

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 948**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2011** **E 11721993 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014** **EP 2563935**

54 Título: **Procedimiento de hibridación in situ y tampón**

30 Prioridad:

30.04.2010 US 343596 P

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

09.06.2014

73 Titular/es:

**EXIQON A/S (100.0%)
Skelstedet 16
2950 Vedbaek, DK**

72 Inventor/es:

**NIELSEN, BOYE SCHNACK;
JØRGENSEN, STINE;
SKOUV, JAN;
BAKER, ADAM y
MØLLER, SØREN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 465 948 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 de hibridación in situ y tampón

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere al campo de la hibridación in situ (ISH) sobre secciones tisulares. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento mejorado de hibridación in situ que está basado en una formulación mejorada del tampón de hibridación in situ, siendo al menos parte de dichas formulaciones no tóxicas. Junto con el Ácido Nucleico Bloqueado (LNA), que comprende sondas de ISH, el tampón de ISH mejorado es útil para la detección de moléculas de ácido nucleico específico tales como ARNm, ARNr y en particular ARN pequeño que no es de codificación así como también en la preparación de kits de ISH destinados a la detección de dicho ARN pequeño que no es de codificación. Además, se describe un procedimiento de ISH semi-cuantitativa y la demostración del potencial diagnóstico de ISHs semi-cuantitativas.

Antecedentes de la invención

- 15 La hibridación in situ (ISH) de muestras tisulares es una técnica de hibridación de ácidos nucleicos usada para investigar y localizar ácidos nucleicos diana en estructuras morfológicamente conservadas, por ejemplo, dentro de una célula, un tejido, un núcleo o un cromosoma.

- Actualmente, la mayoría de las muestras patológicas se fijan de forma rutinaria y se intercalan con parafina para permitir el análisis histológico y para el almacenamiento. Se estima que la fijación con formalina y el intercalado con parafina se usan en más de un 90 % de las muestras de ensayo preparadas por los laboratorios clínicos en la preparación de muestras de ensayo para la diagnosis histológica. Los archivos de muestras de ensayo de tejidos intercaladas con parafina y fijadas con formalina bien anotadas (FFPE) son recursos inestimables para los estudios retrospectivos de enfermedades humanas, no obstante se sabe que el procedimiento FFPE así como el almacenamiento de las muestras introduce efectos adversos en la calidad del ARN (Ahlfen y col. (2007) PLoS ONE 2(12) : e 1261). La fijación con formalina transcurre relativamente lenta, un tiempo de fijación de 16-24 h resulta convencional, y tiene como resultado una inactivación relativamente lenta de los ARNasas endógenas que invariablemente provoca cierta degradación de ARN. No obstante, numerosos estudios han mostrado que se puede usar la fijación con formalina así como otras fijaciones basadas en aldehído tales como muestras de ensayo fijadas con paraformaldehído y glutaraldehído para la hibridación in situ de ARN.

- Se han descrito varios procedimientos para ISH sobre tejidos intercalados con parafina y fijados con formalina; de manera interesante todos los protocolos están formados por una etapa de hibridación en una formamida que comprende un tampón de hibridación. La formamida también se menciona como el componente de la mezcla de hibridación en los documentos EP 440.749 B1, EP 432.221 B1, US 5.521.061 y US 5.750.340 así como también en los documentos sobre ISH preparada sobre muestras de ensayo de FFPE de archivo conocidos por el inventor. No obstante, de manera importante, la formamida se caracteriza como sustancia teratogénica que debería evitarse.

- 35 Recientemente, se ha identificado un gran número de genes de ARN que no son de codificación y se han designado como microARNs (miARNs o miRs) (para revisión, véase Ke y col. 2003, Curr. Opin. Chem. Biol. 7:516-523). Normalmente, son ARNs de 17-24 nucleótidos (nt) de largo que se procesan a partir de fracciones transcritas de horquilla endógenas más largas. Hasta la fecha, se han identificado más de 6000 miRs en humanos, lombrices, moscas de la fruta y plantas de acuerdo con la base de datos de registro de miR liberada el 11 de abril de 2008, albergada en Sanger Institute, Reino Unido.

- 45 KLOOSTERMAN W.P. y col. (NATURE METHODS, vol. 3, nº. 1, 1 de enero de 2006 (2006-01-01), páginas 27-29) describe la detección *in situ* de miARNs en embriones animales usando sondas de oligonucleótidos modificadas con LNA. YAMAMICHI y col. (CLINICAL CANCER RESEARCH, vol 15, nº. 12, 15 de junio de 2009 (2009-06-15) páginas 4009-1016) describe análisis de hibridación *in situ* de la expresión miR-21 durante el desarrollo de cáncer colorectal usando sondas de LNA.

- La importancia de microARNs en el cáncer se destaca en un artículo reciente (Barbarotto y col 2008 Int. J. Cancer. 122:969-977) que resume los paradigmas principales de la implicación de miARN en los cánceres en humanos. De este modo "(i) miARNs se alteran en todos los tipos de cáncer humanos analizados; (ii) miARNs actúa como supresores de oncogenes y tumores; (iii) las alteraciones de miARNs pueden provocar predisposición al cáncer; (iv) el perfil de miARNs es una nueva herramienta de diagnóstico para los pacientes con cáncer y (v) el perfil de miARN representa herramientas de pronóstico para los pacientes con cáncer". Por consiguiente, se necesitan procedimientos, en particular procedimientos de ISH, que se puedan usar en la localización de la expresión y cuantificación de microARNs en células específicas y tejidos de pacientes con cáncer.

- 55 Parte de la atención reciente se ha puesto en los ARNs pequeños dentro del intervalo de 17 a 25 nt y esto se debe al fenómeno de interferencia de ARN (ARNi). ARNi es el mecanismo por el cual el ARN bicatenario conduce a la degradación de cualquier ARN que sea homólogo. ARNi está basado en un mecanismo celular antiguo y complejo

que probablemente evolucionó para la protección frente a ataques víricos y elementos genéticos móviles. Una etapa crucial del mecanismo de ARNi es la generación de ARNs interferentes cortos (siARN) que son ARNs bicatenarios que tienen una longitud cada una de 22 nt.

5 La cuantificación de microARNs y siARNs por medio de procedimientos de ISH es muy desafiante debido al pequeño tamaño de los ARN. Además, se requiere una elevada especificidad debido a que los ARN pequeños diferentes pueden únicamente diferir con respecto a un nucleótido individual, pero presentan protocolos-ISH de día para las muestras de FFPE que con frecuencia sufren de pérdida de sensibilidad o elevados niveles de fondo.

De este modo, un procedimiento mejorado para detectar ARNs pequeños que no son de codificación por medio de ISH en muestras de ensayo intercaladas con parafina resulta altamente necesario.

10 La presente invención proporciona un procedimiento de ISH rápido, robusto y mejorado para la detección de ARNs que no son de codificación en muestras de FFPE. El procedimiento evita usar formamida teratogénica al tiempo que proporciona resultados de ISH incluso mejores que los obtenidos con tampones de hibridación que comprenden formamida convencional. Además, el procedimiento tiene la ventaja de que se puede usar para la cuantificación de ARNs pequeños que no son de codificación por medio de ISH en muestras de FFPE de archivo.

15 Sumario

Antes de la presente invención, los presentes inventores pensaban que la formamida era un componente indispensable de una mezcla de hibridación ISH satisfactoria.

20 No obstante, los presentes inventores, sorprendentemente, han observado que se puede sustituir formamida por determinadas sustancias caotrópicas tales como, por ejemplo, urea e hidrocloreuro de guanidina para obtener resultados de ISH incluso mejores que los obtenidos con tampones de hibridación que comprenden formamida convencional.

25 De este modo, en un primer aspecto, se describe un procedimiento para la detección de moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos contigua tal como ARNm por medio de hibridación in situ en muestras celulares fijas, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de hibridación que se lleva a cabo en un tampón de hibridación libre de formamida que comprende un componente caotrópico seleccionado entre el grupo de sales de urea, guanidinio o guanidina y una mezcla de dos o más miembros del grupo.

30 En una realización preferida, se describe un procedimiento para la detección de ARNs pequeños que no son de codificación por medio de hibridación in situ en muestras de ensayo celulares fijadas que comprende una etapa de hibridación que se lleva a cabo en un tampón de hibridación libre de formamida que comprende un componente caotrópico seleccionado entre el grupo de urea, sales de guanidinio o guanidina y una mezcla de dos o más miembros del grupo.

En otra realización preferida, se usa el tampón de hibridación libre de formamida mejorado para detectar moléculas de ácido nucleico en secciones tisulares (FFPE) intercaladas con parafina y fijadas con formalina o en secciones tisulares congeladas (criostat).

35 En un segundo aspecto, se proporciona un tampón de hibridación libre de formamida para el uso de detección de moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos contigua tales como ARNm, ARNr o ARNs pequeños que no son de codificación, en secciones tisulares con sondas, en particular con sondas de LNA, por medio de hibridación in situ, comprendiendo el tampón de 0,5 a 5 M de un componente caotrópico seleccionado entre el grupo formado por un urea y sales de guanidinio (o guanidina) o una mezcla de dos o más miembros del grupo.

40 En un aspecto preferido se proporciona un tampón de hibridación libre de formamida para detectar moléculas de ácido nucleico en secciones tisulares intercaladas con parafina y fijadas con formalina (FFPE).

45 También se proporciona un kit para la detección de al menos ARNs pequeños que no son de codificación en un tejido intercalado con parafina y fijado con formalina (FFPE) por medio de hibridación in situ, comprendiendo dicho kit un tampón de hibridación libre de formalina mejorado y al menos una sonda de LNA optimizada para la detección específica de dicho ARN pequeño que no es de codificación.

50 Otra ventaja de los procedimientos descritos en la presente memoria es su robustez y su baja varianza que permiten su uso para hibridación in situ semi-cuantitativa, lo que permite diagnósticos asociados a miARN tales como para un procedimiento de estimación/evaluación de supervivencia libre de enfermedad en cáncer de colon de estadio II que comprende:

a) determinar el nivel relativo de miR-21 en al menos una sección tisular representativa a partir de cáncer de colon de estadio II de dicho paciente determinado por medio del procedimiento de la reivindicación 7,

b) comparar el nivel de miR-21 en el paciente con un conjunto de niveles relativos de miR-21 obtenidos por medio del procedimiento de la reivindicación 7 a partir de un panel de referencia de muestras de cáncer de colon

de estadio II obtenidas a partir de un panel de pacientes con historia de enfermedad conocida,

c) agrupar el panel de referencia en terciles de acuerdo con el nivel relativo de miR-21 determinado por medio del procedimiento de la reivindicación 7; y

5 d) tomar el nivel de miR-21 de dicha al menos una sección tisular representativa procedente del tumor de colon en estadio II de dicho paciente que cae dentro del nivel de miR-21 del tercil superior (de expresión elevada) como indicativo de una mayor probabilidad de supervivencia corta libre de enfermedad, y tomar un nivel de miR-21 de dicha al menos una sección tisular representativa procedente de tumor de colon de estadio II procedente de dicho paciente que cae dentro del nivel de miR-21 del tercil inferior (de expresión baja) como indicativo de una mayor probabilidad de supervivencia larga libre de enfermedad.

10 Definiciones

Antes de una discusión de las realizaciones detalladas se proporciona una definición de los términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

ARNs pequeños que no son de codificación.

15 Los términos "miARN" y "microARN" se refieren a ARNs que no son de codificación de 17-25 nt. Se procesan a partir de precursores de tipo horquilla más largos (aproximadamente 75 nt) denominados pre-ARNs. Los microARNs se ensamblan en complejos denominados miRNPs y reconocen sus dianas por medio de complementariedad antisentido. Si los microARNs se adaptan al 100 % con su diana, entonces la complementariedad es completa, el ARNm experimenta escisión con la mayor probabilidad, y el miARN actúa como siARN. Si el encaje es incompleto, es decir, la complementariedad es parcial, entonces la translación del ARNm diana queda bloqueada con la mayor probabilidad.

20 Las expresiones "ARNs interferentes pequeños" o "siARNs" se refieren a ARNs de 21-25 nt procedentes del procesamiento de ARN bicatenario lineal. Los siARNs se ensamblan en complejos denominados RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) y secuencias de ARN complementario homólogo para la escisión endonucleolítica. Los siARNs sintéticos también reclutan RISCs y son capaces de escindir secuencias de ARN complementario homólogo.

25 La expresión "interferencia de ARN" (ARNi) se refiere a un fenómeno en el que el ARN bicatenario homólogo a un ARNm diana conduce a la degradación de ARNm diana. Definido más ampliamente como degradación de los ARNm diana por medio de siARNs complementarios parcial o completa. Los microARNs (miARN o miR) son una clase abundante de ARNs endógenos cortos que actúan como reguladores pos-transcripcionales de la expresión génica por medio de emparejamiento de bases con su ARNs diana.

30 La expresión "ARN mensajero" o ARNm se usa en la técnica para describir el tipo de ARN que experimenta transcripción a partir de una matriz de ADN, y que transporta la información de codificación a los sitios de la síntesis de proteínas, los ribosomas.

La expresión "ARN ribosómico" (ARNr) se refiere al componente de ARN del ribosoma.

35 Hibridación in situ

La "hibridación in situ" es una técnica que proporciona la detección específica de moléculas de ácido nucleico dentro de células individuales, secciones tisulares o incluso cantidades completas (es decir, organismos completos, embriones, órganos, etc.) normalmente depositados sobre un soporte sólido, en secciones de flotación o sumergidos.

40 Muestra de ensayo celular

45 La expresión "muestra de ensayo celular" indica una muestra de células. Incluye, pero sin limitarse a, una sección tisular, tipos específicos de células aisladas a partir de secciones tisulares (por ejemplo, por medio de micro-dissección con captura de láser), una citospina, un frotis celular, una muestra de células obtenida a partir de una proliferación celular o una de sus mezclas. Los términos engloban muestras independientemente de su condición física; afirmado de manera diferente, los términos no excluyen material en virtud de su estado físico (tal como, pero sin limitarse a, congelado o teñido o tratado de otro modo).

Muestra de ensayo celular fijada

50 Por el término "fijada" o la expresión "muestra de ensayo celular fijada" se hace referencia al proceso en el cual se conservan las muestras de ensayo celulares al tiempo que se mantiene la estructura histológica de la muestra de ensayo. La fijación de las muestras de ensayo celulares se puede lograr por medio de varias fijaciones de reticulación para formar reticulaciones en el tejido, por medio de alcohol y acetona para coagular y deshidratar la muestra de ensayo, o por medio de citoconservación. Las fijaciones de reticulación incluyen formaldehído, glutaraldehído, paraformaldehído, etildimetil-aminopropil-carbodiimida y dimetilsisericimidato.

Por medio de las expresiones "fijada con aldehído" y "muestra celular fijada con aldehído" se hace referencia al proceso por el cual se fijan las muestras de ensayo celulares por medio de fijaciones de aldehído como formalina (formaldehído), glutaraldehído o paraformaldehído.

Muestra de ensayo FFPE

- 5 Significa muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada con formalina. La muestra de ensayo FFPE (con frecuencia denominada muestra de ensayo FFPE de archivo, muestra de ensayo fijada de forma rutinaria, FFPEs o bloques-FFPE) se procesa de forma rutinaria en los hospitales.

Fijada de forma rutinaria

- 10 Significa fijación de acuerdo con los patrones en los departamentos de patología que normalmente usan una fijación de 1-3 días de muestras de ensayo clínicas en formalina tamponada neutra de un 10 % (es decir, formaldehído (0,32 M) de un 4 % en disolución salina tamponada de fosfato, pH de alrededor de 7) a temperatura ambiente. Nuevos procedimientos de fijación rápida, que por ejemplo implican la fijación basada en microondas, se están haciendo rutinarios y de este modo se encuentran comprendidos en la presente definición.

Muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria

- 15 Significa cualquier pieza de tejido de origen eucariota, tomada por medio de disección, biopsia, muestra de sangre, etc, que en primer lugar se inmoviliza espacialmente por medio de reticulaciones de sus macromoléculas en posiciones bloqueadas y posteriormente se intercala en parafina para evitar la degeneración. Dicha muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada se puede almacenar a temperatura ambiente durante años y se pueden preparar secciones a partir de la misma con un espesor normalmente dentro del intervalo de 3-6 μm por medio de
20 corte y se pueden transferir a un soporte sólido para la evaluación citológica y patológica, histológica y molecular aguas abajo. Para evitar el tejido de duda formado por la presente definición, se incluyen muestras de ensayo de FFPE.

