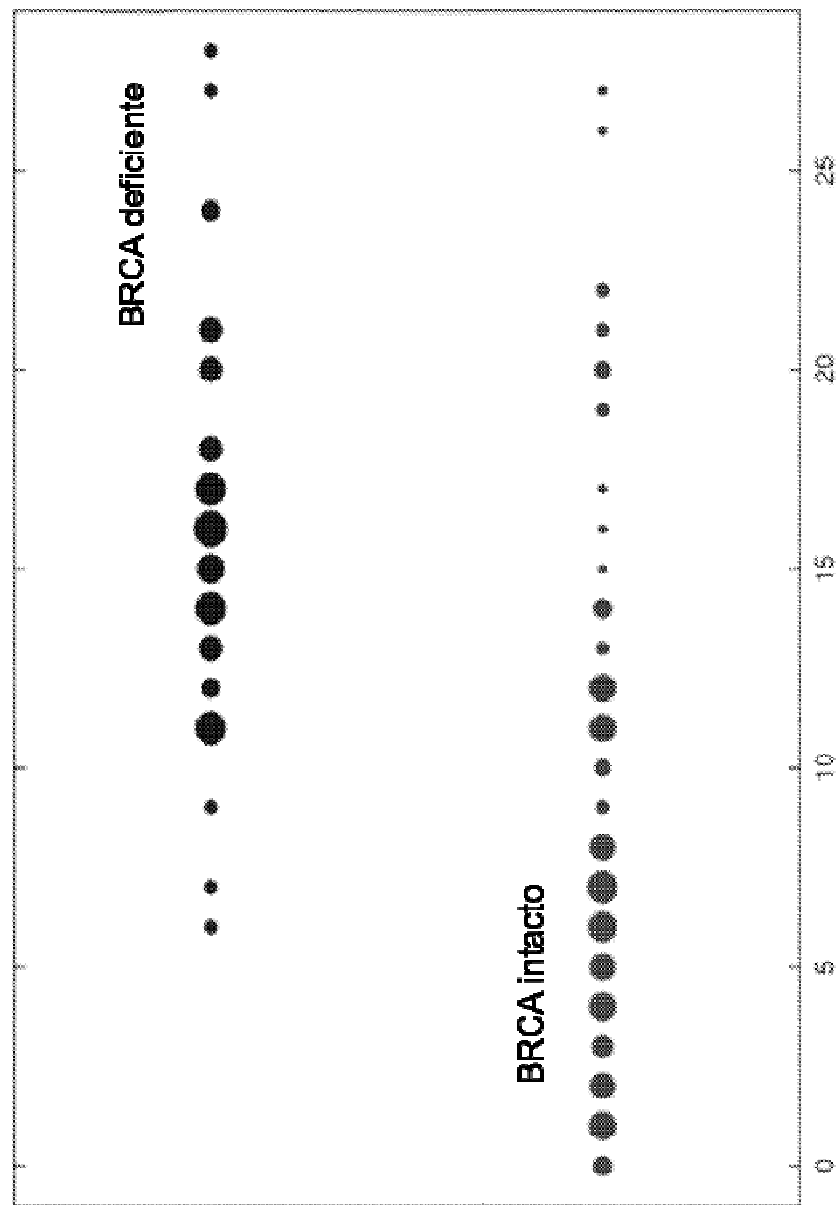
Figura 15



