

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 538**

51 Int. Cl.:
A61K 31/155 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06788834 .7**
96 Fecha de presentación: **27.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1924252**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA MEJORAR LA PERMEABILIDAD CELULAR A PARTÍCULAS FORÁNEAS.**

30 Prioridad:
28.07.2005 US 703329 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:
ID-FISH TECHNOLOGY, INC.
926 EAST RIVER PARKWAY
SANTA CLARA, CA 95054, US

72 Inventor/es:
SHAH, Jyotsana, S. y
WELTMAN, Helena

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 372 538 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para mejorar la permeabilidad celular a partículas foráneas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para mejorar la permeabilidad celular hacia partículas foráneas que incluyen las sondas de la presente invención.

Antecedentes

10 Las células son la unidad básica de todos los organismos vivos. La característica común de casi todas las células es que están rodeadas (o limitadas) por una membrana citoplasmática. Esta membrana alberga los contenidos internos de la célula y regula el movimiento de sustancias hacia dentro y fuera de la célula. Sólo aquellas moléculas que se pueden difundir a través de la membrana o son transportadas a través de la misma se pueden mover hacia el interior y el exterior de la célula. Algunas pueden traspasar el núcleo lipídico de la membrana, pero otras deben pasar a través de los poros. Otras moléculas más deben atravesar la membrana unidas a vehículos de una manera energéticamente dependiente. Asimismo, el núcleo y otros orgánulos celulares tienen membranas que regulan el flujo de moléculas hacia el interior y el exterior del orgánulo.

15 La fijación es un proceso químico que "fija" las moléculas celulares en su sitio de manera que luego sea posible estudiar la célula o el tejido. La mayoría de los agentes que se usan como fijadores (p.ej., alcoholes, tales como etanol y aldehídos, tales como paraformaldehído) funcionan mediante el entrecruzamiento de moléculas celulares, especialmente, de proteínas. Este procedimiento de entrecruzamiento evita la degradación de la estructura celular. Hay diversos fijadores que están mejor adaptados a la conservación de diferentes moléculas y estructuras celulares o a diferentes procedimientos de detección. El fijador seleccionado para cualquier objetivo particular estará determinado por la naturaleza del objetivo.

20 Desafortunadamente, los procedimientos actuales de fijación suelen dificultar la posterior capacidad de un investigador o profesional sanitario para detectar los componentes celulares internos. En otras palabras, lo que evita exactamente la degradación de la célula, la fijación, también puede ser un obstáculo a los muchos tipos de investigación y diagnóstico que se basan en moléculas de detección de mayor tamaño. Debido a esto, se han hecho esfuerzos por permeabilizar células o crear canales tras la fijación.

25 Los procedimientos actuales de permeabilización de la membrana celular tras la fijación no son eficaces para todos los especímenes, son demasiado rigurosos (por tanto, destruyen las estructuras objeto de estudio) y/o requieren un equipo caro. Por ejemplo, Hoffman, *et al.*, (patente estadounidense n.º 6.835.393) revelan el uso de polímeros de ácido policarboxílico y del pH para afectar a las membranas celulares sólo para su uso en muestras no fijadas. Connelly, *et al.*, (patentes estadounidenses n.º 5.597.688 y 5.422.277) revelan el uso de una composición con ácido 2,4-dinitrobenzenosulfónico, ácido 2,4-dinitrobenzoico o 2,4-dinitrofenol, tanto para la fijación de la membrana celular como la permeabilización, pero estas composiciones limitan la elección que el investigador o el profesional sanitario ha hacer sobre el fijador y, por tanto, limita la necesaria flexibilidad del análisis. Los procedimientos mecánicos, tales como el tratamiento de ultrasonidos, la electroporación, etc., habitualmente, sólo funcionan en muestras no fijadas y requieren un equipo caro.

30 Además, los procedimientos disponibles de investigación y diagnóstico de la técnica anterior para muchas dianas celulares, tales como patologías, dependen de evaluaciones microscópicas, parámetros morfológicos celulares, características de tinción y la presencia o ausencia de ciertas dianas. Sin embargo, muchos de estos procedimientos de diagnóstico no son completamente exactos ni lo suficientemente sensibles.

35 Lo que se necesita son composiciones y procedimientos para mejorar la permeabilidad de membranas celulares de especímenes hacia partículas foráneas, tales como moléculas de detección marcadas. Además, lo que se necesita son composiciones y procedimientos para mejorar la detección de dianas celulares y patógenos.

Resumen de la invención

45 En una realización, la invención permite la detección de la diana o del fragmento de diana, directamente en células de un cultivo celular o espécimen obtenido de un paciente, mediante hibridación *in situ*. En una realización preferida, la célula es un patógeno. El procedimiento se compone de varias etapas que se realizan, preferiblemente, pero no necesariamente, en el orden enumerado. Se deposita una muestra de cultivo o espécimen sobre un portaobjetos. Se fija la muestra sobre el portaobjetos bien mediante calor o con un fijador estándar. El fijador puede ser, por ejemplo, metanol, ácido acético de metanol, acetona, formaldehído o formalina. Se trata la muestra fijada con las soluciones de IDF (véase debajo), teñidas o sondadas, y se observa. Alternativamente, se mezcla el espécimen con solución de IDF, se incuba, luego se prepara en forma de frotis o se coloca de otro modo en un portaobjetos de vidrio, se seca al aire y se fija. La solución de IDF puede comprender cualquier combinación de los