Componente caotrópico.

- 25 En el presente contexto la expresión "componente caotrópico" se refiere a un "agente caotrópico", también conocido como "reactivo caotrópico" o un "caótroto", que es cualquier sustancia química que altere la estructura ordenada de agua líquida. El agente caotrópico también altera la estructura tri dimensional de las macromoléculas incluyendo, pero sin limitarse a, proteínas, AND o ARN. Sales caotrópicas preferidas son, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio. Otro agente caotrópico preferido es urea.

Salas de guanidinio o guanidina

- 30 Incluyen pero sin limitarse a tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio.

Moléculas de ácido nucleico

En el presente contexto "moléculas de ácidos nucleicos" se refiere a polímeros de ácido nucleico, tales como ARN, ADN o polímeros que comprenden o que consisten en análogos de nucleótidos (tales como oligonucleótidos de LNA)

- 35 Hibridación

- "Hibridación" se refiere a la unión de dos polímeros de ácido nucleico monocatenario complementarios, (tal como oligonucleótidos), tales como ARN, ADN o polímeros que comprenden o consisten en análogos de nucleótidos (tales como oligonucleótidos LNA). La hibridación es altamente específica, y se puede controlar por medio de regulación de las concentraciones de sales y temperatura. La hibridación tiene lugar entre secuencias complementarias, pero
40 también puede tener lugar entre secuencias que comprenden desajustes. Los oligonucleótidos usados en los procedimientos de la presente invención pueden, por tanto ser un 100 % complementarios con la molécula diana. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden comprender desajustes.

T_m

- 45 El término "T_m" o "temperatura de fusión" de un oligonucleótido mide la estabilidad de una dupla de ADN formada entre el oligonucleótido y su hebra de ADN complementario perfecto. T_m se define como la temperatura a la cual se disocia un 50 % de las duplas de ADN entre el oligonucleótido y su hebra de ADN complementaria para dar lugar a hebras individuales. La longitud y la composición de nucleótidos, tal como la secuencia de nucleótidos y el contenido de nucleótidos G y C, del oligonucleótido son factores importantes que afectan a T_m. La sustitución de los nucleótidos normales A, G, C y T con las moléculas de LNA correspondientes en un oligonucleótido aumenta T_m. De
50 forma similar, las condiciones de hibridación definidas por medio de concentración de sal, concentración de oligonucleótido, y la presencia de agentes de desnaturalización (tales como formamida o DMSO) afecta a T_m. Los expertos en la técnica de biología molecular saben que se han desarrollado varias fórmulas útiles para el cálculo de T_m teórica, con el fin de evaluar T_m de un oligonucleótido para PCR, inmunoensayos Norte y Sur, e hibridación in

situ. Ejemplos de calculadoras de Tm son OligoCalc (W. A. Kibbe (2007) Nucleic Acids Res Volumen 35, Web Server número W43-E46) y el LNA Probe Tm Predictor en <http://www.exiqon.com>.

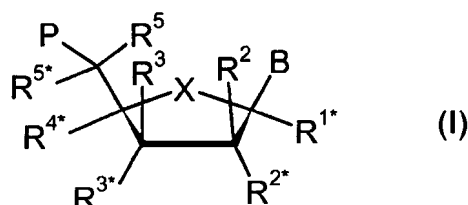
Sonda

En las realizaciones normales de la presente memoria, "sonda" es un agente de captura que está dirigido a un polinucleótido, por ejemplo un microARN. Normalmente la sonda es un polinucleótido en sí mismo. El polinucleótido al cual se dirige la sonda se denomina en la presente memoria como "diana". Si se "dirige" un polinucleótido, por ejemplo una sonda, o es "específico para" una diana, el polinucleótido tiene una secuencia que es complementaria a una secuencia en la diana y se une de forma específica (es decir, se hibrida) a esa diana en condiciones de hibridación. Normalmente, las condiciones de hibridación están seleccionadas para producir pares de unión de ácidos nucleicos, por ejemplo, sondas y dianas, de complementariedad suficiente para proporcionar el nivel deseado de especificidad en el ensayo al tiempo que son incompatibles con la formación de pares de unión entre los miembros de unión de complementariedad insuficiente para proporcionar la especificidad deseada. Normalmente, dichas condiciones de hibridación se conocen en la técnica. Ejemplos de dichas condiciones de hibridación apropiadas también se describen en la presente memoria para la hibridación de una sonda con un ácido nucleico dentro de células individuales o secciones tisulares depositadas sobre un soporte sólido. Normalmente, la diana es miARNs para las realizaciones comentadas en la presente memoria.

Ácido nucleico Bloqueado (LNA)

Por "ácido nucleico bloqueado", "LNA" se entiende un nucleósido o un análogo de nucleótido que incluye al menos un monómero LNA. Por "monómero LNA" o "nucleósido LNA" o "nucleótido LNA" se hace referencia a un nucleósido o análogo de nucleótido en el que la parte de ribosa está modificada para formar una estructura bicíclica como se divulga en la solicitud de PCT WO 99/14226.

Los monómeros LNA tal como y como se divulgan en la Publicación PCT WO 99/14226 son en general ácidos nucleicos modificados particularmente deseables para la incorporación en un oligonucleótido con el fin de mejorar su funcionalidad como sonda. Adicionalmente, los ácidos nucleicos se pueden modificar en el extremo 3' y/o 5' por cualquier tipo de modificación conocida en la técnica. Por ejemplo, se pueden marcar cualquiera o ambos extremos con un resto de digoxigenina. Los monómeros de LNA deseables, los nucleósidos LNA y los nucleótidos LNA y su procedimiento de síntesis se describen en los documentos US 6.043.060, US 6.268.490, las publicaciones PCT WO 01/07455, el documento WO 01/00641, WO 98/39352, WO 00/56746, WO 00/56748, WO 00/66604 y WO 03/020739 y similares. Los monómeros de LNA preferidos, también denominados como "oxi-LNA" son LNAs en los cuales el puente entre R4* y R2* como se muestra en la fórmula (I) del documento WO 99/14226 y también se muestra a continuación, juntos designan -CH2-O- o -CH2-CH2-O-.



Oligo

Por "oligonucleótido", "oligómero" u "oligo" se hace referencia a una cadena sucesiva de monómeros (por ejemplo, glicósidos de bases heterocíclicas) conectada por medio de enlaces internucleósido. Un oligo que incluya al menos un monómero LNA puede ser denominado como "LNA".

En el presente contexto, el término "nucleobase" cubre las nucleobases de origen natural así como también las nucleobases que no son de origen natural. De este modo, "nucleobase" no solo incluye la purina conocida y los heterociclos de pirimidina, sino también sus análogos heterocíclicos y tautómeros. Ejemplos ilustrativos de nucleobases son adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina y 5-metilcitosina.

En las secuencias de ácido nucleico descritas en el presente documento se muestran los monómeros de LNA en letras mayúsculas (T, A, G) y los monómeros de AND en minúsculas (t, a, c, g). Los monómeros de LNA modificados incluyen 5' metil citosina mostrada como C mayúscula.

Las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, pero a modo de ejemplo únicamente.

Descripción detallada

Se proporciona un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos dentro de células individuales o secciones tisulares depositadas sobre un soporte sólido.

Como se ha comentado anteriormente, los presentes inventores han considerado inicialmente formamida como un componente indispensable de una mezcla de hibridación ISH satisfactoria. No obstante, en confrontación con los efectos genotóxicos generalmente aceptados para formamida (EU Dangerous Substances Directive (67/548/EEC), se buscaron alternativas.

- 5 Para su sorpresa, descubrieron que la sustitución de formamida por un componente caotrópico seleccionado entre el grupo de urea, sales de guanidinio o guanidina en la mezcla de hibridación ISH abrió camino hacia un procedimiento mejorado para la detección de ARNs pequeños que no son de codificación por medio de la hibridación in situ de muestras de ensayo celulares fijadas. Un tipo particular de ARNs pequeños que no son de codificación son miARN. Como se ilustra en los ejemplos, el procedimiento proporciona detección in situ específica por medio de sondas de
- 10 LNA no radioactivas para miARN incluso en secciones tisulares convencionales intercaladas con parafina y fijadas con formalina (FFPE) y el Ejemplo particular 5 muestra que el procedimiento presente da lugar a unos resultados de rendimiento que son superiores a los obtenidos con una mezcla de hibridación de ISH que comprende formamida.

- Aunque irritante, guanidinio no se menciona en la EU Dangerous Substances Directive (67/548/EEC) y se usa hidrocloreuro de guanidina en el tratamiento de la condición neuromuscular denominada síndrome miasténico de
- 15 Lambert-Eaton en dosificaciones de hasta 40 mg/kg/día (documento US 7.521.479) que indican que guanidinio es relativamente no tóxico para humanos. No obstante, mientras que el ejemplo 6 muestra que las sales de guanidinio o guanidina pueden sustituir a formamida en el procedimiento, la realización preferida del procedimiento es una en la que el componente caotrópico de la mezcla de hibridación de ISH es urea.

- La urea se considera en general como no tóxica. La urea se usa ampliamente como componente activo en varios
- 20 productos de tratamiento cutáneo, y cuando se usa como diurético se puede proporcionar en dosificaciones de aproximadamente 1 a 2 g/kg/día, incluso se puede inyectar o se puede someter a infusión (documento US 7.521.479).

Además, los ejemplos ilustran un procedimiento en el que el componente caotrópico de la mezcla de hibridación ISH es urea y aparece como superior a una en la que el componente caotrópico es hidrocloreuro de guanidina (Ejemplo 6).

- 25 El tamaño pequeño (aproximadamente 22 nt) y con frecuencia el bajo nivel de expresión de miARNs diferentes requieren el uso de sondas sensibles para la detección por medio de ISH. Como se describe en el documento WO 06/069584, las sondas de LNA son particularmente apropiadas para servir para esta finalidad y el uso de LNA tiene como resultado sondas de sensibilidad mejorada y especificidad de secuencia elevada, especialmente para secuencias diana de ARN pequeño. Por consiguiente, en una realización preferida la sonda de hibridación in situ contiene uno o más monómeros de ARN. Las sondas de hibridación in situ que comprenden LNA en las que la sonda se marca tanto en los extremos 3' como 5' con digoxigenina (DIG) son particularmente preferidas. Como se muestra en los ejemplos, se obtuvieron excelentes resultados con sondas de LNA relativamente cortas, que comprendían aproximadamente un 30 % de monómeros de LNA.

- En general, el procedimiento no depende del marcaje de las sondas de hibridación. La sonda se puede marcar
- 35 también con estreptavidina, biotina o un compuesto para el cual los anticuerpos específicos se encuentran disponibles que incluye: fluoresceína; dinitrofenol; anfetamina; barbiturato; acetaminofeno; acetohexamida; desipramina; lidocaína; cloroquinina; quinina; ritalina; fenobarbital; fenitoína; fentanilo; feniclidina; metafetamina; metanifrina; digoxina; penicilina; tetrahidrocanibinol; tobramicina; nitrazepam; morfina; rojo de Texas; TRITC; primaquina; progesterona; bendazac; carbamacepina; estradiol; teofilina; metadona; metotrexato; adosterona;
- 40 norestisterona; salicilato; varfarina; cortisol; testosterona; norritilina; propanolol, estrona; androstenediona, biotina, tiroxina y triyodotironina, biotina o digoxigenina. También se contemplan sondas marcadas con metal (sondas marcadas con oro) o marcadas radioactivas.

En una realización particularmente preferida, el procedimiento comprende una etapa de hibridación en la que la muestra de ensayo se pone en contacto con una disolución de hibridación que comprende:

- 45 - al menos una sonda marcada no radiactiva que comprende 7-22 nucleótidos que son capaces de hibridar hasta una secuencia de ARN específica.

- un agente de estabilización seleccionado para formar el grupo de sales de cationes mono- y divalentes. Las sales preferidas son citrato de sodio y cloruro de sodio opcionalmente tamponadas por ejemplo con fosfato. En una realización preferida, el agente de tamponado o de estabilización híbrido es SSC (SSC, 1 x = cloruro de sodio 0,15 M y citrato de sodio 0,015 M). Preferentemente, SSC se usa a una concentración de 1 a 8 x, tal como entre 1,5 y 5x, y 4 x o 2 y 3x. Se prefiere SSC 2,5x para la hibridación in situ hasta dianas de miARN cuando se usan las sondas de LNA descritas en el presente documento.
- 50

- urea a una concentración entre 0,5 y 5 M; como se ilustra en el Ejemplo 3 se obtuvieron resultados excelentes con respecto al intervalo completo entre 0,5 y 4 M tal como entre 1 y 3 M. Se obtuvo la mejor proporción de señal con respecto a ruido con urea 2 M. De manera importante, el ejemplo 3 muestra que el componente caotrópico es indispensable, no se obtuvo señal específica en ausencia de aurea.
- 55

Opcionalmente la hibridación-disolución además comprende:

- una disolución de Denhardt a una concentración entre 0-2x (preferentemente 1x); y

- de 0-0,5 mg/ml de ARN portador. El ARN portador preferido es ARN-t de levadura a una concentración final de aproximadamente 0,25 mg/ml.

Dependiendo de la combinación diana/sonda particular, la concentración del agente de tamponado y estabilización híbrido y el tipo y la concentración del agente caotrópico, la temperatura óptima de hibridación varían de forma considerable. En general, la temperatura de hibridación está entre 35 °C y 65 °C y las muestras experimentan hibridación durante 5 minutos a toda la noche, tal como de 5 a 240 minutos, de 30 a 120 minutos o de 5 a 60 minutos incluso de 30 a 60 minutos. Un número de fórmulas se encuentra disponible para llegar a una temperatura de hibridación aproximada. El modelo vecino más próximo (SantaLucia, J, Jr. Proc. Natl. Acad. Scie. EE.UU 1998, 95: 1460-5) es un modelo preferido. Debería apreciarse que los oligonucleótidos mejorados con LNA tienen diferentes propiedades de fusión a partir de oligonucleótidos de ADN. Resulta aconsejable usar la herramienta de predicción oligo Tm en <http://www.exigon-com/ls/homeoflna/Oligo-tools/tm-prediction-tool.htm>. Esta herramienta está basada en un modelo termodinámico modificado de vecino más próximo y sobre mediciones de más de 10.000 oligonucleótidos LNA, y proporciona estimaciones fiables. No obstante, como se ilustra en el ejemplo 4, incluso diferencias pequeñas en la temperatura de hibridación producen diferencias significativas. Por consiguiente, el presente procedimiento implica un experimento para establecer la temperatura de hibridación óptima para una combinación específica de muestra de ensayo, sonda y diana.

El ejemplo 1 muestra una descripción detallada del procedimiento.

Mientras que se desarrolla el procedimiento para FFPE, se encuentra restringido a que se pueda usar cualquier tipo de muestras de ensayo que se fijen por medio del uso de fijaciones de reticulación con el procedimiento. Debido a su robustez remarcable, los inventores piensan que el procedimiento únicamente requiere pequeños ajustes para llevarlo a cabo bien sobre muestras de ensayo fijadas usando fijaciones de desnaturalización tales como alcohol y/o acetona, o incluso por medio de crioconservación.

Como se ilustra en la Figura 2 el procedimiento permite el análisis específico de pre-miARN y miARN maduro. La detección específica del pre-miARN bicatenario muestra que el procedimiento se puede usar para detectar un amplio intervalo de ARNs pequeños incluyendo ARNs pequeños bicatenarios tales como siARNs que son ARNs bicatenarios en los cuales las hebras complementarias son de aproximadamente 22 nt de largo cada una. Los inventores prevén que el procedimiento es incluso aplicable para la detección de ARNm.

Como se ilustra en los ejemplos, el procedimiento es particularmente robusto y fiable. Dicho procedimiento robusto y fiable es un pre-requisito para la cuantificación valiosa. Como se ilustra en el ejemplo 7, 8 y 9, el procedimiento se puede usar para obtener datos de expresión semi-cuantitativos.