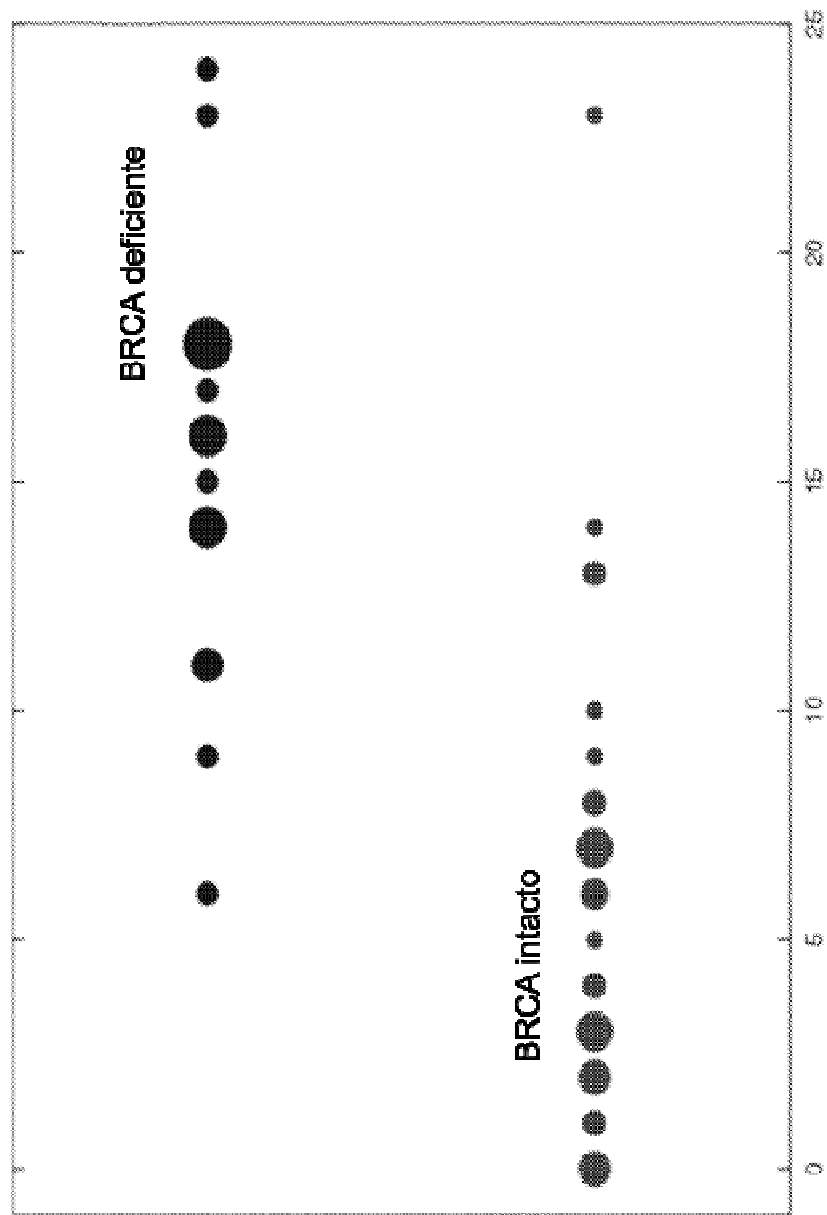
**Figura 16**



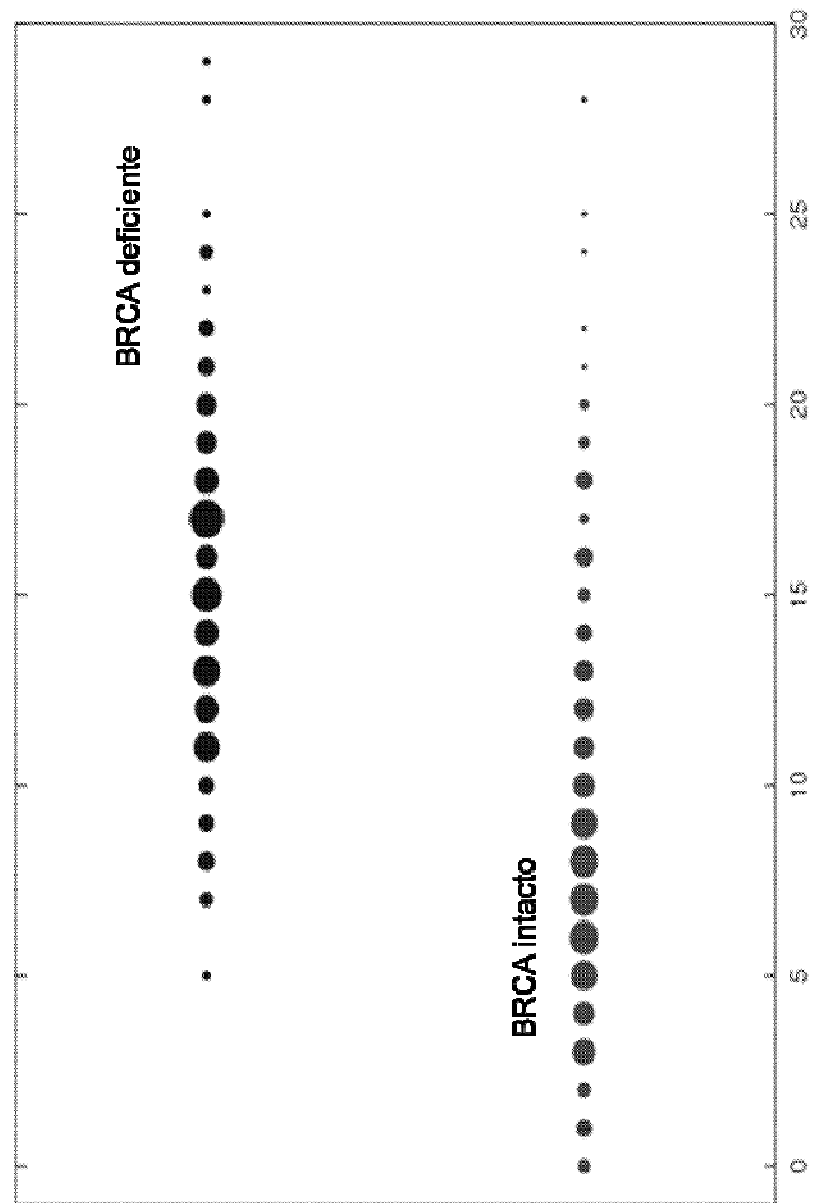