siguientes reactivos: sales caotrópicas (p.ej., tiosulfato o clorhidrato de guanidina), detergentes iónicos (p.ej., SDS) y/o detergentes no iónicos (p.ej., IPGEL, desoxicolato, colato o sales biliares) u otros reactivos con propiedades similares, metanol y ácido acético. La concentración de cada reactivo en la solución de IDF depende, por ejemplo, de la pared celular del patógeno que se vaya a detectar. Aunque la presente invención no está limitada por ninguna teoría ni mecanismo, se cree que la solución de IDF crea "canales" en la pared y/o membranas celulares (celulares o nucleares) del patógeno. Estos canales permiten a una sonda penetrar por la pared celular y la membrana celular, y entrar en el citoplasma y/o el núcleo del patógeno. La sonda de la presente invención puede comprender ADN, ARN, ANP, péptido, glucopéptido, lipoproteína o glucolípido o una mezcla de cualquiera de los anteriores. Las dianas de las células fijadas en la muestra entran en contacto con un complejo sonda (el complejo sonda comprende los agentes de unión específicos de la diana) específico de la diana en condiciones apropiadas para la hibridación o la unión (por ejemplo, según lo descrito en la patente estadounidense n.º 6.165.723 concedida a Shah y Harris). Luego, se puede aclarar la sonda no hibridada o no unida de la muestra. En una realización, después es posible teñir la muestra aclarada con un colorante de contraste apropiado (p.ej., azul de Evans, DAPI, permanganato de potasio, etc). El complejo sonda hibridado o unido se detecta visualmente, por ejemplo, a través de microscopio, siendo la presencia del complejo sonda un indicador de la presencia de la diana celular. El procedimiento se puede realizar con diferentes tampones de hibridación, siendo varios ejemplos revelados en la presente memoria y en la patente estadounidense n.º 6.165.723 concedida a Shah y Harris, que se incorpora en la presente memoria por referencia). El tampón de hibridación usado se determina por la naturaleza de la sonda usada. El procedimiento de la presente invención es útil para detectar células, constituyentes celulares y, preferiblemente, patógenos en un espécimen. A modo de ejemplo, en la presente memoria, se revelan complejos de sonda específicos que son útiles para detectar patógenos de las especies del género *Mycobacterium*.

Los procedimientos de la presente invención son útiles, por ejemplo, en la detección de ácidos nucleicos, péptidos, glucopéptidos, lipopéptidos y glucolípidos de una amplia variedad de especímenes. Los especímenes ejemplares incluyen, por ejemplo, células, tipos de células, tejidos o un patógeno o patógenos de interés que incluyen o proceden de, p.ej., suero, plasma, esputo, orina, líquidos cerebrospinales, tejidos y leche materna. Las composiciones y los procedimientos de la presente invención se pueden usar en especímenes de cualquier organismo, incluyendo mamíferos, reptiles, peces, aves, plantas e insectos.

En una realización, la presente invención contempla una composición (solución de IDF) para aumentar la permeabilidad de paredes celulares, membranas celulares, membranas de orgánulos y membranas nucleares, composición que comprende en una realización: GuSCN (tiocianato de guanidina), Tris-HCl, EDTA, IGEPAL (octilfenoxipoli(etileno)etanol), ácido acético, metanol, colato de sodio y desoxicolato de sodio. La presente invención contempla además que el GuSCN está a una concentración de aproximadamente 2,0 a 3,3M; el Tris-HCl está a una concentración de aproximadamente 10 a 100mM; el Tris-HCl está a un pH de aproximadamente 7,0 a 9,0; el EDTA está a una concentración de aproximadamente 5 a 50mM; el IGEPAL está a una concentración del aproximadamente 0,1 al 2,0 por ciento; el ácido acético está a una concentración del aproximadamente 0,1 al 10,0 por ciento; el metanol está a una concentración del aproximadamente 20 al 50 por ciento; el colato de sodio está a una concentración del aproximadamente 0,02 al 2,5 por ciento y el desoxicolato de sodio está a una concentración del aproximadamente 0,02 al 2,5 por ciento.

En otra realización, el tampón de GuSCN se sustituye por tampón de GuHCl entre aproximadamente 2M a 6M. En otra realización más, se reemplaza el IGEPAL por SDS entre el aproximadamente 0,01% y el 2,0%. En otra realización más, el GuSCN se usa en combinación con GuHCl y/o el IGEPAL se usa en combinación con SDS.

En una realización, la presente invención contempla un procedimiento para teñir una diana en una célula que comprende: a) poner en contacto la célula con una composición que comprende GuSCN (tiocianato de guanidina), Tris-HCl, EDTA, IGEPAL (octilfenoxipoli(etileno)etanol), ácido acético, metanol y desoxicolato de sodio para crear una célula permeabilizada; b) poner en contacto la célula permeabilizada de la etapa (a) con un agente de unión específico de la unión con dicha diana; y c) detectar dicho agente de unión de la etapa (b).

En otros aspectos, la invención contempla que la diana del procedimiento anterior se selecciona entre, por ejemplo, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos de péptidos, péptidos, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, virus, priones y micoplasma.