Por consiguiente, en una realización adicional el procedimiento comprende una etapa en la cual la señal de hibridación se visualiza por medio de la formación de un precipitado de NBT-formazan de color azul oscuro, y que además comprende una cuantificación que comprende las etapas de:

- tomar un número, tal como 8-17, de imágenes aleatorias de dentro del área tumoral,
- comprobar que dichas imágenes aleatorias contienen células cancerígenas evidentes, excluyendo las imágenes que no contienen, y también excluyendo las imágenes con tejidos y artefactos de tinción,
- emplear una segmentación supervisada basada en la clasificación Bayesiana adaptada para el reconocimiento de píxeles azules (es decir, precipitado de NBT-formazan).
- cuantificar el nivel miR-21 relativo por medio de estimación del área azul total (TB = B +P) y usar TB como una medición de un nivel de ARN específico en la muestra.

En general, resulta ventajoso contra-teñir muestras de ensayo con tinciones histoquímicas diferentes para mejorar el contraste y facilitar el reconocimiento de los componentes celulares. La hematoxilina es un colorante básico frecuentemente usado que tiñe los núcleos de azul, debido a una afinidad por los ácidos nucleicos en el nucleolo de la célula. Se pueden combinar más tinciones histoquímicas para mejorar incluso más el análisis de la muestra de ensayo. La hematoxilina, por ejemplo, se combina con frecuencia con eosina, un colorante ácido que tiñe el citoplasma de rosa.

Se tiñeron la mayoría de las muestras de ensayo del ejemplo con rojo rápido nuclear que tiñe el núcleo de la célula de color rojo brillante.

Se contra-tiñeron las muestras de ensayo con rojo rápido nuclear (véase ejemplo 7, 8 y 9) y son muy apropiadas para el análisis semicuantitativo y para permitir el cálculo de otro estimador con el fin de complementar el área total azul relativa al estimador de área teñida de rojo nuclear (TBR). Las etapas para llegar a este estimador están basadas en las muestras de ensayo en las cuales se visualiza la señal de hibridación por medio de la formación de un precipitado de NBT-formazan de color azul oscuro y también se contra-tiñen las muestras de ensayo con rojo

rápido nuclear, y además comprende una cuantificación que comprende las etapas de:

- tomar un número, tal como 8-17, de imágenes aleatorias de dentro del área tumoral,
- comprobar que dichas imágenes aleatorias contienen células cancerígenas evidentes, excluyendo las imágenes que no contienen, y también excluyendo las imágenes con tejidos y artefactos de tinción,

5 - emplear una segmentación supervisada basada en la clasificación Bayesiana adaptada para el reconocimiento de píxeles azules (es decir, precipitado de NBT-formazan), píxeles rojos (es decir, rojo rápido nuclear) y píxeles púrpura (es decir, píxeles coloreados tanto con NBT-formazan como con rojo rápido nuclear) para estimar las áreas azules (B) y las áreas rojas (R) y las áreas púrpura (P).

10 - cuantificar el nivel ARN por medio de estimación del área azul total ($TB = B + P$) y/o el área azul relativa total ($TBR = TB/TR$, en la que el área roja total $R = R + P$) y usar TB y/o TBR como una medición de un nivel de ARN específico en la muestra.

Preferentemente, el procedimiento se usa para cuantificar el nivel de ARN pequeño que no es de codificación, en particular de miARNs.

15 El componente crucial de la presente divulgación es el tampón de hibridación libre de formamida, que es especialmente apropiado para detectar ARNs pequeños que no son de codificación, en secciones tisulares intercaladas con parafina y fijadas con formalina convencionales (FFPE) con sondas-LNA por medio de hibridación in situ, comprendiendo el tampón de 0,5 a 5 M de un componente caotrópico seleccionado entre el grupo formado por urea y sales de guanidinio (o guanidina) o una mezcla de dos o más miembros del grupo.

20 En una realización, el tampón de hibridación comprende un componente caotrópico o la mezcla de componentes caotrópicos que están seleccionados entre el grupo de urea e hidrocloreuro de guanidina. No obstante, urea es el componente caotrópico preferido y se considera no tóxico en las cantidades que se usa en el presente contexto. El Ejemplo 5 muestra que este tampón tiene como resultado que es superior a los obtenidos con una mezcla de hibridación ISH que comprende formamida, además el tampón basado en urea es estable durante al menos 13 meses a 4 °C. Esto está en claro contraste con los tampones de ISH basados en formamida, que se han observado

25 que tienen un período de caducidad corto a 4 °C.

Normalmente, el tampón de hibridación comprende:

- un agente de estabilización seleccionado entre el grupo de sales de cationes mono- y di-valentes. El agente de estabilización puede ser un tampón por sí mismo, o puede estar tamponado de manera adicional, por ejemplo con un tampón de fosfato,

30 - urea en una concentración entre 0,5 y 5 M;

- disolución de Denhart en una cantidad de 0-2 x; y

- un ARN portador, tal como ARN-t de levadura, en una cantidad de 0-0,5 mg/ml.

35 Numerosas publicaciones indican que las sondas de LNA se adaptan especialmente bien para la ISH de miARN, véase por ejemplo Wienholds y col. (2005) Science 309, 310-311. Por consiguiente, un aspecto de la divulgación es un kit para la detección de al menos un ARN pequeño que no es de codificación en un tejido intercalado con parafina y fijado con formalina convencional (FFPE) por medio de hibridación in situ, comprendiendo dicho kit el tampón de hibridación libre de formalina mejorado de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 y al menos una sonda-LNA optimizada para la detección específica de dicho ARN pequeño que no es de codificación. Preferentemente, el kit va destinado a la detección de microARN, y al menos es preferentemente una sonda-LNA encerrada marcada tanto en

40 su extremo 3' como en el 5' con digoxigenina.

Los miR representan biomarcadores robustos y estables en material de FFPE intercalado con parafina y fijado con formalina. Existen varias publicaciones que demuestran que los miR son estables y están regulados en cáncer. Una publicación reciente de Schetter y col (JAMA 2008) describe el uso de miR como biomarcadores en cáncer de colon. De particular interés es que los autores fueron capaces de separar las muestras de ensayo no cancerígenas de las

45 muestras de ensayo cancerígenas por medio del uso de un miR (miR-21). Esta separación estuvo apoyada por varios análisis multivariantes, que mostraron que la expresión de miR-21 fue independiente de la etapa de la enfermedad. Es evidente, a partir de la bibliografía, así como a partir del ejemplo 1, 2, 5, 7, 8 y 9 que en general miR-21 se expresa de forma predominante en células de tipo fibroblasto ubicadas en el compartimiento estromal de los tumores, mientras que el compartimiento celular del cáncer generalmente expresa niveles muy bajos de miR-21.

50 No obstante, recientemente los inventores (Nielsen y col (2011) Clin Exp Metastasis 28: 27-38) han mostrado que en determinados tumores existen asociaciones de células cancerígenas que expresan niveles muy elevados de miR-21. Dicha distribución espacial significativa sugirió de forma inmediata a los inventores que los datos obtenidos a partir de miR-21 semicuantitativo, tal como los descritos en la presente memoria, serían especialmente útiles como herramienta de diagnóstico. El uso de ISH miR-21 semi-cuantitativo como herramienta de diagnóstico se ilustra en el

ejemplo 9. En breve, el procedimiento del ejemplo 9 es un procedimiento para predecir la supervivencia libre de enfermedad de un paciente con cáncer de colon de estadio II que comprende:

a) determinar el nivel relativo de miR-21 en al menos una sección tisular representativa procedente del cáncer de colon en estadio II de dicho paciente determinado por medio del procedimiento de la reivindicación 7, y

5 b) comparar el nivel de miR-21 en el paciente con un conjunto de niveles relativos de miR-21 obtenidos por medio del procedimiento de la reivindicación 7, a partir de un panel de referencia de muestras de cáncer de colon de estadio II obtenidas a partir de un panel de referencia de pacientes con historia de enfermedad conocida,

c) agrupar el panel de referencia en terciles de acuerdo con el nivel relativo de miR-21 determinado por medio del procedimiento de la reivindicación 7; y

10 d) tomar el nivel de miR-21 de dicha al menos una sección tisular representativa a partir de un tumor de colon de estadio II de dicho paciente que cae dentro del nivel de miR-21 del tercil superior (expresión elevada) como indicativo de mayor probabilidad de supervivencia corta libre de enfermedad, y tomar el nivel de miR-21 de dicha al menos sección tisular representativa a partir de tumor de colon de estadio II procedente de dicho paciente que cae dentro del nivel de miR-21 del tercil inferior (expresión baja) como indicativo de mayor probabilidad de supervivencia larga libre de enfermedad.

De acuerdo con la bibliografía (por ejemplo Bartels (2009) Clin Chem 55, 623-631) se puede usar un amplio intervalo de miRs como marcadores de pronóstico y diagnóstico de varios tipos de cáncer. Los inventores estipulan que en esos ejemplos en los cuales miRs expresan una distribución espacial significativa, se ha demostrado que la ISH semi-cuantitativa de la presente divulgación es una adenda valiosa con respecto a la caja de herramientas de diagnóstico.

La divulgación se ilustra de manera adicional en los siguiente ejemplos no limitantes y las figuras en las cuales

25 La Figura 1 muestra el resultado de la hibridación in situ de miARN usando un urea de compuesto caotrópico no tóxico en los tampones de pre-hibridación e hibridación. Sobre la figura hay ocho paneles: a-d en color y a'-d' en blanco y negro, que muestran miR-21, aleatorizado, miR-21 + no marcado y snARN U6. La flecha negra representa ejemplos de señales específicas.

La Figura 2 muestra la especificidad del procedimiento. Se analizaron cuatro variantes de sondas de miARN-21 por medio de hibridación in situ usando urea 2M en el tampón de hibridación. Diez paneles, a-e de color y a'-e' en blanco y negro, que muestran ISH que usa el miR-21, el miR-21_3, el miR-21_5, el miR-21_pre y el miR-210. La flecha negra indica señales específicas, la flecha blanca indica depósitos de carbono.

30 La Figura 3 muestra los resultados de la detección por ISH de miARN-126 en respuesta a cero y 2 M de urea en tampones de pre-hibridación e hibridación. En la figura se muestran cuatro paneles: dos en color, dos en blanco y negro, que muestran la detección de miR-126 en presencia/ausencia de urea. La flecha apunta a señales específicas, la estrella a señales no específicas.

35 La Figura 4 muestra la hibridación in situ de miARN-21 (paneles c-d) y miARN-126 (paneles a-b) a 48 °C y 55 °C en presencia de urea 2 M en el tampón de hibridación. Paneles: a-d están en color y a'-d' están en blanco y negro. La temperatura de hibridación se abrevia como Thyb. La flecha apunta a las señales específicas, la estrella a señales no específicas.

40 La Figura 5 muestra la hibridación in situ de miARN-21 (paneles b, d, f) y miARN-126 (paneles a,c,e) a 55 °C en presencia de urea 2 M, formamida 3 M o formamida 6 M, en los tampones de hibridación y pre-hibridación. Paneles: a-f están en color y a'-f' están en blanco y negro. La flecha apunta a ejemplos de señal específica.

La Figura 6 muestra los resultados de la detección de miR-126 en tejido de colon por medio de hibridación in situ a 55 °C en presencia de urea 2 M (Panel a) y varias concentraciones de guanidina en los tampones de pre-hibridación e hibridación (Paneles c-f). El panel a-f está en color y a'-f' en blanco y negro. Las flechas apuntan a recipientes, la estrella indica epitelio.

45 La Figura 7 ilustra la ISH semi-cuantitativa ejemplificada por medio de la toma de muestra de imágenes y el análisis de imágenes de un miR-21 en señal de hibridación in situ de cáncer de colon. El panel (a) representa un ejemplo típico de una sección tisular completa (panel a) con un mucosa normal, área de tumor y submucosa tras la hibridación in situ para miR-21 y la contra-tinción con rojo nuclear. El área del tumor está rodeada con un círculo y las posiciones de imágenes ubicadas sistemáticamente de forma aleatoria vienen indicadas por marcos cuadrados. Se captura las imágenes de las muestras con un objetivo 20x en las posiciones de imágenes colocadas sistemáticamente. El panel (b) muestra una de dichas imágenes. Las imágenes de las muestras se procesan posteriormente con un clasificador de píxeles supervisado que ha sido entrenado para separar la señal de hibridación in situ azul de la señal de hibridación de contra tinción de rojo y púrpura que se solapa con el rojo nuclear, panel (c). Nótese que el falso color rojo se correlaciona con el rojo rápido nuclear en el panel (b), mientras que la señal de ISH azul del panel (b) se muestra como color falso verde en el panel (c). El área dentro

de los marcos indicada en la esquina inferior izquierda del panel (b) y (c) está ampliada y se muestra en el panel (d) y el panel (e). Nótese que la señal de hibridación in situ azul del panel (d) aparece como verde brillante, la señal púrpura del panel (d) como amarillo y la señal roja del panel 8d) aparece como rojo brillante en la imagen clasificada, panel (e). Barras del panel (a): 250 μm , en el panel (b) y (c): 40 μm , y en el panel (d) y (e): 4 μm .

5 La Figura 8A ilustra la estabilidad del tampón de hibridación por medio de la hibridación in situ de miR-21 sobre tejido de cáncer de colon hibridado con un tampón de hibridación que contiene urea preparado de acuerdo con la fecha indicada en la figura. Los paneles (a) - (h) están en color, (a') - (h') están en blanco/negro.

10 La Figura 8B es una presentación de los datos semicuantitativos obtenidos por medio de un número de hibridaciones in situ de miARN-21 sobre tejido de cáncer de colon hibridado con un tampón de hibridación que contiene urea preparado de acuerdo con la fecha indicada en la figura. Las cajas indican la distribución de los valores de expresión desde el percentil 25 hasta el 50. Los puntos indican observaciones fuera del percentil 25 hasta el 50. La línea horizontal de la caja es la mediana.

15 La Figura 9 muestra un diagrama de terciles de estimaciones de Kaplan-Meier de señal de hibridación in situ de miARN-21. Se llevaron a cabo análisis de regresión de Cox para comparar la potencia estadística de los niveles de expresión de miARN-21 observados, medidos según los valores de TB en 130 pacientes con cáncer de colon (panel A) y los valores de TB en los mismos 130 pacientes con cáncer de colon (panel B).

[A] indica el tércil inferior (el 33,3 % de los pacientes con el nivel más bajo de miR-21 estimado con el procedimiento de la invención).

[B] el tércil intermedio.

20 [C] indica el tércil más elevado (el 33,3 % de los pacientes con el nivel de miR-21 más elevado estimado con el procedimiento de la invención).

Se indica que el número de eventos = número de muertes en los tres terciles durante los 72 meses de observación y el número de pacientes de cada grupo en los meses 0, 24 y 48.

25 La Figura 10 indica los resultados de la hibridación in situ de las cuatro especies de miARN en diferentes tipos de tejido humano usando urea 2 M en el tampón de hibridación. Las cuatro sondas de miARN-124 en cerebro (panel superior), miARN-126 en riñón, miARN-145 en pared intestinal (Panel c) y miARN-205 en cuello uterino (panel inferior). Los 4 paneles de la izquierda (a-d) son de color, los 4 paneles de la derecha (a'-d') son en blanco y negro.

30 La Figura 11 muestra el resultado de la hibridación in situ de mARN de β -actina humano en cáncer de esófago humano usando una sonda de LNA. Se adquirieron las muestras FFPE en Proteogenex (Culver City, CA). Bar 40 μm .

Ejemplos

Procedimientos Generales

35 Fuentes de tejido. La Tabla 1 identifica los suministradores de muestras de ensayo intercaladas con parafina y fijadas de forma rutinaria en los Ejemplos 1-10 para miARN en análisis de hibridación in situ.

Tabla 1: Suministradores de muestras de ensayo de FFPE usadas en los Ejemplos 1-10, Ranx05 es una referencial de Estudio Danés de Cáncer Colorectal RanX05. Algunos resultados de los estudios de esta cohorte de pacientes se han publicado en Scand. J. Gastroenterol., Febrero 2000; 35(2): 212-7.