**Figura 17a**



**Figura 17b**

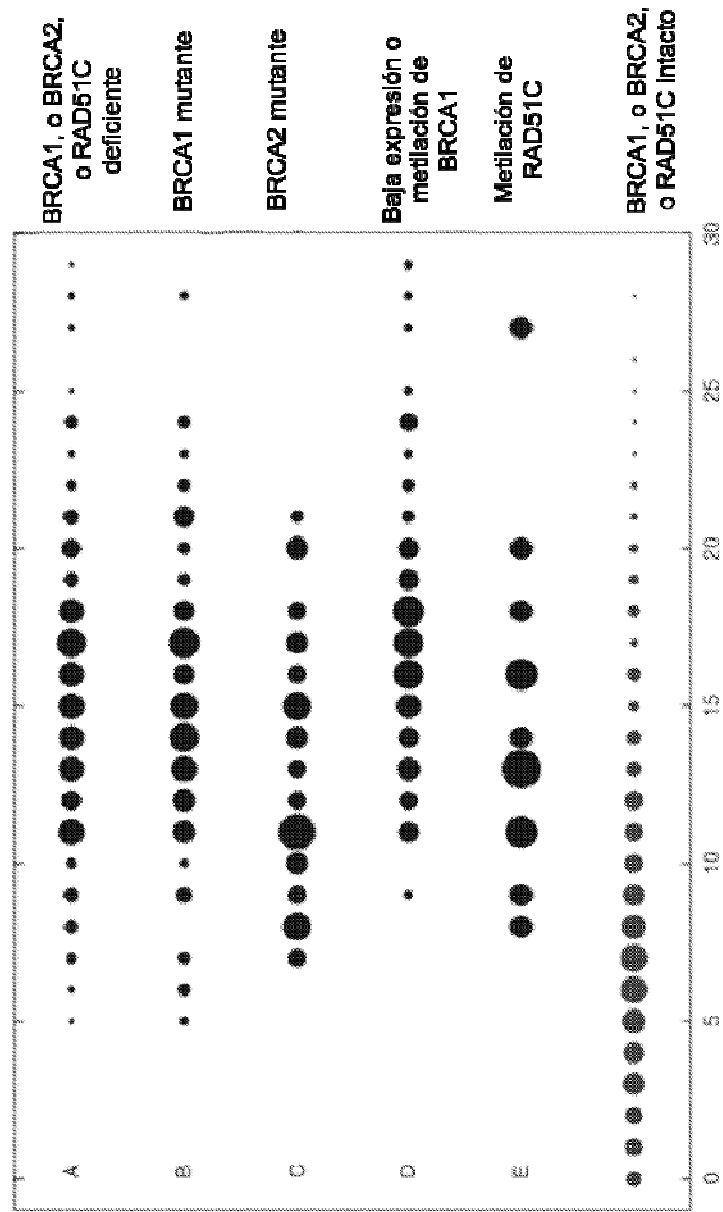