En otras realizaciones, la presente invención contempla que el agente de unión se selecciona de un grupo que consiste en ácidos nucleicos, ácidos nucleicos de péptidos, péptidos, lipoproteínas, glucoproteínas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y lípidos.

El agente de unión de la presente invención puede comprender además un resto de detección, y el resto de detección se puede seleccionar del grupo que comprende, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, tintes, metales coloidales, biotina/avidina, peroxidasa de rábano picante, etc. En una realización preferida, la detección se realiza mediante un anticuerpo marcado con afinidad por el antígeno diana. Un agente de unión que comprende un resto de detección se define en la presente memoria como un complejo sonda.

En una realización, se trata una muestra clínica con solución de IDF en el tubo, seguida por la ebullición para liberar el ácido nucleico en la solución. Esta técnica es eficaz para dianas tales como micobacterias, hongos y levaduras que requieren la lisis mecánica (p.ej., mediante tratamiento de ultrasonidos) o incubaciones prolongadas con enzimas para digerir las paredes celulares, por ejemplo. Es posible seguir purificando la diana de interés mediante (1) técnicas de purificación de ADN estándar o (2) mediante hibridación de sándwich usando sondas específicas. Luego se puede amplificar el ADN y ARN diana purificado mediante PCR o RT-PCR, respectivamente, si es necesario, antes de la detección.

En una realización más preferida, la diana es un ácido nucleico del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* y el agente de unión es un oligonucleótido (o una sonda de ANP) complementario a ácidos nucleicos del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*.

En otro aspecto, el procedimiento también comprende la tinción de fondo para destacar o que se pueda visualizar mejor el resto de detección. Las tinciones de fondo y las técnicas de tinción son conocidas por aquellos expertos en la técnica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de un procedimiento mejorado para permitir la penetración de la sonda por la pared celular y/o la membrana celular de una célula (p.ej., un patógeno) con el fin de detectar directamente la presencia de una diana de ácido nucleico, proteína, péptido, lipopéptido, glucopéptido, lípido, etc. en células de cultivo o de especímenes obtenidas de un individuo (p.ej., frotis sanguíneos, biopsias, tejidos introducidos en parafina y garrapatas) mediante hibridación *in situ*. El procedimiento de la invención es particularmente adecuado para detectar secuencias de nucleótidos específicas de patógenos en los que se encuentran, por ejemplo, esputo, sangre entera, líquido cerebroespinal (CSF), otros líquidos corporales o tejidos infectados. Más específicamente, las nuevas mejoras de los procedimientos de fijación/pretratamiento tradicionales, según lo descrito, permiten a las sondas (p.ej., sondas de oligonucleótido) penetrar dentro de las células (p.ej., patógenos tales como bacterias, virus, hongos, levadura y protozoos) que pueden estar localizadas bien dentro o fuera de células huésped infectadas. Además, un procedimiento con un colorante de contraste (p.ej., DAPI, azul de Evans, permanganato de potasio) tras la hibridación con sonda marcada fluorescentemente permite la fácil visualización de los organismos que conservan las sondas hibridadas en cultivo o muestras clínicas.

Los nuevos y exclusivos procedimientos de pretratamiento de hibridación *in situ*, técnicas de detección y composiciones de la presente invención descritos en la presente memoria permiten el uso de sondas de ADN recombinante, ARN, ANP, péptido, glucoproteínas, lípidos y glucolípidos en células, microorganismos o secciones tisulares, y son compatibles con el examen microscópico realizado habitualmente en laboratorios de bacteriología, parasitología, histología o patología. La presente invención se aplica, por ejemplo, a una sonda de ácido nucleico de una secuencia de nucleótidos predeterminada en las células (o tejido) de muestra y al examen de la muestra mediante, por ejemplo, microscopía, microscopía electrónica, citometría de flujo o diagnóstico de imágenes radiactivas (p.ej., película de rayos X, diagnóstico de imágenes con fósforo) para determinar qué células (o tejidos) de la población contienen las dianas específicas (p.ej., secuencias de ácidos nucleicos) de interés. Así pues, en frotis de sangre entera infectada o secciones tisulares, se pueden detectar organismos patógenos tales como bacterias, virus, protozoos u hongos en células infectadas. Tales protocolos proporcionan útil información científica y de diagnóstico, pues es posible correlacionar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico específico con una o más células de estructura y morfología observables y, de este modo, proporcionar una base para el diagnóstico y el pronóstico clínico.

El procedimiento para detectar un fragmento de ácido nucleico diana directamente de un espécimen se compone de etapas que se van a realizar, preferiblemente, en el orden u órdenes enumerados. Primero, se deposita un espécimen, habitualmente obtenido de un individuo, sobre un portaobjetos. Se fija la muestra sobre el portaobjetos con fijador (p.ej., metanol, fijador de metanol y ácido acético o un fijador de formalina y ácido acético). Una vez fijada la muestra, se permeabilizan las células de la muestra con las composiciones y los procedimientos de la presente invención. Alternativamente, se mezcla el espécimen con solución de IDF en un tubo, se incuba y luego se deposita sobre un portaobjetos, se seca al aire y se fija. A continuación, se ponen en contacto las células con una sonda específica de la diana en condiciones apropiadas para la hibridación.