Ejemplo y panel	Tipo de tejido	Suministradores de tejido
1a-d	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
2a-e	Cáncer de pulmón	Proteogenex
3a-b	Cáncer de colon	Proteogenex
4a-d	Cáncer de colon	Proteogenex
5a-f	Cáncer de colon	Proteogenex
6a-f	Colon normal	Proteogenex

(continuación)

Ejemplo y panel	Tipo de tejido	Suministradores de tejido
7a	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
7b	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
7c	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
7d	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
7e	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
8A(a-h)	Cáncer de colon	Proteogenex
8B	Cáncer de colon	Proteogenex
9	Cáncer de colon	Hvidovre Hospital, Rnax05
10a	Cerebro normal	Odense University Hospital (BW Christensen)
10b	Cáncer de riñón	Proteogenex
10c	Colon normal	Proteogenex
10d	Cuello uterino normal/cáncer	Proteogenex

5 **Secuencia de Nucleótidos:** La Tabla 2 proporciona una revisión de las especies de miARN comentadas en los Ejemplos 1-10 y las secuencias de los oligonucleótidos mejorados con LNA correspondientes usados como sondas. También se presentan la información del contenido de LNA y las temperaturas de fusión predichas (T_m) frente a la secuencia de ARN complementario en un tampón salino medio (fosfato de sodio 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,0). Las sondas fueron diseñadas todas por Exiqon, Dinamarca.

Tabla 2: Revisión de las especies de miARN y sondas (Exiqon, Dinamarca) usadas en los Ejemplos 1-10

Nº. ID Sec.	Especies de miARN	Sonda	Secuencia	Contenido de LNA (%)	T_m predicha
1	hsa-miR-21	miR21	tcaacatcagctctgataagcta	32	82,7
2	hsa-miR-21	miR21_3	tcaacatcagctctga	40	80,6
3	hsa-miR-21	miR21_5	acatcagctctgataagc	41	81,7
4	hsa-miR-21	miR21_bucle	catgagatttcaacagtca	42	82,4
5	hsa-miR-124	miR124	ggacttcaccgcgtgcctta	25	89,8
6	hsa-miR-126	miR126	gcattattactcacggtacga	33	84,5
7	hsa-miR-145	miR145	agggattcctgggaaaactggac	30	84,3
8	hsa-miR-205	miR205	agactccggttggaatgaagga	29	87,3
9	hsa-miR-210	miR210	gctgtcacacgcaca	27	79,7
10	hsa-miR-424	miR424	ttcaaaacatgaattgctgctg	41	83,3
11	sin miARN	Aleatorizado	gtgtaacacgtctatacgccca	32	87,3
12	sin miARN	U6 ARNsn	cacgaattgcgtgtcatcctt	27	-

Sistemas de detección y análisis de imágenes: se usó un microscopio integrado de Visiopharm y módulo de soporte

- lógico (Visopharm, Hoershoelm, Dinamarca) que comprende un microscopio Leica DM 6000B (Leica, Wetzlar, Alemania) equipado con una etapa automatizada y cargador de rendija (Ludl, Hawtorn, Estados Unidos) y una cámara DP72 CCD (Olympus, Tokio, Japón) para el análisis de imágenes. Se mantuvo la exposición de las imágenes de las muestras en 6,993 mili-segundos con valores de rojo-verde-azul (RGB) de 170-180 en las áreas de blanco. Se llevó a cabo la segmentación supervisada basada en la clasificación bayesiana, se clasifica cada pixel de acuerdo con sus propiedades cromáticas, usando una herramienta de soporte lógico de Visomorph (Visopharm, Hoershoelm, Dinamarca). Se identificaron los siguientes colores para la clasificación supervisada: Azul = señal de hibridación in situ. Púrpura = señal de hibridación in situ que solapa rojo nuclear. Rojo = tinción de rojo nuclear separado del fondo no teñido.
- Presentación de datos:** Las Figuras en las Secciones de Resultados de los Ejemplos 1-10 consisten en un número de imágenes de color (datos primarios) y las correspondientes imágenes en escala de grises. Las imágenes en escala de grises son una representación de las imágenes de color primario y se supone que se visualiza la señal de hibridación in situ de una forma que reproduce bien durante el proceso de impresión normalmente usado para los documentos de patentes. La mayoría de las imágenes en escala de grises se reconocen por las letras seguidas de un apóstrofe. Estas imágenes en escala de grises se obtuvieron usando un clasificador de píxeles entrenado por medio del cual se traducen las imágenes a color en imágenes blanco y negro. De este modo, se traducen las señales de hibridación azul y púrpura en negro, mientras que las señales de rojo y nivel de fondo se traducen en colores gris claro o blanco. Las referencias de las Sección de Resultados de los Ejemplos 1-10 son únicamente a imágenes coloreadas. La Tabla 3 proporciona una revisión de las ampliaciones y el tipo de imágenes usadas, así como el tamaño (en μm) de los tejidos mostrados por las figuras en las Secciones de Resultados de los Ejemplos 1-10.

Tabla 3: Información sobre las imágenes en las Secciones de Resultados de los Ejemplos 1-10

Ejemplo	Lente	Imagen	X, μm	Y, μm
1a-d	x20	Convencional	620	460
2a-e	x40	Convencional	230	310
3a-b	x20	Cosida	1070	480
4a-d	x20	Convencional	620	460
5a-f	x20	Convencional	620	460
6a-f	x20	Cosida	1200	500
7a	x1,25	Cosida	24000	13000
7b	x20	Despuntada	620	400
7c	x20	Despuntada	620	400
7d	x20	Ampliada	75	26
7e	x20	Ampliada	75	26
8A(a-h)	x20	Convencional	620	460
8B	NA	NA	NA	NA
9	NA	NA	NA	NA
10a	x40	Convencional	310	230
10b	x20	Convencional	620	460
10c	x20	Cosida	1470	1100
10d	x20	Cosida	970	540

- Ejemplo 1.** Se permite la hibridación in situ no tóxica de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina fijada de forma rutinaria usando sondas de LNA marcadas con DIG por medio de urea de compuesto caotrópico.

Introducción

Ilustrado por medio de la expresión de miARN-21 en muestra de ensayo intercalada con parafina, fijada de forma rutinaria por medio de análisis de hibridación in situ, el Ejemplo 1 muestra que la urea del tampón de hibridación facilita una hibridación no tóxica de las especies de miARN.

Procedimientos

- 5 Se describe un protocolo de hibridación in situ en para la detección de miARN-21 en el que se usaron muestras de ensayo de cáncer de colon humanas intercaladas con parafina y fijadas con formalina de forma rutinaria (FFPE) que contenían tanto mucosa normal como tejido tumoral (Tabla 1).

10 Sondas: Se diseñaron oligonucleótidos que contenían LNA por parte de Exiqon, Dinamarca. Para la detección de miARN-21, se usó la secuencia mejorada con LNA de tcaacatcagctgtgataagcta (T_m estimada = 83 °C), marcada con digoxigenina en los extremos 5' y 3', a una concentración de 40 nM (Nº. de ID de Sec. en la Tabla 2). Se incluyó una versión no marcada de la sonda miR-21 con un patrón de LNA idéntico en los experimentos de competición. Como control positivo se usó una sonda marcada con digoxigenina en 5' a 0,1 nM con la secuencia: caggaattgcgtgtcatcctt y una T_m estimada de 84 °C, específica para snARN U6 (Nº. de ID de Sec. 12 en la Tabla 2). Se incluyó un oligonucleótido marcado con digoxigenina en 5' y 3' con secuencia aleatorizada: gtgtaacacgtctatacgccca y una T_m estimada de 87 °C (Nº. de ID de Sec. 11 en la Tabla 2) como control negativo a 40 nM.

Agua: para preparar las disoluciones madre, para las diluciones y para los lavados, se usó agua empobrecida en ARNasa de calidad Milli-Q.

20 Montaje de las secciones tisulares sobre un soporte sólido. Tras el arreglo del bloque, se cortaron secciones de 6 µm de espesor de las muestras de ensayo de FFPE y se movieron a un recipiente de Ziehl-Nielsen esterilizado y seco con agua libre de ARNasa a 25 °C. Se transfirieron las secciones tisulares a un baño de agua caliente a 40-50 °C, donde se estiraron para evitar pliegues tisulares, y posteriormente se montaron de forma inmediata sobre portaobjetos SuperFrost®Plus (Microm International, Walldorf, Alemania). Se secaron al aire los portaobjetos durante 1-2 horas a 25 °C y se almacenaron a 4 °C.

25 Desparafinado: se desparafinaron las secciones de parafina sobre los portaobjetos SuperFrost®Plus a través de 10 baños de inmersión que contenían xileno (baños 1-3), etanol de 99,9 % (baños 4-6), etanol de 96 % (baños 7-8) y etanol de 70 % (baños 9-10). Los baños 1, 2, 3, 6, 8, y 10 fueron inmersiones de 5 minutos, mientras que los baños 4, 5, 7 y 9 fueron 10 inmersiones de fuera-adentro consecutivas. Los portaobjetos SuperFrost con las secciones tisulares se colocaron posteriormente en una disolución salina de tampón de fosfato (PBS) que contenía 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 2 mM de KH₂PO₄ (Nº. Cat. 70013-073, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos).

35 Procedimiento de hibridación in situ con detección cromogénica no radiactiva. Se montaron los portaobjetos SuperFrost con las secciones tisulares en cubre-objetos Tecan y se bloquearon para dar lugar a recipientes Tecan de flujo pasante, que se colocaron en un instrumento de hibridación automatizado Tecan Freedom Evo (Tecan, Männerdorf, Suiza) y se expusieron a un flujo continuo de los tampones, enzimas, oligonucleótidos y otros componentes a las temperaturas y durante los tiempos indicados:

1) Lavado: PBS a 25 °C durante 6 minutos.

2) Lavado: Tampón de Reacción de Proteína Kinasa K que contenía Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM y NaCl 1 mM, pH 7,4 a 37 °C durante 6 minutos.

40 3) Tratamiento con Proteína Kinasa K: Tampón de reacción de Proteína Kinasa K que contenía 15 µg/ml de Proteína Kinasa K (Nº. Cat. 03-115-887-001, Roche, Basel Suiza) a 37 °C durante 8 minutos.

4) Lavado: PBS a 25 °C durante 6 minutos.

45 5) Prehibridación: tampón no tóxico libre de nucleasa que contiene 2,5x SSC (Nº. Cat. AM9765, Applied Biosystems/Ambion, Austin, Estados Unidos): urea 2 M; 1 x disolución de Denhardt (Nº. Cat. 30915, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos); y ARN-t de levadura (Nº. Cat. 83853, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a una concentración final de 0,25 mg/ml a 62 °C durante 15 minutos.

6) Hibridación: mismo tampón que en la etapa 5), pero que también contenía una sonda de miARN-21 40 nM a 57 °C durante 60 minutos.

7) Lavado: 5 x SSC a 62 °C durante 5 minutos.

50 8) Lavado: 1 x SSC a 62 °C durante 7 minutos.

9) Lavado: 0,2 x SSC a 62 °C durante 14 minutos.

10) Lavado: 0,2 x SSC a 30 °C durante 7 minutos.

11) Lavado: PBS a 30 °C durante 6 minutos.

12) Bloqueo de unión de anticuerpo no específico: el usó el lavado DIG y el Conjunto Tampón de Bloqueo (11-585-762-001, Roche, Suiza). Se incubaron las secciones tisulares en disolución de bloqueo recién preparada (1:10 en tampón de ácido maleico: ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5) durante 15 minutos a 30 °C.

5 13) Detección de sondas marcadas con digoxigenina: anti-digoxigenina de oveja conjugada con fosfatasa alcalina (11-093-274-910, Roche, Suiza) diluida 1:500 en Disolución de Bloqueo que contenía 0,1 x PBS y 0,1 % de Tween-20.

14) Lavado: PBS a 30 °C durante 4 minutos.

10 15) Desarrollo enzimático: comprimidos de tetrazolio nítro-azul (NBT/BCIP) de uso inmediato (Nº. Cat. 11-697-471-001, Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante, a 30 °C durante 60 minutos.

16) Lavado: tampón KTBT que contenía Tri-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y KCl 10 mM a 30 °C durante 10 minutos.

17) Lavado: agua a 25 °C durante 2 minutos.

18) Contra-tinción: rojo rápido nuclear (Nº. Cat. H-3403, Vector Laboratories, Burlingame, Estados Unidos), diluido 1:2 con agua a 25 °C durante 1 minuto.

15 19) Lavado: agua a 25 °C durante 6 minutos.

20 Deshidratación: se desmantelaron los portaobjetos SuperFrost con secciones tisulares a partir de las cámaras Tecan y los recipientes de flujo pasante y se colocaron en agua del grifo. Se deshidrataron los portaobjetos a través de 6 baños de etanol: etanol de 70 % (baños 1-2), etanol de 96 % (baños 3-4) y etanol de 99 % (baños 5-6). Los baños 1, 3 y 5 fueron 10 inmersiones consecutivas fuera-adentro, mientras que los baños 2, 4 y 6 fueron inmersiones de 5 minutos. Inmediatamente después de la deshidratación, se montaron posteriormente los portaobjetos SuperFrost con medio Eukitt (Nº. Cat. 361894-G, VWR, Herley, Dinamarca).

Detección, análisis de imágenes y presentación de datos. Detección; se llevó a cabo el análisis de imágenes y la presentación de datos como se describen en la Sección de Procedimientos Generales.

Resultados

25 La Figura 1 muestra los resultados de la hibridación in situ de miARN usando urea de compuesto caotrópico no tóxica, en los tampones de pre-hibridación e hibridación. Se obtuvo una señal intensa con la sonda miARN-21 marcada con DIG doble en paralelo con escasa o nula tinción de fondo difusa (Panel a). Se detecta la señal de miARN-21 en el compartimiento estromal. No se observó señal con la sonda aleatorizada marcada con DIG doble (Panel b). La hibridación con una mezcla de sonda miARN-21 y sonda no marcada dio como resultado una señal de ISH intensamente reducida (Panel c). Se observó una señal de ISH para snARN U6 en el núcleo de todos los tipos celulares (Panel d). Los datos sobre aumento, tamaño tisular y otra información de relevancia para las imágenes, se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

35 En base a los resultados obtenidos en el Ejemplo 1, los inventores concluyen que la detección in situ por medio de sondas de LNA marcadas con DIG para miARN en FFPE es posible usando urea de compuesto caotrópico no tóxica en el tampón de hibridación. Y por consiguiente, que la formamida teratogénica, que durante décadas fue el caótrofo de elección en los tampones de hibridación para la hibridación in situ, se puede sustituir por urea no tóxica.

40 **Ejemplo 2.** Hibridación in situ específica de miARN-21 por variantes de sondas de miARN-21 en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada con formalina de manera rutinaria, por medio de LNA marcada con IGD en tampón de ISH basado en urea.

Introducción

45 Ilustrado por medio de hibridación de variantes de sondas de miARN-21 que incluyen una cubierta de la región de bucle de miARN-21. El Ejemplo 2 muestra que ISH con hibridación que comprende urea proporciona la especificidad suficiente para discriminar entre especies de pre-miARN individual y miARN en muestras de ensayo intercaladas con parafina y fijadas de forma rutinaria.

Procedimientos

50 Montaje de secciones tisulares sobre soporte sólido: desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de prehibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se describe en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1. Detección; análisis de imágenes; y presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección Procedimientos Generales.