**Figura 17c**

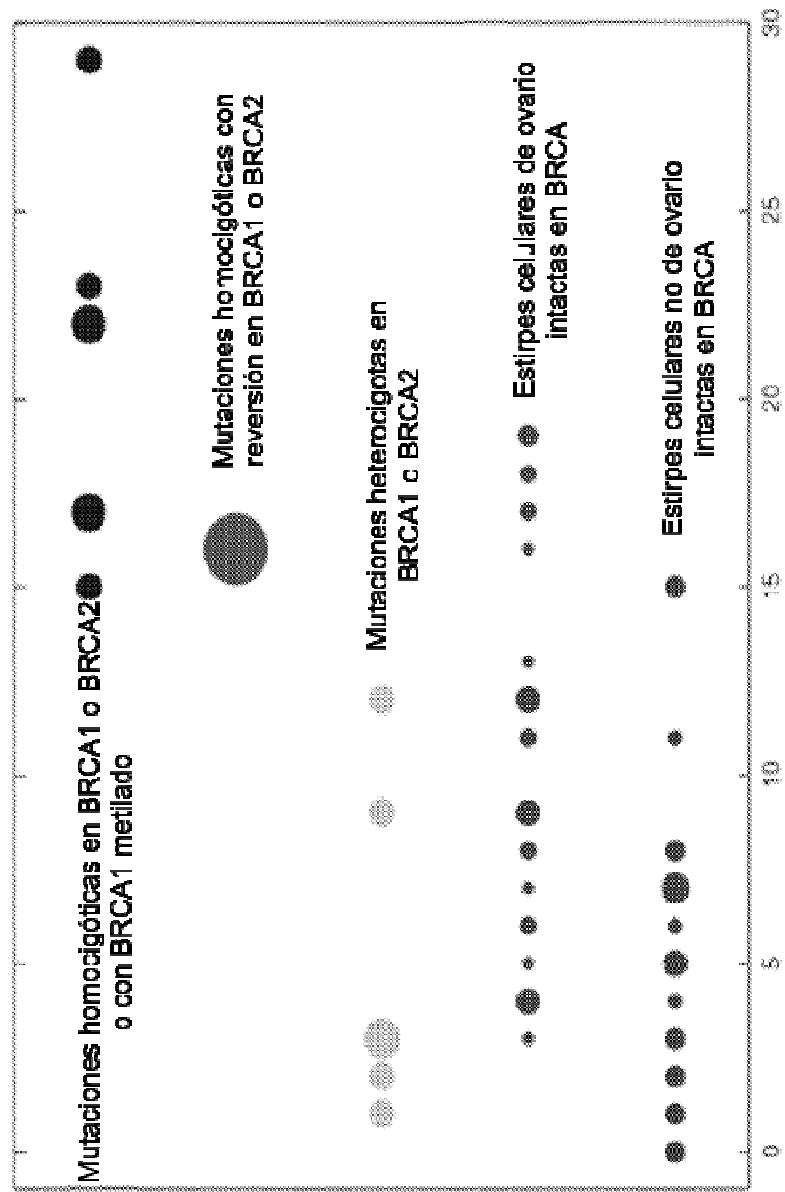