Tras un período adecuado de hibridación, se aclara cualquier sonda no hibridada de la muestra. En una realización preferida, después se pone en contacto la muestra con un colorante de contraste (p.ej., DAPI, Azul de Evans, permanganato de potasio, etc.). Independientemente de si se aplicó el colorante de contraste a la muestra o no, luego se detectan mediante visualización las sondas que están hibridadas a la diana de la muestra, por ejemplo, mediante microscopía. La presencia de la sonda en la muestra indica la presencia del fragmento diana. La aplicación de un colorante de contraste a la muestra simultánea o consecutivamente al análisis de hibridación *in situ* de la presente invención mejora el procedimiento, permitiendo, por ejemplo, una determinación más clara de la ubicación de la diana en la muestra. Tal información ayuda, por ejemplo, a determinar más claramente la

hibridación de fondo.

Este procedimiento es adecuado para su uso con cualquier espécimen obtenido de un individuo. Esto incluye sangre entera, suero, plasma, esputo, orina, leche materna, líquido cerebroespinal y tejido. Este procedimiento también es adecuado para la detección de un patógeno u otra diana en las células de un vector de insecto, célula de insecto, células vegetales, hongos y bacterias.

El objetivo de fijar células o tejido consiste en inmovilizar las células y conservar la morfología de las células o del tejido, de manera que constituyentes celulares tales como, por ejemplo, el ARN, se mantengan en la matriz celular durante la hibridación *in situ*. El procedimiento preferido utiliza por tanto un fijador que es capaz de conservar y mantener los ácidos nucleicos de la célula y, al mismo tiempo, entrecruzar y/o hacer precipitar las proteínas en la matriz celular, de modo que la célula o el tejido mantiene sustancialmente una configuración abierta para la penetración de la sonda y la posterior hibridación.

En una realización preferida, las sondas de la presente invención comprenden, por ejemplo, ácidos nucleicos producidos sintética o biológicamente (ADN, ARN y equivalentes), ácidos nucleicos de péptidos (ANP y equivalentes); péptidos (y equivalentes) que contienen secuencias de ácido nucleico o péptido específicas que se hibridan en condiciones restrictivas a dianas celulares específicas. En otra realización, las sondas de la presente invención comprenden glucopéptidos, lipopéptidos y priones o moléculas de tipo prión producidos sintética o biológicamente (o equivalentes de los mismos) que se unen en condiciones restrictivas a dianas específicas de la célula.

El complejo sonda se define como una sonda que comprende un resto marcador adecuado para la detección. Si la sonda es un ácido nucleico, el resto marcador está unido bien por el extremo 5', el extremo 3', internamente o en cualquier combinación de los mismos. El resto marcador preferido es un marcador identificador, tales como un radiomarcador (p.ej., P^{32} , I^{125} , H^3), un marcador de biotina o un marcador fluorescente. Alternativamente, la sonda tiene una cola de polidesoxinucleótido marcada que se usa para la detección del complejo sonda. El complejo sonda también puede estar compuesto de una pluralidad de diferentes secuencias de ácidos nucleicos, ANP, péptidos, glucopéptidos, lipopéptidos o priones, o cualquier combinación de los mismos que comprenda uno o más marcados con un resto marcador. Si hay más de un resto de sonda marcado, puede ser beneficioso marcar cada uno de los restos de sonda con un resto marcador diferente.

La secuencia de nucleótidos de una sonda de oligonucleótido es sustancialmente complementaria a al menos una parte del ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana es bien un ácido nucleico normalmente presente en la célula o el tejido fijado, o, alternativamente, uno que normalmente no está presente en la célula o el tejido y se asocia a un estado anómalo o patológico. Cada molécula de complejo sonda está preferiblemente compuesta por un fragmento de ADN o ARN que varía en tamaño de aproximadamente 10–50 nucleótidos.

Las sondas de péptido incluyen, por ejemplo, anticuerpos y otras moléculas conocidas de unión a una diana definida o intervalo de dianas. Los ejemplos de sondas de no anticuerpo incluían, por ejemplo, enzimas y sustratos enzimáticos, y porciones efectoras de los mismos. Además, hay fármacos o compuestos químicos conocidos que se pueden unir selectivamente a proteínas diana (p.ej., los antibióticos se pueden unir a bacterias). Los lipopéptidos, por ejemplo, son útiles para la detección de restos de lípidos en una célula, incluyendo orgánulos específicos o partes de orgánulos y bacterias interiorizadas en una célula. Los glucopéptidos, por ejemplo, interfieren en la agregación plaquetaria y, por tanto, se pueden usar para dirigir moléculas necesarias en la función plaquetaria, ayudando así en la investigación y el diagnóstico de las anomalías de coagulación. Los priones o las partes de los mismos se pueden usar, por ejemplo, como sondas para tejidos neurológicos. Asimismo, los priones pueden ser dianas en muestras fijadas.

En una realización preferida, la sonda se añade a la muestra en exceso de la diana (p.ej., 10:1, 100:1 ó 1000:1). Esto consiste en dirigir la reacción de hibridación eficazmente y promover una proporción alta de unión de sonda y diana.