Muestras: Se prepararon cinco secciones tisulares en serie de tejido de cáncer de pulmón humano a partir de una muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sondas: Se diseñaron cinco oligonucleótidos mejorados con LNA marcados con digoxigenina dobles por parte de Exiqon, Dinamarca. Todas las sondas que incluían un 22-mer de longitud completa (Nº. ID. Sec. 1 en la Tabla 2), un 15-mer (Nº. ID. Sec. 2 en la Tabla 2) y un 17-mer (Nº. ID. Sec. 3 en la Tabla 2) fueron dirigidas a la región troncal de pre-miARN-21. Se dirigió un 19-mer (Nº. ID. Sec. 4 en la Tabla 2) a la región de bucle de miARN-21. Se usó la quinta sonda, que se dirigió a miARN-210 (Nº. ID. Sec. 9 en la Tabla 2) como control negativo. Se sometieron a ensayo todas las sondas a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 2 muestra los resultados de una análisis de especificidad de cuatro variantes de sondas miARN-21 por medio de hibridación in situ usando urea 2 M en el tampón de hibridación. Se llevó a cabo el análisis en secciones tisulares seriadas cortadas a partir de la misma muestra de FFPE. Las cuatro sondas que se dirigieron a miARN-21 demostraron todas una señal intensa en las células de tipo fibroblasto estromales. Para la comparación, no se obtuvo señal de hibridación in situ con la sonda que se dirigió a miARN-20. Además de las variantes de sonda de miARN-21 identificadas en la Sección de Procedimientos de este Ejemplo, los inventores también sometieron a ensayo la sonda miARN-21 de longitud completa dirigida hacia el miARN-21 maduro. Esta sonda tuvo un patrón de hibridación in situ idéntico al de las cuatro variantes de sonda miARN-21 (datos no mostrados). Los datos sobre aumento, tamaño tisular y otra información de relevancia de los imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

En base a los resultados obtenidos en el Ejemplo 2 que muestran una proporción de señal con respecto a ruido para las variantes de sonda miARN-21 y no muestran señal de miARN-210, los inventores llegan a la conclusión de que urea 2 M en el tampón de hibridación permite el análisis específico de especies de miARN individuales en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria.

Ejemplo 3. Hibridación in situ de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de LNA marcado con DIG para concentraciones diferentes de urea en el tampón de hibridación.

Introducción

Este ejemplo se diseña para evaluar la señal de hibridación in situ de miARN en presencia y ausencia de urea en los tampones de pre-hibridación e hibridación.

Procedimientos

Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de prehibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1 con las dos excepciones. La primera excepción fue que se sometieron a ensayo los tampones de hibridación in situ con concentraciones de urea de cero o 2 M. La segunda excepción es que la temperatura de hibridación fue de 55 °C. Detección; análisis de imágenes y presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección Procedimientos Generales. **Muestras de ensayo:** se prepararon secciones seriadas de tejido de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sondas: se usaron sondas mejoradas con LNA, marcadas con digoxigenina doble para miARN-126 (Nº. ID de Sec 6 de la Tabla 2) diseñadas por Exiqon, Dinamarca, a una concentración de 40 nM.

Resultados

La Figura 3 muestra los resultados de la detección de ISH de miARN-126 en respuesta a concentraciones de cero y 2 M de urea en los tampones de pre-hibridación e hibridación. En presencia de urea 2 M, se identificó una proporción elevada de señal con respecto a ruido que indicaba una hibridación in situ específica de miARN-126 en los recipientes (se marcaron unos pocos ejemplos de señales positivas por medio de flechas sobre el panel). No hubo señal no específica prevalente en el epitelio (marcada por medio de estrellas en la figura). No se detectó hibridación in situ de miARN-126 en los experimentos que dejaban fuera urea en los tampones de pre-hibridación e hibridación. Se diseñó un experimento de dosis-respuesta para establecer que concentración de urea que proporcionó la condición de hibridación in situ de miARN más óptima. Se sometieron a ensayo las siguientes concentraciones de urea: 0,5 M; 1,0M; 2,0 M; 3,0 M y 4,0 M. Los resultados (no mostrados) mostraron que se observó una reducción significativa de la señal no específica a un valor de urea de 4 M. Se observó la mejor proporción de señal con respecto a ruido (es decir, el mejor rendimiento) para la detección de miARN-126 en presencia de urea de 2 M en la cual no se observó prácticamente hibridación no específica mientras que al mismo tiempo se obtuvo un valor de señal específica elevado. Los datos sobre ampliación, tamaño tisular y otra información de relevancia de las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

El Ejemplo 3 muestra que la mejor señal de hibridación in situ de la sonda de miARN-126 se obtiene cuando se lleva a cabo la hibridación y pre-hibridación en presencia de urea 2 M. No se detectó señal en ausencia de urea. Los inventores concluyen que la urea es un componente crítico en los tampones de prehibridación e hibridación detallado en la sección de Procedimientos del Ejemplo 1 (Etapas 5-6) para obtener un señal de ISH de miARN.

Ejemplo 4. Eficacia de la hibridación in situ de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de sondas de LNA marcadas con DIG como función de la temperatura de hibridación en presencia de urea 2 M.

Introducción

La proporción de señal con respecto a ruido de la detección in situ de miARN depende de la temperatura. En el Ejemplo 4, se examina la hibridación in situ de miARN a dos temperaturas para identificar cual es la más óptima en presencia de urea 2 M en los tampones de pre-hibridación e hibridación.

Procedimientos

Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1 con la única excepción de que la temperatura de hibridación se ajustó a 48 °C o 55 °C. Detección; análisis de imágenes y presentación de datos se llevaron a cabo como se describen en la Sección Procedimientos Generales.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tejido de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sondas: se usaron sondas mejoradas con LNA, marcadas con digoxigenina doble para miARN-21 (Nº. ID de Sec 1 de la Tabla 2) y miARN-126 (Nº. ID de Sec. 6 en la Tabla 2) diseñadas por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 4 ilustra la hibridación in situ de miARN-21 (paneles c-d) y miARN-126 (paneles a-b) a 48 °C y 55 °C en presencia de urea 2 M en el tampón de hibridación. Se observaron señales intensas de hibridación in situ para miARN-21 en estroma tumoral (indicado por las flechas de la figura) y miARN-126 en recipientes en las secciones sometidas a hibridación a 55 °C. Por el contrario, resultó evidente una señal no específica sobre las estructura de células cancerígenas (marcadas por estrellas en la figura) a 48 °C. De las dos temperaturas de hibridación sometidas a ensayo en el Ejemplo 4, se obtuvo la mejor proporción de señal con respecto a ruido para la hibridación in situ de miARN a 55 °C. Los datos sobre ampliación, tamaño tisular y otra información de relevancia para las imágenes se ofrecen en la Tabla 3.

Conclusión

En base a los resultados del Ejemplo 4, los inventores concluyen que la detección de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de hibridación in situ en presencia de urea 2 M en el tampón de hibridación depende de la temperatura y se debería optimizar para cualquier combinación de miARN/sonda específica.

Ejemplo 5. La hibridación in situ de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de sondas de LNA marcadas con DIG se mejora sustituyendo la formamida de compuesto teratogénico convencional en el tampón de hibridación por la urea de compuesto no tóxico.

Procedimientos

Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1 con las siguientes excepciones.: la temperatura de hibridación fue de 55 °C; y además de la detección de ISH de miARN en presencia de urea 2 M en los tampones de pre-hibridación e hibridación como se describe en la sección de Procedimientos del Ejemplo 1, también se llevó a cabo la detección de miARN usando tampones de hibridación en los que se sustituyó urea por 25 % o 50 % de formamida, como se detalla en la sección de Resultados. Detección; análisis de imágenes; y la presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección Procedimientos Generales.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tejido de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sondas: se usaron sondas mejoradas con LNA, marcadas con digoxigenina doble para miARN-21 (Nº. ID de Sec 1

de la Tabla 2) y miARN-126 (Nº. ID de Sec. 6 en la Tabla 2) diseñadas por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 5 muestra hibridación in situ de miARN-21 (paneles b, d, f) y miARN-126 (paneles a, c, e) a 55 °C en presencia bien de urea de 25 %, formamida de 25 % o bien de formamida de 50 % en los tampones de pre-hibridación e hibridación. Las señales de hibridación in situ de miARN-21 y miARN-126 fueron intensas en el sistema tampón basado en urea, mientras que cuando se usan tampones de formamida en condiciones experimentales idénticas, se obtuvieron intensidades de señal bajas para ambas especies de miARN. Se diseñó un experimento para evaluar si la disminución de la temperatura de hibridación mejoraría las señales de hibridación in situ de miARN en presencia de formamida. Los resultados mostraron que la disminución de la temperatura de hibridación desde 55 °C hasta 48 °C no mejoraba la proporción de señal con respecto a ruido en presencia de formamida (datos no mostrados). Los inventores apreciaron de hecho que aunque se obtuvo una señal intensa para la hibridación de miARN específica a 48 °C en presencia de formamida de 50 %, la señal de fondo (ruido) también aumentó en estas condiciones experimentales, eliminando la ventaja de una señal más intensa para la unión específica (datos no mostrados). Los datos sobre aumento, tamaño tisular y otra información de relevancia de las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

En base a los resultados del Ejemplo 5, los inventores concluyen que la detección de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de hibridación in situ es, sorprendentemente, mucho mejor en presencia de urea 2M en comparación con el caso en el que la hibridación se lleva a cabo en presencia de formamida.

Ejemplo 6. Se permite la hibridación in situ específica de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de sondas de LNA marcadas con DIG aumentando la concentración de guanidina en el tampón de hibridación.

Introducción

Se diseña este experimento para ilustrar que la hibridación in situ específica de miARN en muestra de ensayo FFPE por medio de sondas de LNA marcadas con DIG se permite gracias a guanidina de caótrofo. Además, en base a la detección de miARN de dosis-respuesta de guanidina, se identifica la concentración de guanidina en el tampón de hibridación para la hibridación in situ de especies de miARN. Con fines de comparación, la hibridación in situ de miARN en presencia de urea 2 M también se llevó a cabo en este ejemplo.

Procedimientos

Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1 con dos excepciones. La primera excepción fue que se sometieron a ensayo un intervalo de tampones de hibridación y pre-hibridación in situ con concentraciones de guanidina que cubrían 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M y 2,0 M. La segunda excepción es que la temperatura de hibridación fue 55 °C. La hibridación in situ de miARN en presencia de urea se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1 exceptuando que la temperatura de hibridación fue de 55 °C. Detección; análisis de imágenes; y la presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección Procedimientos Generales.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tejido de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sondas: se usaron sondas mejoradas con LNA, marcadas con digoxigenina doble para miARN-126 (Nº. ID de Sec. 6 en la Tabla 2) y miARN-210 (Nº ID de Sec. 9 en la Tabla 2) diseñadas por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 6 muestra los resultados de detección de miARN-126 en tejido de colon por medio de hibridación in situ a 55 °C en presencia de urea 2 M (panel a) y varias concentraciones de guanidina en tampones de pre-hibridación e hibridación (paneles c-f). Se identifica una señal específica para miARN-126 en recipientes (indicada por medio de las flechas en la figura). Las señales no específicas son prevalentes en el epitelio (indicadas por medio de estrellas en la figura). Se observó una reducción significativa de la señal no específica en la concentración más elevada de guanidina (panel c), mientras que la intensidad de la señal específica de miARN-126 no se ve afectada por el aumento de la concentración de guanidina. No obstante, el mejor rendimiento se obtuvo cuando se usó urea en los tampones de pre-hibridación e hibridación (panel a), cuando se detectaron señales de hibridación in situ intensas para miARN-126 y se eliminó prácticamente la hibridación no específica. Se sometió a ensayo una sonda dirigida a miARN-210 (que no se expresa en este tejido) como control en presencia de urea 2 M (panel b). Como cabía

esperar, no se obtuvo prácticamente señal de hibridación in situ. Los datos sobre ampliación, tamaño tisular y otra información de relevancia para las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

Los inventores llegan a la conclusión de que la detección de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de hibridación in situ se permite por medio del uso de guanidina de caótropro en los tampones de pre-hibridación e hibridación. Se observó la mejor proporción de señal con respecto a ruido en presencia de guanidina 2 M en comparación con las hibridaciones in situ llevadas a cabo a concentraciones más bajas de guanidina. También se concluyó que la urea es superior a guanidina en cuanto a la detección de miARN por medio de hibridación in situ debido a su mejor rendimiento y naturaleza no tóxica.

Ejemplo 7. La hibridación in situ permitida con LNA no tóxica permite la evaluación semi-cuantitativa en muestra de ensayo de FFPE fijada de forma rutinaria.

Introducción

Ilustrado por medio de análisis de imágenes de la expresión de miARN-21, este Ejemplo demuestra que es posible una evaluación semi-cuantitativa de los resultados de hibridación in situ obtenidos usando urea en el tampón de hibridación.

Procedimientos

Montaje de secciones tisulares sobre soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se describe en la sección Procedimientos del Ejemplo 1. Detección; análisis de imágenes; y presentación de datos se llevan a cabo como se describe en la Sección de Procedimientos Generales. Se llevó a cabo la semi-cuantificación de la señal de hibridación in situ usando la segmentación supervisada en base a la clasificación bayesiana. Para la cuantificación de miARN-21, las especies de miARN usadas en este Ejemplo, se diferenciaron las siguientes estructuras histológicamente teñidas: áreas azules (B) que correspondieron a la señal de hibridación; área roja (R) que correspondió a la tinción con rojo nuclear (obtenida con Rojo Rápido Nuclear, por ejemplo, Sigma - Aldrich N° Cat. N3020 o GeneTex Inc., N° Cat GTX73305); áreas púrpura (P) que correspondían a la señal de hibridación in situ azul que se solapa la tinción de rojo nuclear. Se pudo discriminar la secreción mucinosa teñida con NFR (observada en su mayoría con mucosa normal y que aparecía solo esporádicamente en la áreas con cáncer) y se consideró como señal de fondo. Se obtuvieron los siguientes parámetros para cada imagen de muestra: B, R, P, azul total (TB = B + P), rojo total (TR = R + P) así como también TBR = TB/TR.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tejido de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sonda: se usó una sonda mejorada con LNA, marcada con digoxigenina doble para miARN-21 (N°. ID de Sec. 1 en la Tabla 2) diseñada por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

Ilustrado por medio de análisis de imágenes de hibridación in situ de miRNA-21 en tejido de cáncer de colon, la Figura 7. Ilustra ISH semi-cuantitativa ejemplificado por medio de la toma de muestra de imágenes y análisis de imágenes de una señal de hibridación in situ de miR-21 en cáncer de colon. El panel (a) presenta un ejemplo típico de una sección tisular completa (panel a) con mucosa normal, área y tumor y submucosa tras la hibridación in situ para miR-21 y la contra-tinción con rojo nuclear. El área de tumor está rodeada con un círculo y las imágenes de posición colocadas sistemáticamente aleatorias están indicadas por marcos cuadrados. Se capturan las imágenes de muestra con un objetivo 20x en las posiciones de imágenes colocadas de manera sistemática. El panel (b) muestra una de dichas imágenes de muestra. Posteriormente, se procesan las imágenes de muestra con un clasificador de píxeles supervisado que ha sido entrenado para separar la señal de hibridación in situ azul de la contra tinción roja y la hibridación in situ púrpura que se solapa con el rojo nuclear, panel (c). Nótese que el color rojo se correlaciona con el rojo rápido nuclear en el panel (b) mientras que la señal azul ISH del panel (b) se muestra como un color falso verde en el panel (c). El área dentro de los cuadros indicado en la esquina inferior izquierda del panel (b) y (c) está ampliada y se muestra en el panel (d) y en el panel (e). Nótese que la señal de hibridación in situ azul del panel (d) aparece como verde brillante, la señal púrpura del panel (d) es amarilla y la señal roja del panel (d) aparece como rojo brillante en la imagen clasificada, panel (e).

Los datos sobre ampliación y otra información de relevancia con respecto a las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

Los inventores llegan a la conclusión de que la tinción cromogénica obtenida tras la hibridación in situ de miARN en presencia de urea 2 M en los tampones de pre-hibridación e hibridación permite la evaluación semi-cuantitativa

posterior.

Ejemplo 8. El período de caducidad del tampón de hibridación basado en urea para la hibridación in situ de miARN en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria supera los 12 meses.

Introducción

- 5 Este Ejemplo se diseña para evaluar si el tiempo de almacenamiento a 4 °C de un tampón de hibridación que contiene urea 2 M tiene impacto alguno sobre la señal de hibridación in situ de miARN.

Procedimientos

- Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1 con las siguientes excepciones: la pre-hibridación y la hibridación se llevaron a cabo en tampones que bien estaban recién preparados (como se detalla en el Ejemplo 1); tenían cinco meses de antigüedad; o bien tenían ocho meses o 13 meses de antigüedad. Los tampones de pre-hibridación e hibridación que no se prepararon de manera reciente se almacenaron a 4 °C hasta el momento de uso. La sonda de miARN-21 usada en este experimento se diluyó hasta una concentración final de 40 nM en cuatro tampones y se incubó sobre dos portaobjetos. Se procesaron todos los portaobjetos para el análisis de imágenes recogiendo 5-15 imágenes (ejemplos mostrados en la Sección de Resultados). Se determinaron los valores de TB y TBR necesarios para calcular los diagramas de bajas mostrados en el panel b) de la Figura 8 como se describen en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 7. Detección; análisis de imágenes, y la presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección de Procedimientos Generales.