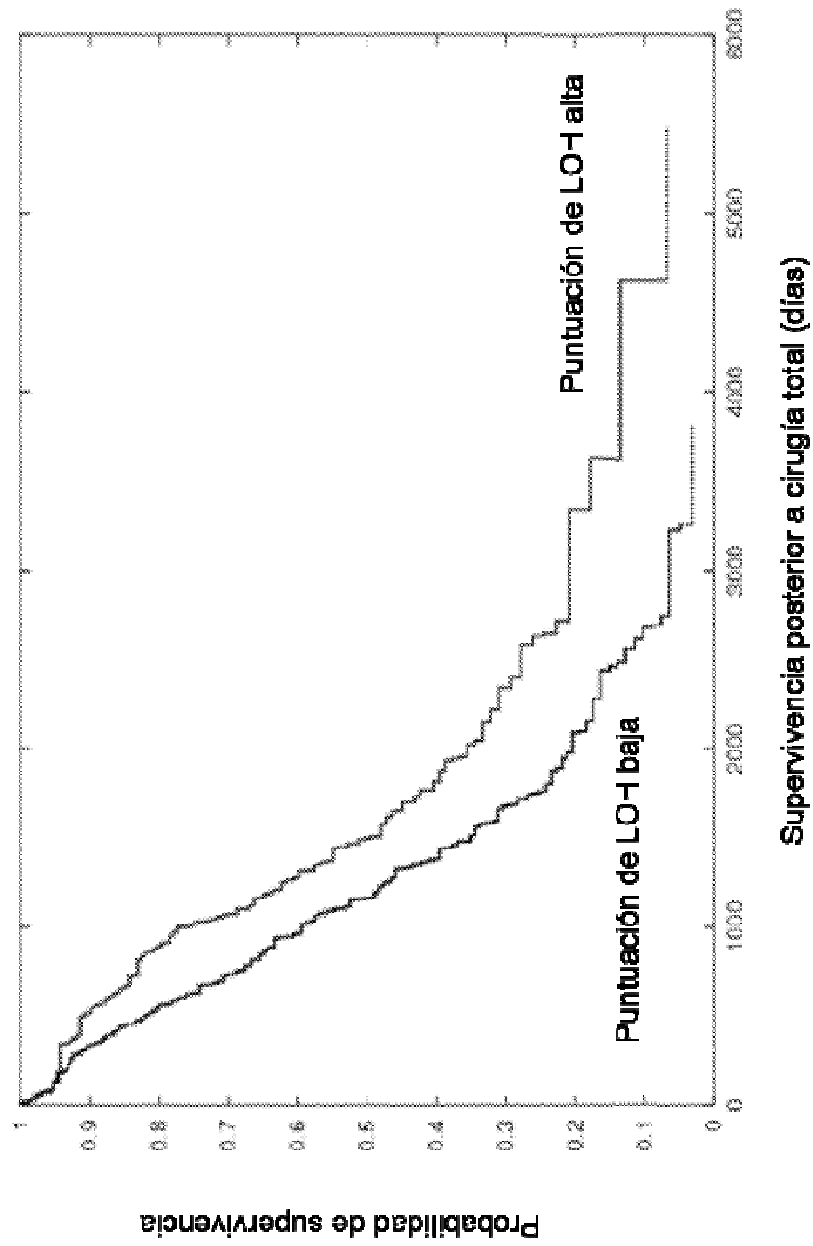
**Figura 17d**