El complejo sonda (que comprende, por ejemplo, ADN, ARN y/o ANP) se pone en contacto con la diana de la muestra (p.ej., ácidos nucleicos) de la muestra fijada, generalmente, mediante la adición de una solución de complejo sonda sobre la muestra. Las condiciones ejemplares apropiadas para la hibridación son soluciones que proporcionan el medio tamponado apropiado. Algunos ejemplos de los tampones de hibridación apropiados son:

- 1) un tampón que comprende aproximadamente entre el 10% y el 50% de formamida, 2 x SSC (pH 7,4) y NP40 al 1%;
- 2) un tampón que comprende tampón de GuSCN de aproximadamente entre 1,5M y 4M;

Un tampón patrón de GuSCN 5M se elabora a partir de GuSCN 5M, Tris-HCl 100mM (pH 7,8), EDTA 40mM, NP40 al 1%. Este tampón patrón se diluye hasta la molaridad indicada de GuSCN mediante la

adición de 1 x TE, pH 7,8, para producir las molaridades de tampón de GuSCN a las que se hace referencia anteriormente.

3) un tampón que comprende tampón de GuHCl aproximadamente entre 2M y 6M;

5 Un tampón patrón de GuHCl 8M se elabora a partir de GuHCl 8M, Tris-HCl 200mM (pH 7,8), EDTA 40mM, NP40 al 1%. Este tampón patrón se diluye hasta la molaridad indicada de GuHCl mediante la adición de 1 x TE, pH 7,8, para producir las molaridades de tampón de GuHCl a las que se hace referencia anteriormente.

4) un tampón que comprende una mezcla de formamida (20–50%) y tampón de GuSCN. (p.ej., 0,5M a 3M).

10 5) un tampón que comprende una mezcla de tampón de GuSCN (p.ej., 0,5M 3M) y tampón de GuHCl (p.ej., 1M a 5M).

15 La composición y la concentración específicas del tampón de hibridación varían con el tipo de sonda o complejo sonda usado. La composición y la concentración del tampón usado dependen, además, del p.f. (punto de fusión: la temperatura a la que el ADN bicatenario se separa formando dos cadenas sencillas complementarias) de la sonda, la secuencia de sonda, la longitud de la sonda y la temperatura de hibridación, y cualquier experto en la técnica puede determinarlas en el transcurso de una simple experimentación rutinaria.

20 La presente invención no se limita a una temperatura de hibridación en particular. Sin embargo, debería entenderse que el uso de formamida en el tampón de hibridación permite llevar a cabo la hibridación a una temperatura mucho menor que la de los protocolos de hibridación estándar. Por ejemplo, la hibridación de un complejo sonda medio específicamente con la diana (y no con células huésped) en tampón de hibridación acuoso, tal como cloruro de sodio, necesitaría generalmente una temperatura de aproximadamente 60–65°C. La misma hibridación realizada a aproximadamente 42°C en el líquido de hibridación 1) anterior proporcionaría una especificidad equivalente.

25 Asimismo, el uso de GuSCN también permite llevar a cabo la hibridación a una temperatura mucho menor que los protocolos de hibridación estándar. Por ejemplo, en un procedimiento medio, la hibridación de la sonda específicamente con la diana (y no con células huésped) en tampón de hibridación acuoso, tal como cloruro de sodio, necesitaría temperaturas de aproximadamente 60–65°C. En cualquiera caso, la misma hibridación realizada en el tampón de hibridación de GuSCN o de GuHCl anterior a aproximadamente 37°C proporcionará una especificidad de hibridación equivalente.

30 Una vez completada la hibridación, se aclara la sonda no hibridada de la muestra, generalmente, aplicando una serie de lavados con un tampón de lavado. Es competencia de los expertos en la técnica determinar los tampones de lavado y los tiempos de lavado apropiados. En una realización, el tampón de lavado comprende cloruro de sodio 0,3M, citrato de sodio 0,03M y SDS al 0,1%. Otro tampón de lavado apropiado comprende solución salina tamponada con fosfato (PBS).

35 Tras aclarar, se puede aplicar un colorante de contraste a la muestra. En una realización, la aplicación de un colorante de contraste en el fondo mejora la visualización de las sondas hibridadas. Los colorantes de contraste preferidos son, por ejemplo, DAPI, azul de Evans y permanganato de potasio. Los expertos en la técnica conocen otros colorantes de contraste apropiados. Esta etapa de tinción se aplica generalmente cuando se usa una sonda marcada fluorescentemente para detectar ácidos nucleicos, proteínas, glucoproteínas y lipoproteínas que son específicas de una diana. Aunque son útiles, los colorantes de contraste no son necesarios para las realizaciones de la presente invención.

40 La sonda se detecta mediante procedimientos adecuados para el resto específico usado para marcar el complejo sonda. El procedimiento preferido para detectar las sondas marcadas fluorescentemente emplea, por ejemplo, filtros de microscopio especiales de color verde, rojo y azul (i.e., microscopía fluorescente). Las sondas radiomarcadas hibridadas se pueden detectar, por ejemplo, mediante autorradiografía y diagnóstico de imágenes con fósforo. Las sondas marcadas con biotina se pueden detectar mediante sistemas de detección enzimáticos, y tales sistemas de detección se encuentran comercialmente disponibles.