- 20 Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tres tejidos de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sonda: se usó una sonda mejorada con LNA, marcada con digoxigenina doble para miARN-21 (Nº. ID de Sec 1 de la Tabla 2) diseñada por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

- 25 Ilustrados por medio de análisis de imágenes de hibridación in situ de miARN-21 en tejido de cáncer de colon, parece a partir del Ejemplo 8 que el tampón basado en urea descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1, Etapas 5-6, usado para la pre-hibridación y la hibridación in situ de miARN, es estable a 4 °C. El panel A muestra que se obtiene una señal de miARN-21 altamente específica e intensa en todos los tampones sometidos a ensayo sin importar si estaban recién preparados, tenía 5 meses, 8 meses o 13 meses de antigüedad (Panel A). Este resultado estuvo apoyado por los diagramas de cajas del Panel B, que documenta de forma semi-cuantitativa que no existe pérdida de rendimiento de ISH de miARN por medio de almacenamiento prolongado del tampón de ISH basado en urea. Los datos sobre ampliación, tamaño tisular y otra información de relevancia para las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

- 35 Los inventores llegan a la conclusión de que el tampón de hibridación in situ que contiene urea es estable a 4 °C durante al menos 12 meses sin pérdida de rendimiento.

Ejemplo 9. La hibridación in situ permitida por LNA no tóxico permite la evaluación cuantitativa de la supervivencia corta libre de enfermedad en pacientes con cáncer de colon en estadio II.

Introducción

- 40 Este experimento sugiere que el nivel de miR-21 determinado por medio de hibridación in situ de miR-21 en muestra de ensayo intercalada con parafina y fijada de forma rutinaria por medio de LNA marcado con DIG en presencia de urea en el tampón de hibridación se correlaciona con las probabilidades de supervivencia para pacientes con cáncer de colon.

Procedimientos

- 45 Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1. Detección; análisis de imágenes, y la presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección de Procedimientos Generales. Las estimaciones de Kaplan-Meier de supervivencia se presentan con pacientes agrupados en terciles basados en los valores de miARN-21. Se evaluaron la suposición de linealidad y la suposición de los peligros proporcionales usando los residuales de Schoenfeld y Martingale.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas de tres tejidos de cáncer de colon humano a partir de la fuente identificada en la Tabla 1 como se describe en el Ejemplo 1.

Sonda: se usó una sonda mejorada con LNA, marcada con digoxigenina doble para miARN-21 (Nº. ID de Sec 1 de la Tabla 2) diseñada por Exiqon, Dinamarca, a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 9 muestra un diagrama de terciles de las estimaciones de Kaplan-Meier de la señal de hibridación in situ de miARN-21. Se llevaron a cabo análisis de regresión multivariante de Cox para comparar la potencia estadística de los niveles de expresión de miARN-21 observados, medidos en forma de valores de TBR (TBR= azul total/rojo total) en pacientes con cáncer de colon (A) y rectal (C) y los valores de TB (TB = área total azul) en pacientes con cáncer de colon. 1/3 del grupo de pacientes con los niveles más elevados de miARN-21 (verde), 1/3 de los pacientes con niveles de miARN-21 intermedio (azul) y 1/3 del grupo de pacientes con los niveles más bajo de miARN-21 (amarillo). Los datos sobre ampliación, tamaño tisular y otra información relevante para las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

Los inventores llegan a la conclusión de que el rendimiento de una tampón de hibridación in situ que contiene urea de compuesto caotrópico permite la evaluación cuantitativa de la señal de hibridación in situ que permite la evaluación adicional del riesgo clínico.

Ejemplo 10. El tampón de hibridación basado en urea facilita la hibridación in situ específica de especies de miARN por medio de sondas mejoradas con LNA marcadas con DIG en cualesquiera muestras de ensayo intercaladas con parafina y fijadas de forma rutinaria que representan un amplio intervalo de tipos tisulares.

Introducción

Ilustrado por medio de hibridación in situ en presencia de urea 2 M de miARN-124, miARN-126, miARN-145 y miARN-205 en secciones tisulares de cerebro humano, riñón humano, pared intestinal humana y cuello uterino humano, respectivamente, el Ejemplo 10 demuestra que la urea en el tampón de hibridación permite el análisis específico de especies de miARN individuales en muestras de ensayo intercaladas con parafina y fijadas de forma rutinaria en un amplio intervalo de tipos tisulares.

Procedimientos

Montaje de las secciones tisulares sobre el soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se ha descrito en la Sección de Procedimientos del Ejemplo 1. Detección; análisis de imágenes, y la presentación de datos se llevaron a cabo como se describe en la Sección de Procedimientos Generales.

Muestras de ensayo: se prepararon secciones seriadas tisulares a partir de muestras intercaladas con parafina, fijadas de forma rutinaria de cerebro humano, colon, cuello uterino y riñón, obtenidas a partir de fuentes identificadas en la Tabla 1, como se describen en el Ejemplo 1.

Sonda: se diseñaron cuatro oligonucleótidos mejorados con LNA, marcados con digoxigenina dobles por parte e Exiqon, Dinamarca. Las sondas incluyeron un miARN-124 de diana de 20 mer (Nº. ID de Sec. 5 en la Tabla 2); un miARN-126 de diana de 21 mer (Nº. ID de Sec. 6 en la Tabla 2); un miARN-145 de diana de 23 mer (Nº. ID de Sec. 7 en la Tabla 2); y un miARN-205 de diana de 21 mer (Nº. ID de Sec. 8 en la Tabla 2). Todas las sondas se sometieron a ensayo a una concentración final de 40 nM.

Resultados

La Figura 10 muestra los resultados de la hibridación in situ de cuatro especies de miARN en diferentes tipos de tejido humano usando urea 2 M en el tampón de fluidización. Las cuatro sondas de miARN-124 de diana en cerebro (panel a), miARN-126 en riñón (panel b), miARN-145 en pared intestinal (panel c) y miARN-205 en cuello uterino (panel d) demostraron una señal intensa. Usando sondas mejoradas con LNA, marcadas con digoxigenina dobles, los inventores también demostraron la hibridación in situ de miARN-21 y miARN-126 en colon (Ejemplos 1 y 3) en presencia de urea 2 M en el tampón de hibridación. Los datos de ampliación, tamaño tisular y otra información relevante para las imágenes se presentan en la Tabla 3.

Conclusión

En base a los resultados obtenidos en los Ejemplos 2, 3 y 10, los inventores llegan a la conclusión de que el tampón de hibridación permite la hibridación in situ específica y no tóxica de especies de miARN en un amplio intervalo de muestras de tejidos intercalados con parafina y fijadas de forma rutinaria de origen humano.

Ejemplo 11 Detección de β -actina ARNm.

Introducción

Para ilustrar que el procedimiento de la invención resulta aplicable a la mayoría de los tipos de ARN incluyendo ARNm, se detectó β -actina ARNm. β -actina es un actina no muscular que toma parte en la formación de filamentos que comprenden un componente principal del citoesqueleto. Debido a su expresión general y extendida, con frecuencia la expresión de β -actina se usa para la normalización en inmunotransferencia Northern. El número de
5 sitios de unión específicos para β -actina ARNm puede estar muy por debajo de las sondas de ARNs U6. Por consiguiente, el uso de β -actina como normalización de ISH requiere un procedimiento ISH más sensible.

Procedimientos

Montaje de secciones tisulares sobre un soporte sólido; desparafinado; el procedimiento de hibridación in situ que incluye la etapa de pre-hibridación; y la deshidratación se llevaron a cabo como se describen en la Sección de
10 Procedimientos del Ejemplo 1 usando urea 2 M en el tampón de hibridación.

Muestras de ensayo

Una muestra de ensayo de FFPE de cáncer de esófago humano. Las muestras de FFPE se adquirieron en Proteogenex (Culver City, CA).

Sonda

Una sonda de LNATM de 20 bases de largo marcada con DIG doble específica para β -actina ARNm (acgaaggctcatcattcaaa (Nº. ID de Sec. 13)) contenido de LNA 40 %.

Resultados

Este experimento muestra una señal de hibridación in situ específica para β -actina ARNm en cáncer de esófago humano usando una sonda de LNA. La señal se observó tanto en células cancerígenas como estromales. Como
20 cabía esperar, la señal fue citoplasmática localizada y varió de forma considerable entre los diferentes tipos de células (Figura 11).

Conclusión

Este ejemplo mostró que el procedimiento descrito anteriormente proporciona detección sensible y específica de β -actina ARNm en muestras de ensayo intercaladas con parafina y fijadas de forma rutinaria.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Exiqon A/S

<120> Procedimiento mejorado de hibridación in situ y tampón

<130> 413.20-WO

<160> 13

<170> versión patentIn 3,5

<210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

<400> 1

tcaacatcag tctgataagc ta 22

<210> 2

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético
 <400> 2
 tcaacatcag tctga 15
 5 <210> 3
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> sintético
 <400> 3
 acatcagtct gataagc 17
 <210> 4
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 1
 20 catgagattt caacagtca 19
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> sintético
 <400> 5
 ggcattcacc gcgtgcctta 20
 <210> 6
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 35 <400> 6
 gcattattac tcacgtacg a 21
 <210> 7

<211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> sintético
 <400> 7
 agggattcct gggaaaactg gac 23
 <210> 8
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 8
 15 agactccggt ggaatgaagg a 21
 <210> 9
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> sintético
 <400> 9
 gctgtcacac gcaca 15
 <210> 10
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 30 <400> 10
 ttcaaaacat gaattgctgc tg 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético

<400> 11
 gtgtaacacg tctatacgcc ca 22
 <210> 12
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 12
 10 cacgaatttg cgtgtcatcc tt 22
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> sintético
 <400> 13
 acgaaggctc atcattcaaa 20

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento de detección de ácidos nucleicos por medio de hibridación in situ de una muestra de ensayo celular fijada que comprende una etapa de hibridación que se lleva a cabo en un tampón de hibridación libre de formamida que comprende un componente caotrópico seleccionado entre el grupo de urea, sales de guanidinio o guanidina y una mezcla de dos o más miembros del grupo, en el que los ácidos nucleicos son moléculas pequeñas de ARN que no es de codificación.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de ensayo celular es una sección tisular embebida en parafina y fijada con formalina convencional (FFPE).
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente caotrópico es urea.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de hibridación in situ contiene uno o más monómeros de LNA.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento comprende una etapa de hibridación en el que dicha muestra de ensayo celular se pone en contacto con una disolución de hibridación que comprende:
 - al menos una sonda marcada no radiactiva que comprende 7-22 nucleótidos que son capaces de hibridarse a una secuencia de ARN específica y que comprende uno o más monómeros de LNA,
 - un agente de estabilización híbrido seleccionado entre el grupo de sales de cationes mono- y divalentes,
 - urea en una concentración entre 0,5 y 5 M.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sonda de hibridación está marcada tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' con digoxigenina.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el procedimiento comprenden además una etapa en la que la señal de hibridación se visualiza por medio de la formación de un precipitado de NBT-formazan de color azul oscuro, las muestras se someten de manera opcional a contra-tinción con rojo rápido nuclear, y además comprende una cuantificación que comprende las etapas de:
 - tomar un número, tal como 8-17, de imágenes aleatorias procedente del interior del área del tumor,
 - comprobar que dichas imágenes aleatorias contienen células cancerígenas evidentes, excluyendo las imágenes que no contienen, y también excluyendo las imágenes con artefactos tisulares y de tinción,
 - emplear una segmentación supervisada basada en la clasificación Bayesiana entrenada para reconocer píxeles azules (es decir, precipitado de NBT-formazan) y si se tiñe con rojo rápido nuclear, píxeles rojos (es decir, píxeles coloreados con rojo rápido nuclear) y píxeles púrpura (es decir, píxeles coloreados tanto con NBT-formazan como con rojo rápido nuclear) para estimar las áreas azules (B) y, si se tiñe con rojo rápido nuclear, las áreas rojas (R) y las áreas púrpura (P),
 - cuantificar el nivel relativo de ARN por medio de estimación de bien el área total azul ($TB = B + P$) y/o, si se tiñe con rojo rápido nuclear, el área total azul rotativa ($TBR = TB/TR$, en la que el área total roja $TR = R + P$) y usa TB, y/o TBR como medición del nivel de ARN específico en la muestra.
8. Un tampón de hibridación libre de formamida para el uso en detección de ARNs pequeños que no son de codificación en secciones tisulares (FFPE) embebidas en parafina y fijadas con formalina convencional con sondas de LNA por medio de hibridación in situ en el que el tampón consiste en:
 - un tampón que comprende un agente de estabilización híbrido seleccionado entre el grupo de sales de cationes mono- y divalentes,
 - de 0,5 a 5 M de un componente caotrópico seleccionado entre el grupo comprendido de urea, y sales de guanidinio (o guanidina) o una mezcla de dos o más miembros del grupo,
 - disolución de Denhardt en una cantidad de 0 - 2x, y
 - un ARN portador, tal como ARN-t de levadura, en una cantidad de 0 - 0,5 mg/ml.
9. El tampón de hibridación de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el componente caotrópico o la mezcla de componentes caotrópicos está seleccionado entre el grupo de urea e hidrocloreuro de guanidina.
10. El tampón de hibridación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que el componente caotrópico es urea.

11. El tampón de hibridación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el tampón consiste en:

- 2,5 X SSC,

- urea 2 M,

5 - 1 x Disolución de Denhardt, y

- 0,25 mg/ml de ARN-t de levadura.

12. Un kit para la detección de ARNs pequeños que no son de codificación en tejido intercalado con parafina y fijado con formalina convencional (FFPE) por medio de hibridación in situ, comprendiendo dicho kit un tampón de hibridación libre de formamida de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, y al menos una sonda de LNA optimizada para la detección específica de dicho ARN pequeño no de codificación.

10

13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12 en el que el ARN pequeño que no es de codificación es un microARN.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 12 ó 13 en el que la sonda de LNA está marcada tanto en el extremo 3' como en el extremo 5' con digoxigenina.

15. Un procedimiento de predicción de la supervivencia libre de enfermedad de un paciente con cáncer de colon de estadio II que comprende:

15

a) determinar el nivel relativo de miR-21 en al menos una sección tisular representativa a partir del cáncer de colon en estadio II de dicho paciente por medio del procedimiento de la reivindicación 7

b) comparar el nivel de miR-21 en el paciente con un conjunto de niveles relativos de miR-21 obtenidos por medio del procedimiento de la reivindicación 7 a partir de un panel de referencia de muestras de cáncer de colon en estadio II obtenidas a partir de un panel de referencia de pacientes con historia de enfermedad conocida,

20

c) agrupar el panel de referencia en terciles de acuerdo con el nivel relativo de miR-21 determinado por medio del procedimiento de la reivindicación 7, y

d) tomar el nivel de mR-21 de dicha al menos una sección tisular representativa a partir del tumor de colon en estadio II procedente de dicho paciente que cae entro del nivel de miR-21 del tercil superior (expresión elevada) como indicativo de una mayor probabilidad de supervivencia corta libre de enfermedad, y tomando el nivel de miR-21 de dicha al menos una sección tisular representativa procedente del tumor de colon en estadio II de dicho paciente que cae entro del nivel de miR-21 del tercil inferior (expresión baja) como indicativo de una mayor probabilidad de supervivencia larga libre de enfermedad.