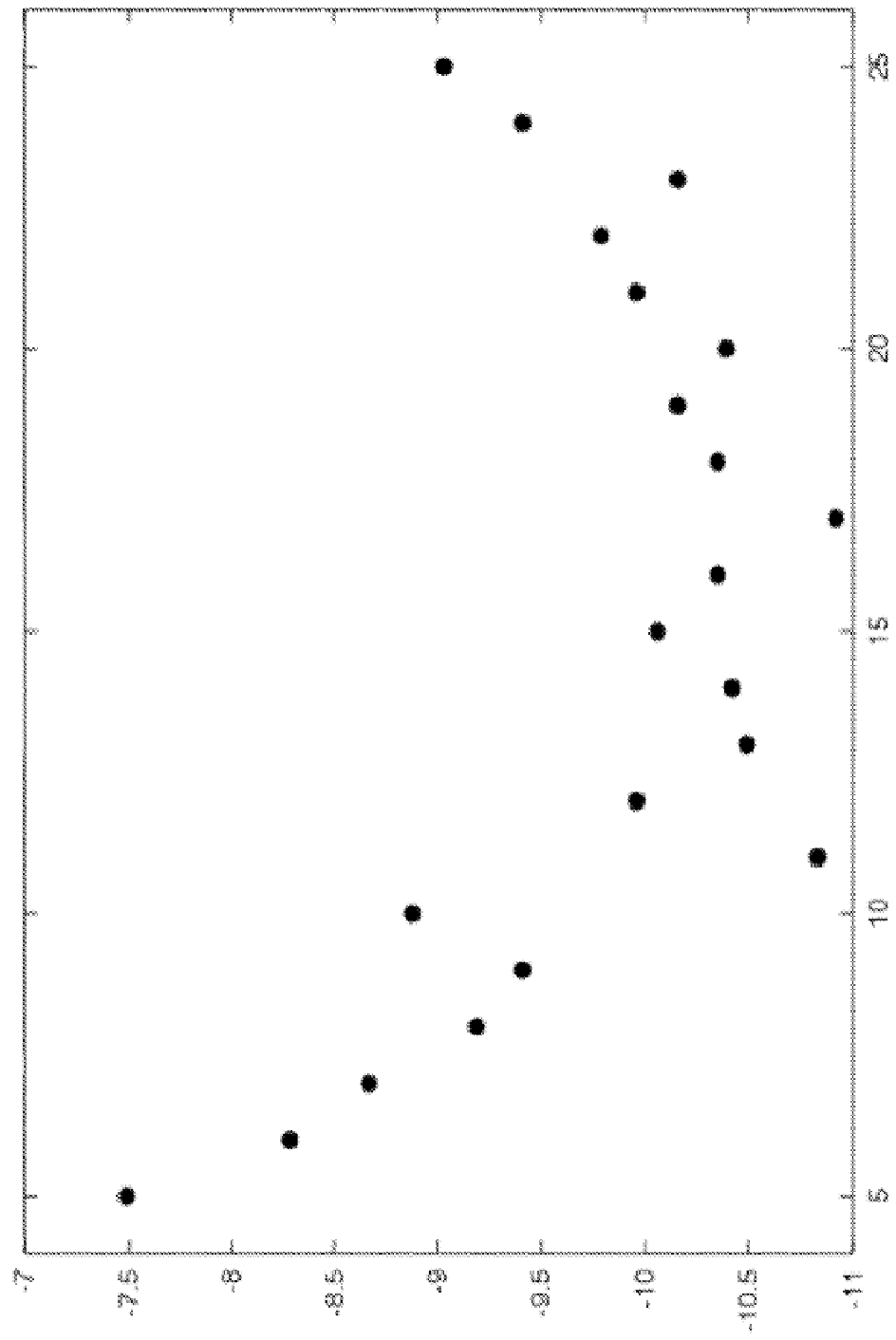
**Figura 18a**



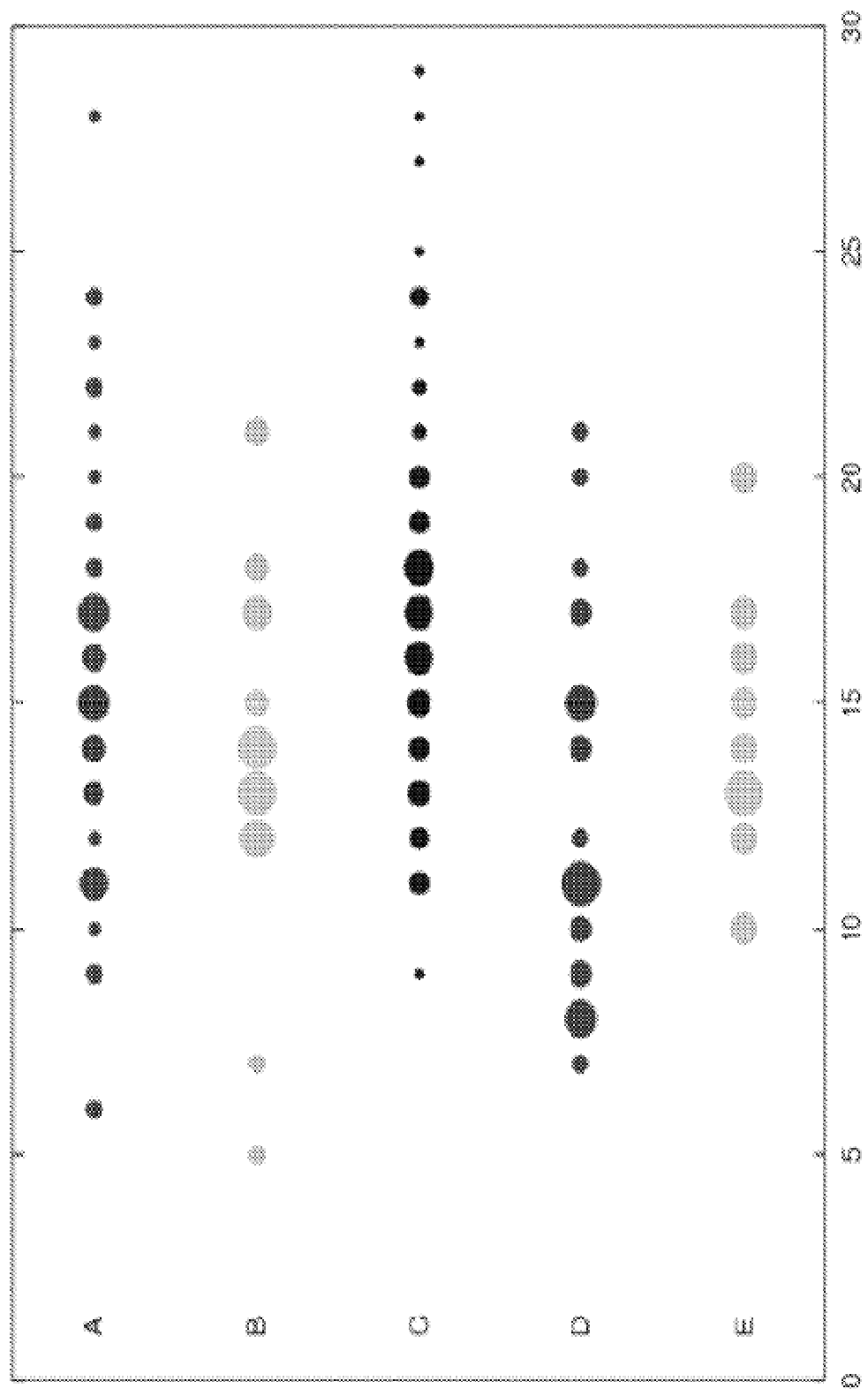
**Figura 18b**



**Figura 19**



**Figura 20**



**Figura 21**