50 El procedimiento descrito anteriormente permite la detección simultánea de diferentes patógenos de una sola muestra clínica llevando a cabo una reacción con un complejo sonda que está compuesto de una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico, cada una de ellas marcada con un resto marcador diferente. Para la detección simultánea de diferentes sondas de oligonucleótido que sean específicas de los diferentes ácidos nucleicos de las diferentes dianas que se encuentran comúnmente presentes en la muestra, es posible diseñarlas de manera que los valores del p.f. (punto de fusión) de todas las secuencias del complejo sonda sean muy similares. Luego se marca cada oligonucleótido específico con un resto detectable diferente (p.ej., diferentes restos fluorescentes). Se realiza la hibridación con múltiples componentes del complejo sonda. Se procesa la muestra hibridada según lo descrito anteriormente y se observa la muestra mediante procedimientos apropiados para la

detección de los diferentes oligonucleótidos marcados del complejo sonda (p.ej., los vistos con filtros apropiados si se usan diferentes restos fluorescentes) para detectar cuál de las dianas está presente en la muestra.

Los expertos habituales en la presente técnica reconocerán que el nuevo protocolo de pretratamiento para su uso con el protocolo de hibridación *in situ* descrito en la presente memoria es compatible con todos los procedimientos de detección anteriormente conocidos, así como con los descritos en la presente memoria, y que no queda limitado por el procedimiento de detección usado. Se ha aumentado la eficacia del protocolo de hibridación *in situ*, de manera que sean necesarias menos manipulaciones y, por tanto, se pueda realizar en poco tiempo. Las realizaciones de la presente invención también engloban kits que comprenden las composiciones de la presente invención. Tales composiciones, cuando se proporcionan en forma de kit, permitirán la práctica de diversas realizaciones de los protocolos presentados en la presente memoria, incluyendo aquéllos que han sido optimizados para simplificarlos y compatibilizarlos con una amplia variedad de procedimientos de detección. También se espera la aplicación de tales kits preparados que contienen reactivos y sondas específicamente preparados en laboratorios clínicos y de diagnóstico, en los que la capacidad para detectar la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos específicos serviría para identificar positiva o negativamente estados patológicos caracterizados por la presencia de dianas específicas.

Los procedimientos de diagnóstico disponibles de la técnica anterior para muchas patologías celulares dependen de evaluaciones microscópicas, parámetros morfológicos celulares, características de tinción y la presencia o ausencia de ciertas dianas. Sin embargo, muchos de estos procedimientos de diagnóstico no son completamente exactos o suficientemente sensibles. La hibridación *in situ* en la que se usa el protocolo y las sondas específicas de patógenos descritos anteriormente permitirán la identificación más fácil y exacta de dianas (incluyendo, pero no limitándose a, patógenos) en muestras.

La presente invención proporciona un protocolo de pretratamiento sencillo para su uso en protocolos de hibridación *in situ* que proporciona una mejor penetración de sondas en células y, por tanto, mejora la hibridación y las características de detección en comparación con los protocolos anteriormente descritos. Las mejoras incluyen maximizar la sensibilidad del análisis aumentando la eficacia de la hibridación y de la detección de la "señal" específica. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo en particular, se cree que el aumento de la sensibilidad se debe a la mejor hibridación debida a la mejor penetración de la sonda en las células y, al mismo tiempo, a la retención maximizada de la diana (p.ej., secuencias de ácidos nucleicos) en la célula o el tejido y a la maximización de la conservación de otras características bioquímicas y morfológicas de la célula o de la muestra de tejido.

Apartado experimental

Un uso preferido y no restrictivo del procedimiento anterior es el de la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en un cultivo o esputo. El experto en la técnica entenderá y apreciará que la nueva metodología es igualmente aplicable a una amplia variedad de otros sistemas, células, cultivos tisulares y tejidos para la hibridación de ácidos nucleicos específicos (o la detección de otros componentes celulares de las células, tejidos o patógenos diana) de interés con la conservación concomitante de la integridad y la morfología celular.

Ejemplo

Se preparó el cultivo o el esputo procesado del paciente en forma de frotis sobre una placa de vidrio y se secó al aire. Se lavaron las células cultivadas, y se concentraron mediante centrifugación. Se suspendieron las células lavadas en tampón de fosfato con ASB. Para desactivar las células, se llevaron las células suspendidas a punto de ebullición durante 15 minutos a 100°C.

Procedimiento de preparación de muestras 1

Se procesó esputo bien mediante 1) NALC/NaOH o 2) NALC/NaOH seguido por la ebullición del esputo procesado durante 15 minutos a 100°C para desactivar la muestra o 3) con una solución caotrópica, tal como clorhidrato o tiosulfato de guanidina (brevemente, se mezclaron 2-3 volúmenes de GuSCN 5M o GuHCl 8M con esputo). Se incubó la muestra a 37°C durante 20 minutos. Se centrifugó la muestra para sedimentar las células. Se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato. Se suspendieron las células lavadas en solución salina tamponada con fosfato con ASB al 1% o 4) una solución caotrópica, tal como clorhidrato o tiosulfato de guanidina, seguida por la ebullición (igual que en la etapa 3, anterior), a excepción de que se llevaron a punto de ebullición las células suspendidas en solución salina tamponada con ASB al 1% durante 15 minutos a 100°C para matar las micobacterias. Luego se dispuso el cultivo o la muestra de esputo preparados en forma de frotis sobre un portaobjetos de vidrio y se secó al aire.

Se fijó la muestra con metanol o ácido metanoacético o etanol. Se trató el frotis fijado con solución de IDF (según lo revelado anteriormente) durante 10 minutos. Tras 10 minutos, se lavó el frotis 3 veces con PBS y se secó al aire.