25

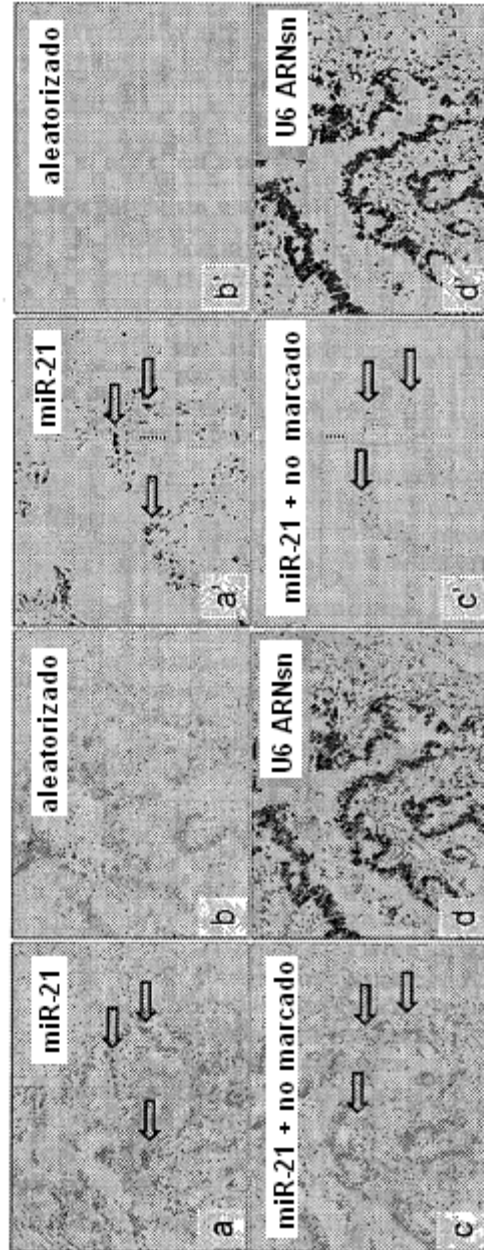


Fig. 1

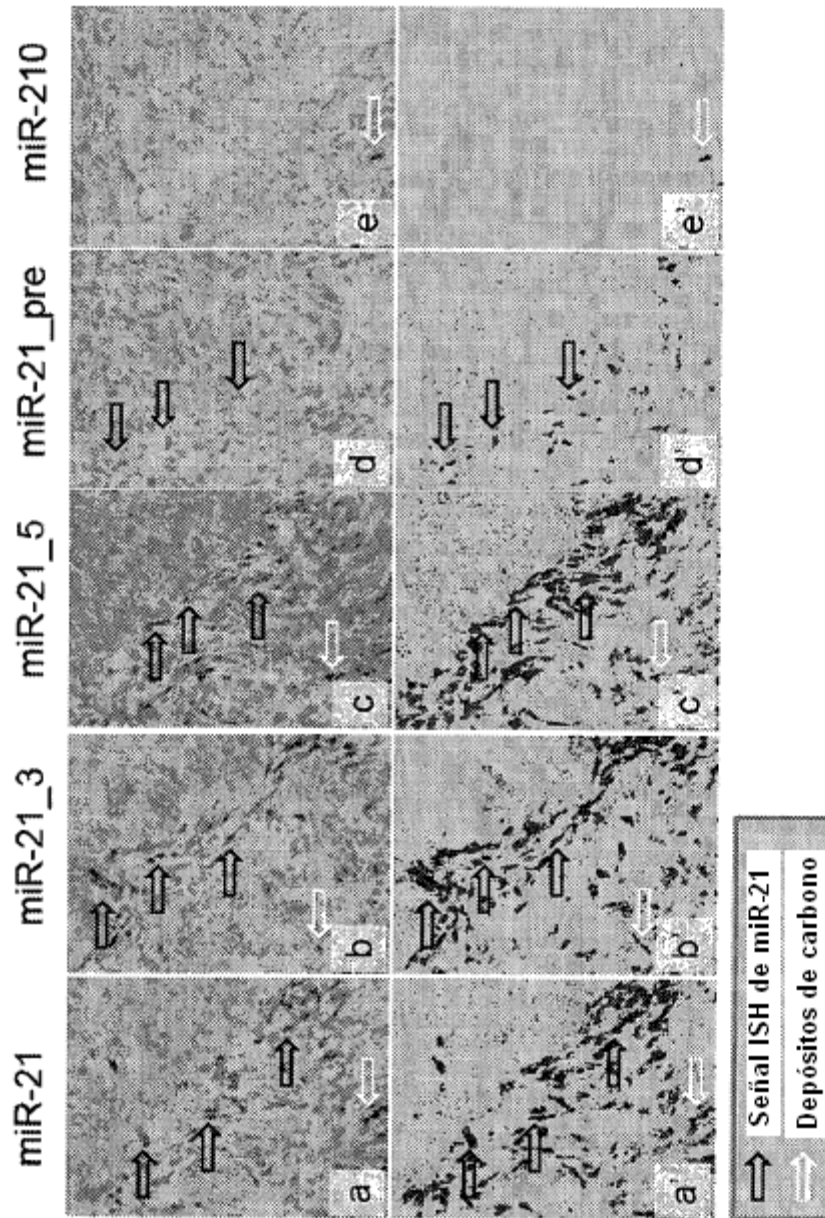


Fig. 2

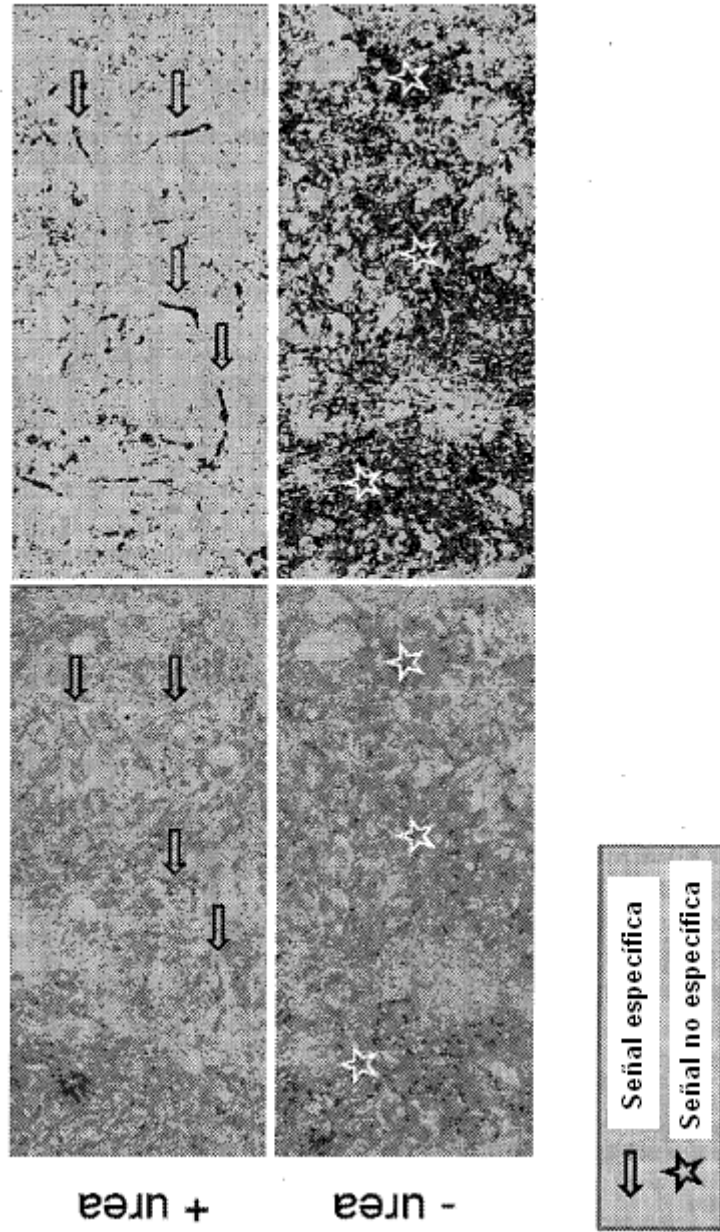


Fig. 3

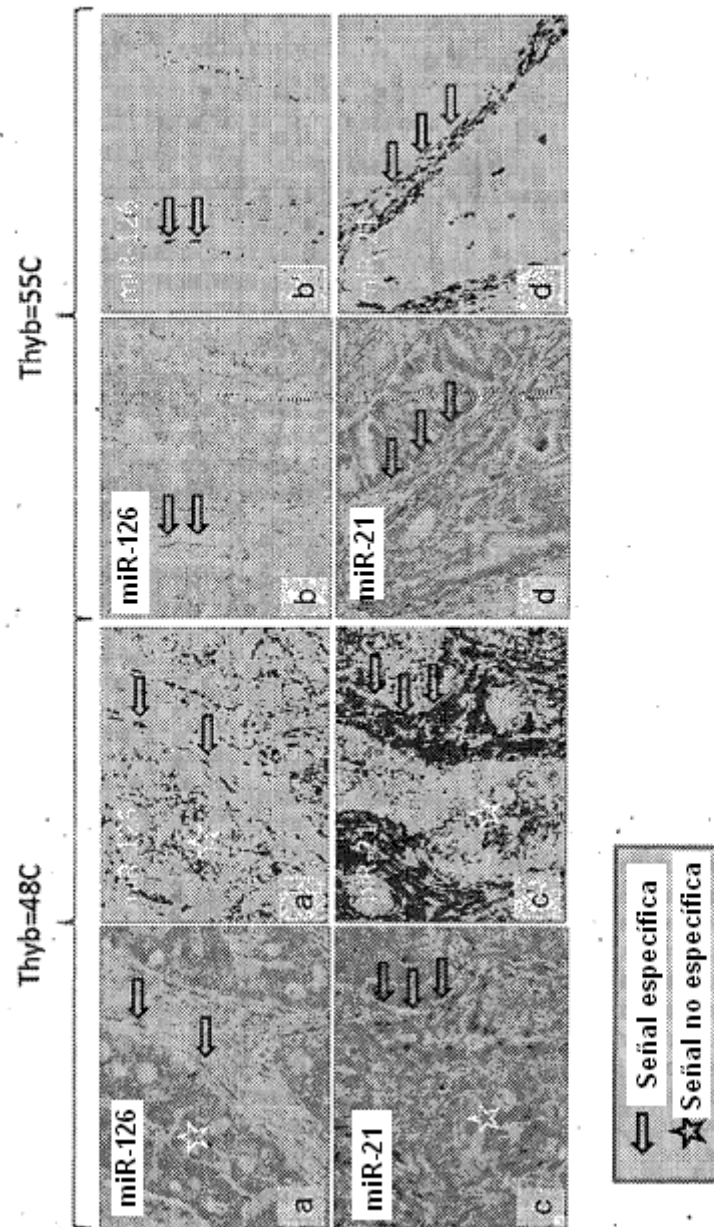


Fig. 4

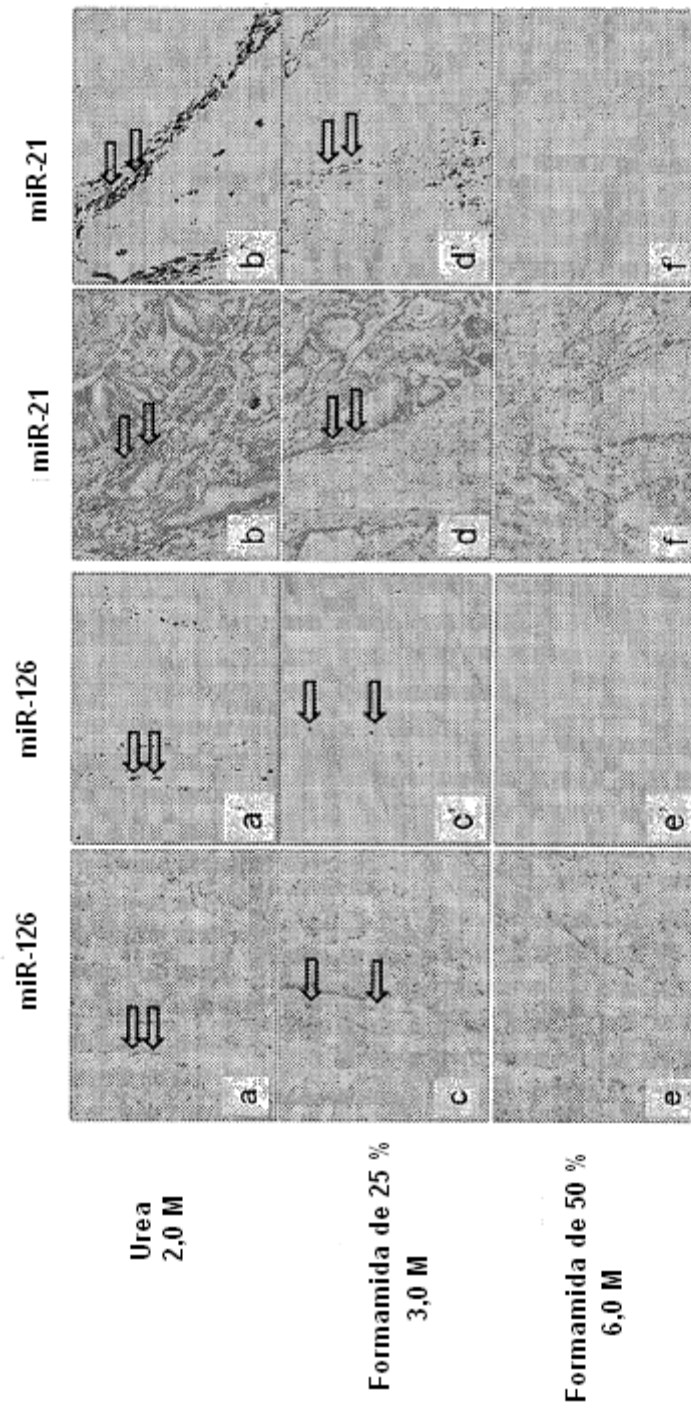


Fig. 5

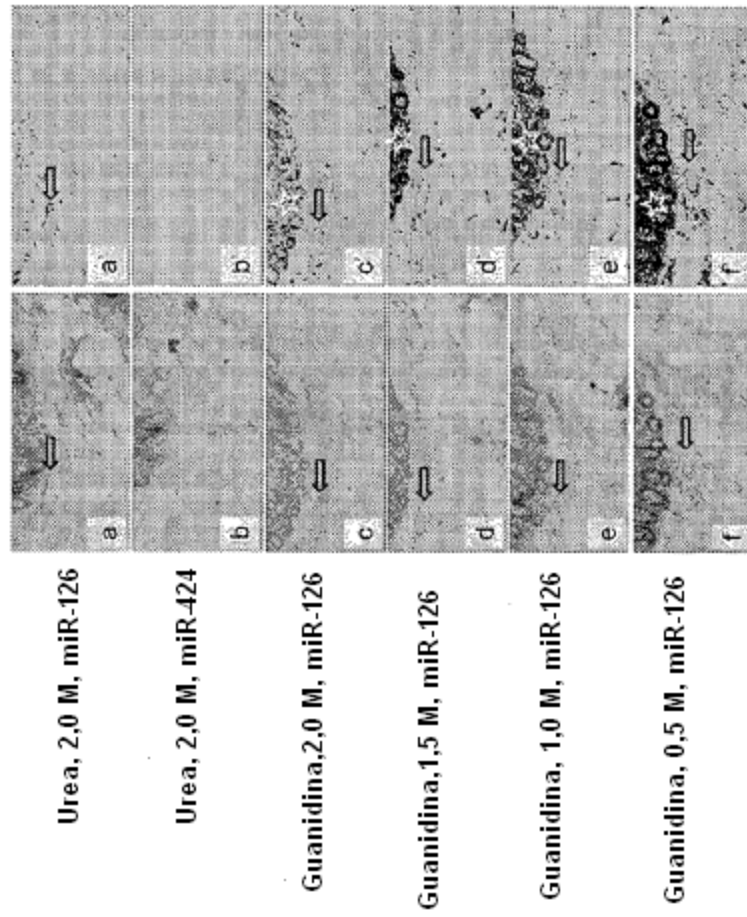