Procedimiento de preparación de muestras 2

Se mezcló un volumen de un esputo sin procesar del paciente con dos volúmenes de solución de IDF (anterior) en un tubo y se incubó a temperatura ambiente (20–25°C) durante 15 minutos. Luego se preparó la mezcla de esputo e IDF en forma de frotis sobre un portaobjetos de vidrio, se secó al aire y se fijó con metanol. Se omitió el tratamiento con IDF del frotis fijado antes de la hibridación. Antes de la hibridación, se lavó el portaobjetos con PBS tres veces.

Procedimiento de preparación de muestras 3

Se trató la mezcla de esputo e IDF fijada con metanol sobre un portaobjetos de vidrio con glutaraldehído al 2% en PBS durante 5 minutos a 20–25°C (temperatura ambiente), luego se aclaró con PBS tres veces y se secó al aire. Se omitió el tratamiento con IDF del frotis fijado antes de la hibridación.

Procedimiento de preparación de muestras 4

Se mezcló un volumen de un esputo sin procesar del paciente con dos volúmenes de solución de IDF (anterior) en un tubo y se incubó a 20–25°C (temperatura ambiente) durante 15 minutos. Se llevó la mezcla de esputo e IDF a punto de ebullición durante 15 minutos para liberar los ácidos nucleicos en la solución y, al mismo tiempo, convertir la muestra en no infecciosa. Es posible purificar ácidos nucleicos de la muestra llevada a ebullición mediante técnicas estándar o es posible seleccionar el ácido nucleico diana de interés mediante hibridación de sándwich usando sondas específicas y perlas magnéticas según lo descrito por Shah *et al.* (Shah J. S., King W, Liu J., Smith J., Serpe G. y Popoff S., (1997). "Assay improvements", patente estadounidense n.º 5.629.156, que se encuentra incorporada en la presente memoria por referencia). Se puede amplificar la diana purificada mediante PCR (para una diana de ADN) o RT-PCR (para una diana de ARN).

Sondado de muestras

Lo preferible es usar una sonda de oligonucleótido compuesta de una secuencia de ADN que se hibride específicamente con el ARN ribosómico 23S de *Mycobacterium tuberculosis* según lo descrito por Shah, Nietupski y Liu (patente estadounidense n.º 5.521.300) en la detección de la presencia de *M. tuberculosis* en células. Los ejemplos de un complejo sonda adecuado son:

P1: Sonda TB

5'–Verde rodamina–AGA–ACA–CGC–CAC–TATTCA– CAC–GCG–CGT–ATG–C–3' [SEC ID N.º 1] 66.5c

P2: Tb–1 51–2c

5'–Verde rodamina–TTC–GAG–GTT–AGA–TGCCC– 3' [SEC ID N.º 2]

P3: Sonda de micobacteria

5'–Tamra–ATC GCC CGC ACG CTC ACA GTT AAG CCG TGA GAT TTC–3' [SEC ID N.º 3] 68.7c

P4: Género *Mycobacterium* –54.1c

5'–Tamra–GCA–TTA–CCC–GCT–GGC–3' [SEC ID N.º 4]

P5: Sonda Burkholderia

5'–FAM–CTT–GGC–TCT–AAT–ACA–GTC–GG–3' [SEC ID N.º 5] tm52c

Sonda de ANP

En una realización, se puso en contacto este complejo sonda con los ácidos nucleicos de la muestra fijada/pretratada en un tampón de hibridación de GuSCN 2,5M, Tris 50mM (pH 7,8), EDTA 20mM y NP40 al 1% a 37°C. En una realización alternativa, se puso en contacto este complejo sonda con los ácidos nucleicos de la muestra fijada en un tampón de hibridación de formamida al 50%, 2 x SSC (pH 7,4), EDTA 20mM, NP40 al 1% a 42°C.

Los ejemplos de secuencias de oligonucleótidos adecuadas para su uso en los complejos sonda alternativos para la detección de las especies del género *Mycobacterium* son:

P2: Tb–1 51–2c

5'–Verde rodamina–TTC–GAG–GTT–AGA–TGCCC– 3' [SEC ID N.º 2]

P3: Sonda de micobacteria

5'-Tamra-ATC GCC CGC ACG CTC ACA GTT AAG CCG TGA GAT TTC-3' [SEC ID N.º 3] 68.7c

P4: Género *Mycobacterium* -54.1c

5'-Tamra-GCA-TTA-CCC-GCT-GGC-3' [SEC ID N.º 4]

5 Las SEC ID N.º 3 y 4, y sus complementos son adecuados para la detección de las especies del género *Mycobacterium*. Las SEC ID N.º 1 y 2, y sus complementos, son adecuados para la detección de *M. tuberculosis*. La SEC ID N.º 5 es adecuada para la detección de la especie *Burkholderia*.

10 La secuencia de ARN ribosómico se selecciona para su uso en la detección de patógenos de micobacterias debido a la gran abundancia de ARNr en las células bacterianas (1.000-10.000 copias). Preferiblemente, el oligonucleótido del complejo sonda es un ADN con una secuencia complementaria al ARNr de *M. tuberculosis*. El oligonucleótido se marca preferiblemente en el extremo 3' y 5' con fluoresceína. Se reconocerá que también se puede usar una sonda de oligonucleótido de ARN.

15 Según lo tratado anteriormente, la cantidad de la sonda total es una cantidad predeterminada que debería superar la cantidad estimada del ARNr disponible que se cree que hay en la muestra (aproximadamente 100:1) para conducir la reacción de hibridación eficazmente y fomentar una alta proporción de apareamiento entre sonda y diana. En términos cuantitativos, esto requiere el uso de una sonda compuesta de un oligonucleótido largo de 30 nucleótidos en concentraciones que varían de 1-10 µg/ml para producir una señal fiable sobre el fondo.

20 Se ha de entender que el uso de GuSCN también permite llevar a cabo la hibridación a una temperatura mucho menor que los protocolos de hibridación estándar. La hibridación de la sonda especificada específicamente con la diana (y no con células huésped) en líquido de hibridación acuoso, tal como cloruro de sodio, necesitaría generalmente una temperatura de aproximadamente 60-65°C. Sin embargo, la hibridación realizada en el tampón de hibridación de GuSCN o de GuHCl anterior a aproximadamente 37°C garantiza una especificidad.

25 Una de las ventajas del procedimiento de hibridación *in situ* es que cantidades relativamente pequeñas de células comprenden una muestra y es posible procesar grandes cantidades de muestras idénticas en un corto período de tiempo. El exclusivo procedimiento de hibridación *in situ* es sumamente sencillo. Los procedimientos de la presente invención también se pueden aplicar a cualquier tipo de muestra, incluyendo, pero no limitándose a secciones tisulares introducidas en parafina y muestras fijadas con acetona.

30 Los resultados de estos experimentos muestran la detección de la diana (ADN de patógeno) en las muestras analizadas y la no detección de la diana en las muestras control. La detección de la diana es sistemáticamente mejor en las muestras tratadas con las soluciones de IDF de la presente invención. El experto en la técnica valorará, entenderá y sabrá que las soluciones de IDF de la presente invención se pueden usar en cualquier situación que requiera una entrada efectiva de sonda (u otro objeto similar) en una célula, patógeno (p.ej., ubicado en una célula) u orgánulo sin necesidad de experimentación.

35 Según lo anterior, ha de resultar evidente que la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para aumentar la permeabilidad de células, paredes celulares, membranas celulares, orgánulos y membranas de orgánulos para ayudar, por ejemplo, en la detección de componentes celulares y/o patógenos.

REIVINDICACIONES

- 1.– Una composición para aumentar la permeabilidad de paredes celulares, membranas celulares y membranas nucleares, composición que comprende: GuSCN (tiocianato de guanidina), Tris–HCl, EDTA, IGEPAL (octilfenoxipoli(etileno)etanol), ácido acético, metanol, colato de sodio y desoxicolato de sodio.
- 5 2.– La composición de la reivindicación 1, en la que:
- a) dicho GuSCN está a una concentración de aproximadamente 2,0 a 3,3M; y/o
 - b) dicho Tris–HCl está a una concentración de aproximadamente 10 a 100mM; y/o
 - c) dicho Tris–HCl está a un pH de aproximadamente 7,0 a 9,0; y/o
 - d) dicho EDTA está a una concentración de aproximadamente 5 a 50mM; y/o
 - 10 e) dicho IGEPAL está a una concentración del aproximadamente 0,1 al 2,0 por ciento; y/o
 - f) dicho ácido acético está a una concentración del aproximadamente 1,0 al 10 por ciento; y/o
 - g) dicho metanol está a una concentración del aproximadamente 20 al 50 por ciento; y/o
 - h) dicho colato de sodio está a una concentración del aproximadamente 0,02 al 2,5 por ciento; y/o
 - i) dicho desoxicolato de sodio está a una concentración del aproximadamente 0,02 al 2,5 por ciento.
- 15 3.– Un procedimiento para teñir una diana en una célula que comprende:
- a) poner en contacto la célula con una composición que comprende GuSCN (tiocianato de guanidina), Tris–HCl, EDTA, IGEPAL (octilfenoxipoli(etileno)etanol), ácido acético, metanol, colato de sodio y desoxicolato de sodio para crear una célula permeabilizada;
 - 20 b) poner en contacto la célula permeabilizada de la etapa (a) con un agente de unión específico de la unión con dicha diana; y
 - c) detectar dicho agente de unión de la etapa (b).
- 4.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha diana se selecciona de un grupo que consiste en ácidos nucleicos, ácidos nucleicos de péptidos, péptidos, glucoproteínas, lípidos, lipoproteínas, virus y priones.
- 25 5.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho agente de unión se selecciona de un grupo que consiste en ácidos nucleicos, ácidos nucleicos de péptidos, péptidos, lipoproteínas, glucoproteínas y lípidos; y/o dicho agente de unión comprende además un resto de detección; y en cuyo caso, opcionalmente, en el que el resto de detección se selecciona de un grupo que consiste en marcadores fluorescentes, marcadores radiactivos, tintes, metales coloidales, biotina/avidina y peroxidasa de rábano picante.
- 30 6.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha detección se realiza mediante un anticuerpo marcado con afinidad por dicho agente de unión.
- 7.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la composición comprende la composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 8.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha diana es un ácido nucleico del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*.
- 35 9.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho agente de unión es un oligonucleótido complementario a un ácido nucleico del microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*.
- 10.– El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho procedimiento comprende además la tinción del fondo.