Fig. 6

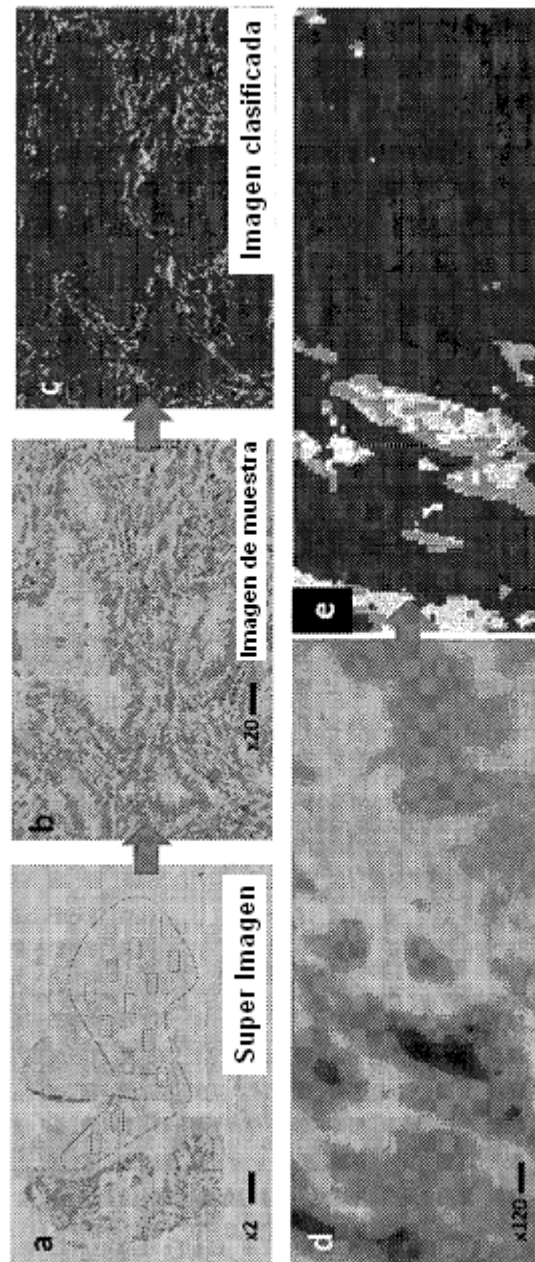


Fig. 7

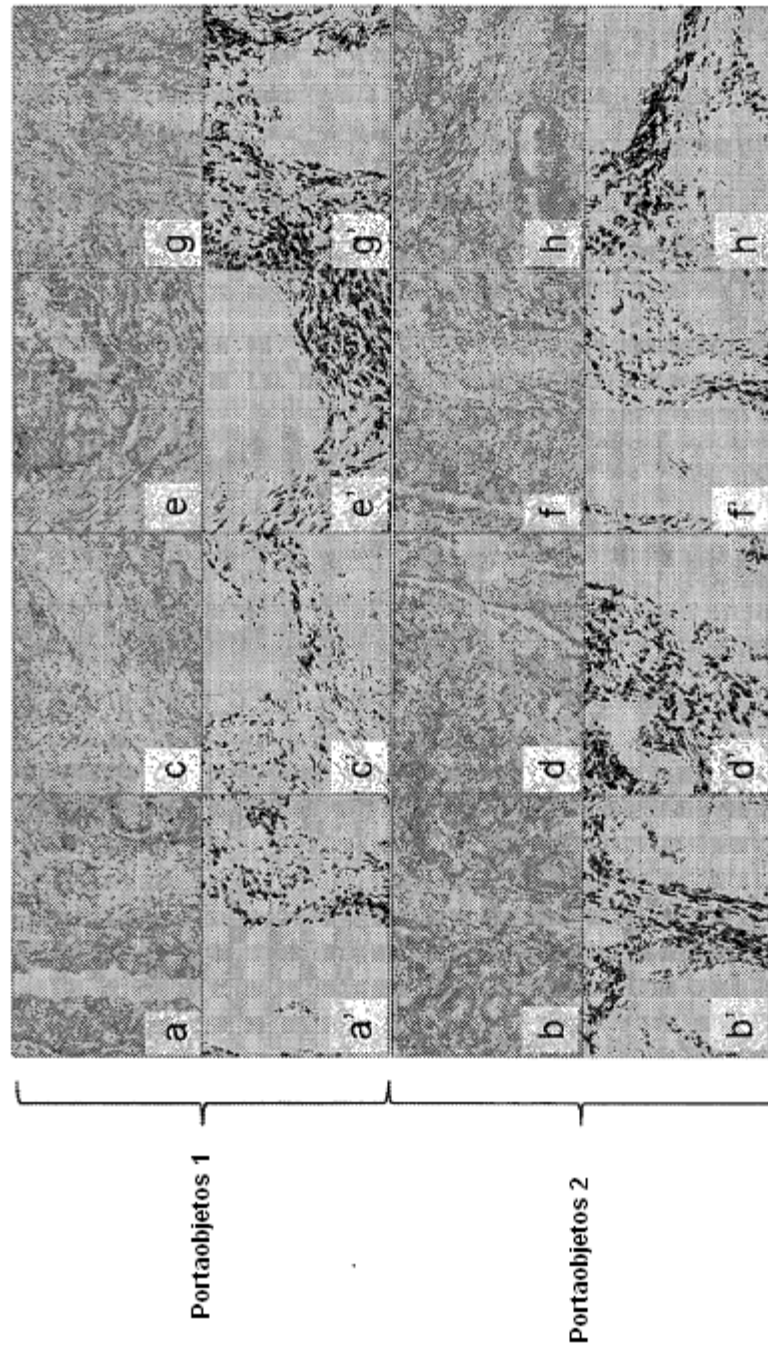
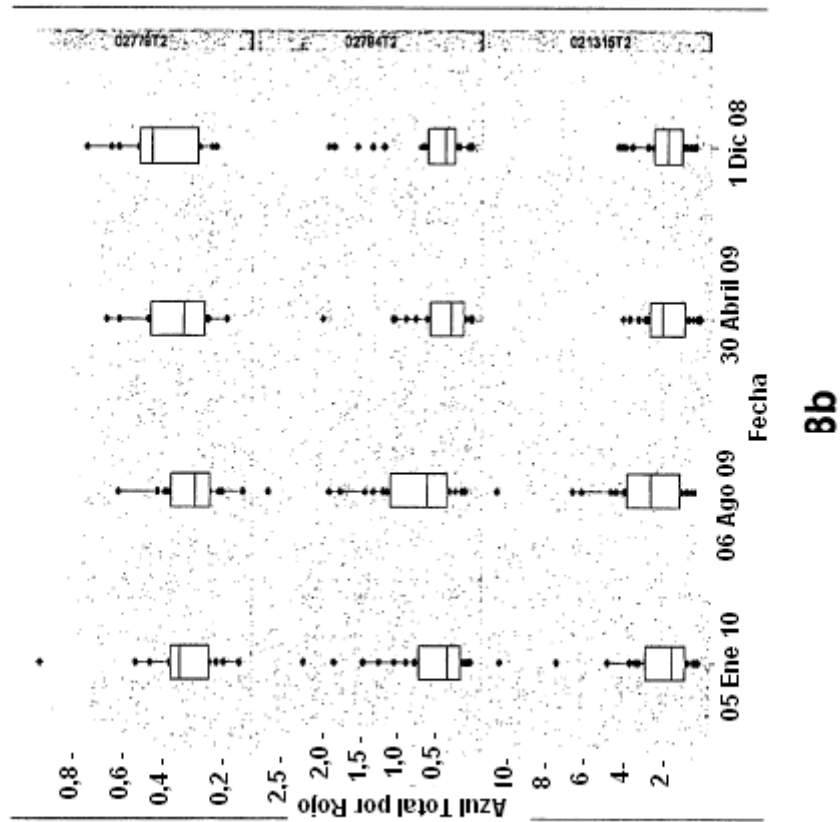


Fig. 8a



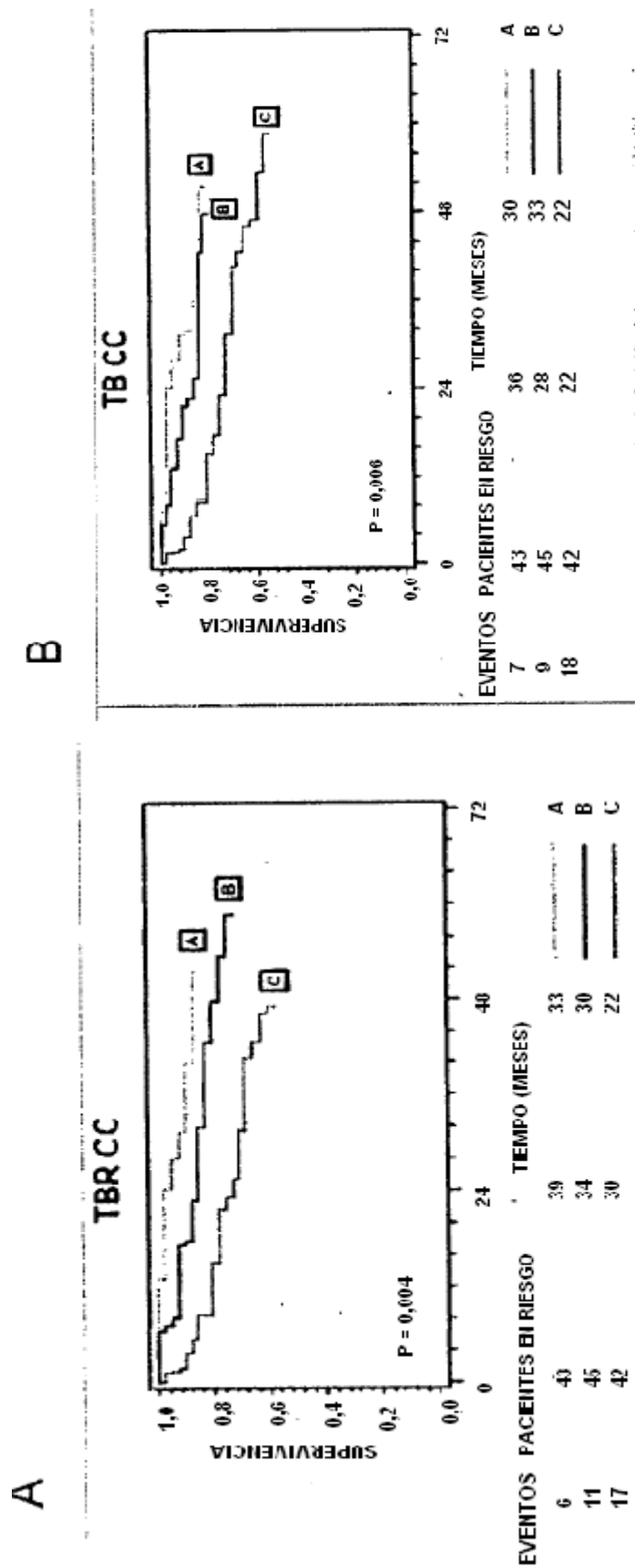


Fig. 9

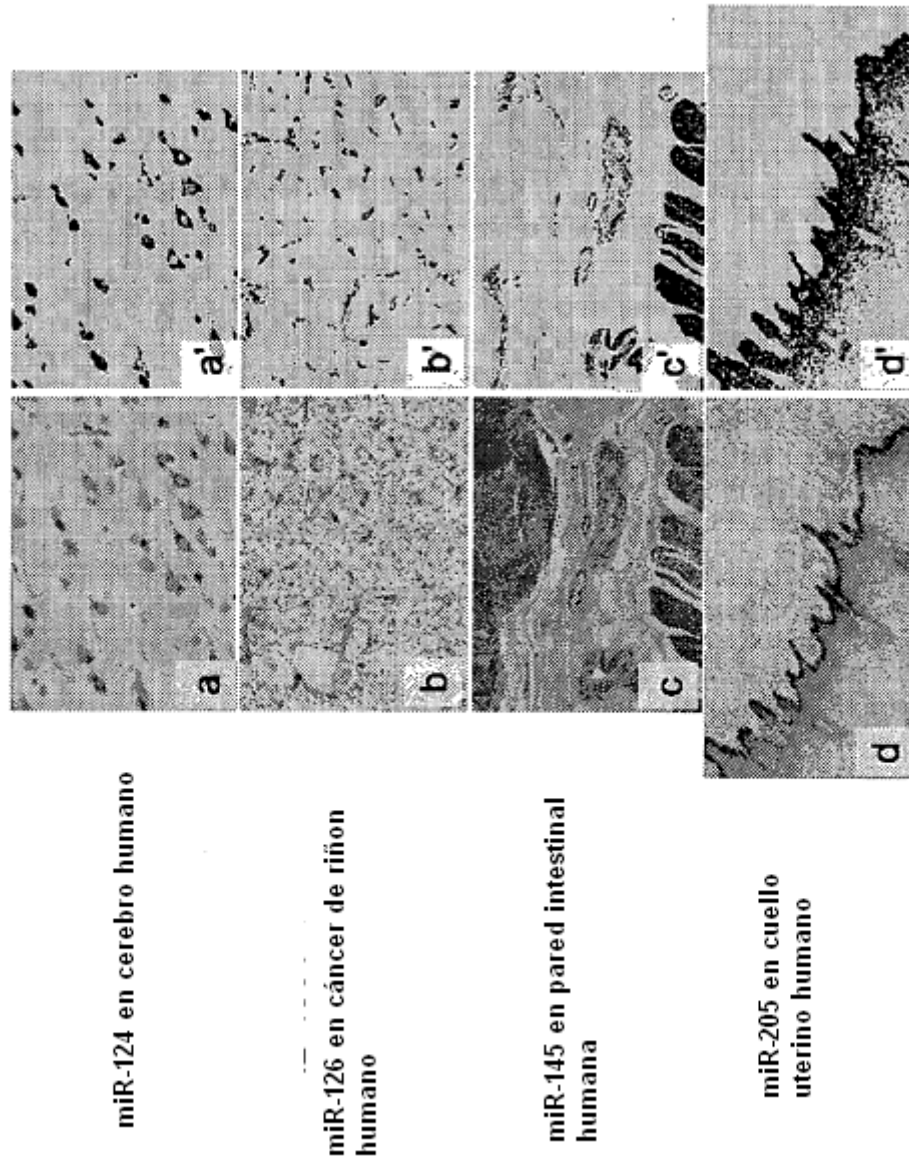


Fig. 10

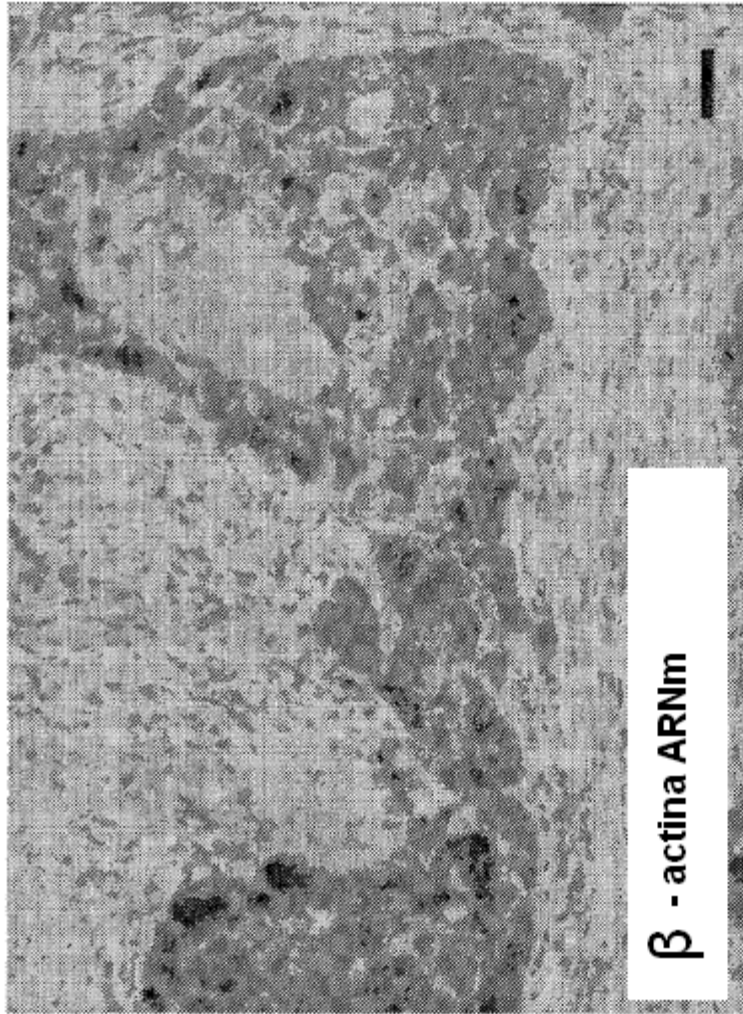


Fig. 11